

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO PLENA UFSCAR/UNESP

**DIANA AMARAL MONTEIRO**

**IMPACTO DE DIFERENTES VIAS DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO INORGÂNICO  
SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, A FUNÇÃO CARDIO-  
RESPIRATÓRIA E O POTENCIAL DE BIOCONCENTRAÇÃO E BIOMAGNIFICAÇÃO EM  
MATRINXÃ, *BRYCON AMAZONICUS* (SPIX & AGASSIZ, 1829) E EM TRAÍRA,  
*HOPLIAS MALABARICUS* (BLOCH, 1794)**

**SÃO CARLOS**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO PLENA UFSCAR/UNESP

**DIANA AMARAL MONTEIRO**

**IMPACTO DE DIFERENTES VIAS DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO INORGÂNICO  
SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, A FUNÇÃO CARDIO-  
RESPIRATÓRIA E O POTENCIAL DE BIOCONCENTRAÇÃO E BIOMAGNIFICAÇÃO EM  
MATRINXÃ, *BRYCON AMAZONICUS* (SPIX & AGASSIZ, 1829) E EM TRAÍRA,  
*HOPLIAS MALABARICUS* (BLOCH, 1794)**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Fisiológicas.

*Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin*

**SÃO CARLOS**

**2011**

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

M775id

Monteiro, Diana Amaral.

Impacto de diferentes vias de contaminação por mercúrio inorgânico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, a função cardio-respiratória e o potencial de bioconcentração e biomagnificação em matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e em traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) / Diana Amaral Monteiro. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

423 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Fisiologia. 2. Cloreto de mercúrio. 3. Função cardio-respiratória. 4. Enzimas. 5. Peixe. I. Título.

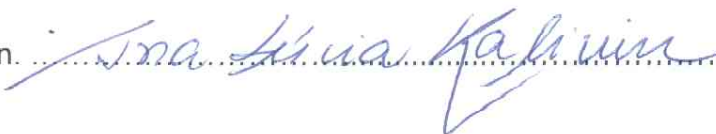
CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Diana Amaral Monteiro

Dia 20/06/2011

Profª. Drª. Ana Lúcia Kalinin..... 

Profª. Drª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo..... 

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo..... 

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

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo..... 

*À Deus*

*Por estar sempre junto a mim, por me amparar nos momentos difíceis  
e me mostrar o caminho nas horas incertas.*

*À minha mãe*

*Por todos esses anos de paciência e confiança, pelo incentivo aos estudos e por  
agüentar os momentos de ansiedade e estresse desde que ingressei no doutorado.  
Invariavelmente presente em tudo o que eu faço e sou.*

## AGRADECIMENTOS

*A minha orientadora e amiga Ana Lúcia Kalinin, pela atenção, competência e disposição de sempre. Meu profundo agradecimento pelo apoio e estímulo incansável que ultrapassaram a tese e chegaram a muitos momentos de minha vida. Obrigada pela oportunidade, sensibilidade e compreensão de sempre.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (Processo 06/50772-6) sem o qual este trabalho não seria realizado.*

*Aos membros da banca examinadora por terem gentilmente aceitado analisar este trabalho e pelas grandes colaborações que fizeram.*

*À Universidade Federal de São Carlos pela infra-estrutura e facilidades proporcionadas, mais uma vez. Tenho orgulho em dizer que minha formação se fez nesta universidade onde encontrei muitos mestres e amigos.*

*Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, particularmente àqueles professores que eu tive a oportunidade de conviver mais de perto cursando suas disciplinas oferecidas na Pós-Graduação e ao querido Seu Ângelo, pelo auxílio carinhoso e pela convivência amigável.*

*À secretaria da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF), em especial ao Alexandre, pelo atendimento aos pedidos e solicitações.*

*Ao Prof. Francisco Tadeu Rantin pela total disponibilidade do seu laboratório, pelo seu pronto auxílio sempre que precisei e pelo exemplo de profissionalismo na pesquisa em Fisiologia Comparada no Brasil.*

*Aos amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa: André G., Anelli, Daniella, Elinton, Felipe, Hugo, Juliana, Lucas, Luciano DW, Marcelo, Nathan, Rafael Vó, Rafael Z., Samuel, Thiago e Vivian, pela amizade, convívio e apoio.*

*À Piscicultura Águas Claras (Mococa-SP) da família Martinho Colpani e ao Parque do Lago (Dourado-SP) do Malheiro pelo atendimento sempre gentil e pela disponibilidade de de animais.*

*Curiosidade, determinação, persistência e paciência são essenciais para aquele que almeja seguir nesta carreira, que é linda, mas por vezes ingrata. Agradeço aos meus amigos André G., Danosa, DW, Ju, Mari e Vô, que tornaram esse caminho muito mais doce, cheio de momentos engraçados, de risadas e de companherismo. Em especial à Ju pela ajuda profissional e por sempre dividir comigo problemas, alegrias e intermináveis horas no L.ZBC de domingo a domingo, sob sol, chuva e tempestades temporais, profissionais e pessoais.*

*Às amigas que admiro profissional e pessoalmente Moniquete e Cléo, Profas. Dras. da UFSCar (Campus Sorocaba), pelo carinho, incentivo e por partilhar conhecimentos e experiências que muitas vezes direcionaram o caminho a seguir.*

*A minha grande amiga Fernanda Sampaio, pela convivência sempre agradável e, mesmo que distante, sempre me apóia, escuta e incentiva desde o Mestrado.*

*Ao meu amigo Prof. Hugo Ribeiro pelo apoio profissional, pelas conversas, sempre me mostrando com seu exemplo que não se desiste facilmente diante das dificuldades.*

*Às grandes amigas-irmãs Fabiana (Bia), Karine (Mané) e Juliana Reis (Ju) por todo carinho, pela amizade de longos anos e força nos momentos mais difíceis e que mais precisei.*

*À Latoíia, com seus olhares, pêlos, lambidas e mordidas, amor canino incondicional e companhia para todas as horas, que faz dos meus dias mais sombrios suportáveis.*

*A todos aqueles que, apesar de não citados nominalmente, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

**"Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,  
pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra.  
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,  
mas não vai só nem nos deixa sós.  
Leva um pouco de nós mesmos,  
deixa um pouco de si mesmo.  
Há os que levam muito,  
mas há os que não levam nada.  
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,  
e a prova de que duas almas  
não se encontram ao acaso"**

**(Antoine de Saint-Exupéry)**

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades,  
toda a prosperidade moral e material das nações  
dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar.  
Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental.  
Perceber os fenômenos, discernir as relações,  
comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis,  
eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira.  
Espertar na inteligência nascente as faculdades  
cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade”

*(Rui Barbosa)*

“[...] acho que só há um caminho para a ciência - ou para a filosofia: encontrar um problema,  
ver a sua beleza e apaixonarmo-nos por ele; casarmo-nos com ele, até que a morte nos  
separe - a não ser que obtenhamos uma solução. Mas ainda que encontremos uma solução,  
poderemos descobrir, para nossa satisfação, a existência de toda uma família de  
encantadores, se bem que talvez difíceis, problemas-filhos,  
para cujo bem-estar poderemos trabalhar, com uma finalidade em vista,  
até ao fim dos nossos dias.”

*(Karl Popper)*

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido  
como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em  
quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande  
oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.”

*(Issac Newton)*



## RESUMO

Tanto o mercúrio (Hg) quanto seus compostos são reconhecidos como importantes poluentes, pois são persistentes, bioacumulativos e tóxicos. As maiores fontes de poluição por Hg são as indústrias de cloro-álcali e a mineração do ouro. O aporte crescente de Hg nos ambientes aquáticos resulta em grande acumulação deste metal nos tecidos de peixes e nos consumidores destes, o que representa sério risco aos seres humanos e aos ecossistemas. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de uma exposição aguda (96 horas), via água, e de uma exposição sub-crônica (30 dias), via alimento, a doses sub-letais de mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) em duas espécies de peixes brasileiros ecologicamente distintos, matrinxã (*Brycon amazonicus*) e a traíra (*Hoplias malabaricus*). As respostas cardio-respiratórias em normóxia (140 mmHg) e hipóxia gradual (120 a 10 mmHg), a contratilidade cardíaca *in vitro*, os biomarcadores de estresse oxidativo e o potencial de bioconcentração e biomagnificação foram analisados. Os resultados mostram que a exposição de tais espécies ao  $\text{HgCl}_2$  induz estresse oxidativo em diferentes tecidos; limita a manutenção da contratilidade cardíaca reduzindo a força de contração do miocárdio e modula o padrão de resposta das variáveis cardio-respiratórias frente à hipóxia gradual, tornando as espécies mais susceptíveis às variações ambientais de  $\text{O}_2$ . Em relação ao matrinxã especificamente, os pontos críticos em destaque foram: estresse oxidativo severo principalmente no coração e músculo branco; redução acentuada da força de contração do músculo cardíaco isolado; hiperventilação e elevação do valor da tensão crítica de  $\text{O}_2$  em mais de 100% e bioconcentração intensa em todos os tecidos cujos valores excederam o limite máximo permitido. Já no caso das traíras foram: intenso estresse oxidativo no fígado e nas brânquias, hipoventilação, redução da taxa metabólica e da extração de  $\text{O}_2$  e bradicardia com prejuízo na condução elétrica como bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau e prolongamento do platô do potencial de ação do músculo cardíaco. Portanto, os dados indicam que o mercúrio, via água ou alimento e em concentrações ambientalmente relevantes, pode ter um impacto negativo sobre o comportamento, a saúde, a performance e o sucesso das espécies estudadas, tornando sua sobrevivência e/ou população vulneráveis.

**Palavras-chave:** Mercúrio. Matrinxã. Traíra. Estresse oxidativo. Contratilidade cardíaca. Respostas cardio-respiratórias. Exposição sub-letal aguda e sub-crônica. Bioconcentração. Biomagnificação.

## **ABSTRACT**

Both the mercury (Hg) and their compounds are recognized as important pollutants, because they are persistent, bioaccumulative and toxic. The largest sources of mercury pollution are chloride-alkaline industry and gold mining. The growing contribution of Hg in aquatic environments results in high accumulation of mercury in fishes tissue and their consumers, which poses a serious risk to humans and ecosystems. The aim of this study was to evaluate the effects of acute exposure (96 hours), via water, and a sub-chronic exposure (30 days), via food, to sub-lethal doses of inorganic mercury (HgCl<sub>2</sub>) in two species Brazilian fishes ecologically distinct, *matrinxã* (*Brycon amazonicus*) and *traíra* (*Hoplias malabaricus*). The cardiorespiratory responses to normoxia (140 mmHg) and graded hypoxia (120 - 10 mmHg), cardiac contractility in vitro, biomarkers of oxidative stress and the potential for bioconcentration and biomagnification were analyzed. The results show that exposure of these species to HgCl<sub>2</sub> induces oxidative stress in different tissues, limiting the maintenance of cardiac contractility by reducing the force of myocardial contraction and modulates the response pattern of cardio-respiratory variables to graded hypoxia front, making the species more susceptible to environmental variations of O<sub>2</sub>. Regarding *matrinxã* specifically, the critical points highlighted were mainly severe oxidative stress in heart and white muscle; marked reduction of contraction force of isolated heart muscle; hyperventilation and increase the value of the critical tension of O<sub>2</sub> in more than 100%; and intense bioconcentration in all tissue whose values exceeded the maximum allowed. In the case of *traíras* the results were: oxidative stress in the liver and gills; hypoventilation; decreased in metabolic rate and O<sub>2</sub> extraction; and bradycardia with impaired electrical conduction as first degree atrioventricular block and lengthiness of the potential plateau action of cardiac muscle. Therefore, the data indicate that mercury via food or water and in environmentally relevant concentrations, can have a negative impact on behavior, health, performance and success of the species, making their survival and/or vulnerable populations.

**Keywords:** Mercury. *Matrinxã*. *Traíra*. Oxidative stress. Cardiorespiratory responses. Cardiac contractility. Acute and subchronic sublethal exposure. Bioconcentration. Biomagnification.

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL**

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
1.1 Mercúrio: Ocorrência, Usos e Contaminação de Ecossistemas Aquáticos.....	01
1.2 Mecanismos de Ação do Mercúrio.....	11
1.3 Considerações sobre as Espécies Estudadas.....	14
1.4 Justificativa.....	17
1.5 Objetivos.....	19

### **CAPÍTULO II: TOXICIDADE AGUDA DO MERCÚRIO INORGÂNICO (HgCl<sub>2</sub>) EM MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)**

<b>RESUMO</b> .....	21
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
2.1 Animais.....	23
2.2 Ensaio de Toxicidade Aguda (CL <sub>50</sub> 96 horas).....	23
2.2.1 Ensaio preliminar.....	23
2.2.2 Ensaio definitivo (CL <sub>50</sub> 96 horas).....	24
2.3 Determinação das Características Físicas e Químicas da Água.....	25
2.3.1 pH e alcalinidade.....	25
2.3.2 Dureza total.....	26
2.3.3 Nitrito.....	26
2.3.4 Cloreto.....	26
2.3.5 Amônia total.....	27
2.3.6 Oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura.....	27
2.4 Tratamento dos Rejeitos de Mercúrio.....	27
2.5 Tratamento Estatístico dos Dados.....	28
<b>3 RESULTADOS</b> .....	29
3.1 Ensaio preliminar.....	29
3.2 Ensaio definitivo (determinação da CL <sub>50</sub> 96 horas em sistema estático).....	31
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	38

**CAPÍTULO III: BIOCONCENTRAÇÃO E BIOMAGNIFICAÇÃO DO MERCÚRIO INORGÂNICO (HgCl<sub>2</sub>) EM MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) E EM TRAÍRA, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**

<b>RESUMO</b> .....	39
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
2.1 Animais.....	42
2.2 Desenho Experimental.....	42
2.2.1 Exposição aguda (96 h) de matrinxãs a concentração nominal e sub-letal de 0,15 mg.L <sup>-1</sup> de HgCl <sub>2</sub> (~1/5 da CL <sub>50</sub> 96 h).....	42
2.2.2 Exposição trófica (via alimento) e sub-crônica (30 dias) das traíras a uma dose sub-letal de Hg.....	45
2.3 Quantificação do Teor de Mercúrio Total.....	48
2.4 Quantificação do Teor de Metilmercúrio.....	50
2.5 Tratamento dos Rejeitos de Mercúrio.....	50
2.6 Tratamento Estatístico dos Dados.....	50
<b>3 RESULTADOS</b> .....	51
3.1 Parâmetros Físico-Químicos e Quantificação do Mercúrio Total na Água.....	51
3.2 Concentração de Mercúrio Total nos Peixes.....	53
3.2.1 Concentração de mercúrio total nos tecidos de matrinxã.....	53
3.2.2 Concentração de mercúrio total nos exemplares inteiros de matrinxã usados na alimentação das traíras.....	54
3.2.3 Avaliação da depuração de Hg nos exemplares de matrinxã usados na alimentação das traíras.....	55
3.2.4 Concentração de metilmercúrio nos exemplares de matrinxã usados na alimentação das traíras.....	56
3.2.5 Concentração de mercúrio total nos tecidos de traíra.....	56
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	67

**CAPÍTULO IV: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>) SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)**

<b>RESUMO</b> .....	68
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	69

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	73
2.1 Animais.....	73
2.2 Desenho Experimental.....	73
2.3 Coleta de Amostras.....	74
2.4 Procedimentos Bioquímicos.....	74
2.5 Parâmetros Bioquímicos.....	76
2.5.1 Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	76
2.5.1.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	76
2.5.1.2 Determinação da atividade da catalase (CAT).....	76
2.5.1.3 Determinação da atividade da glutaciona peroxidase selênio-dependente (Se-GPx).....	77
2.5.1.4 Determinação da atividade da glutaciona S-transferase (GST).....	77
2.5.1.5 Determinação da atividade da glutaciona redutase (GR).....	77
2.5.2 Análise de Antioxidantes Não-Enzimáticos.....	78
2.5.2.1 Glutaciona total (GSH <sub>t</sub> ).....	78
2.5.2.2 Glutaciona oxidada (GSSG).....	78
2.5.2.3 Determinação da glutaciona reduzida (GSH).....	79
2.5.2.4 Determinação dos níveis de metalotioneína (MT).....	79
2.5.3 Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica.....	80
2.5.3.1 Ensaio FOX.....	80
2.5.3.2 Ensaio TBARS.....	80
2.5.4 Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas.....	80
2.5.5 Determinação de Proteína Total.....	81
2.6 Tratamento estatístico dos dados.....	81
<b>3 RESULTADOS</b> .....	82
3.1 Alterações Comportamentais e Biometria.....	82
3.2 Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	82
3.3 Análise de Antioxidantes Não-Enzimáticos.....	85
3.4 Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica.....	89
3.5 Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas.....	90
3.6 Análise dos Níveis de Proteína Total.....	91
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	92
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	106

**CAPÍTULO V: EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR E SUB-CRÔNICA POR MERCÚRIO INORGÂNICO SOBRE A BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM TRAÍRA, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**

<b>RESUMO</b> .....	111
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	112
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	114
2.1 Animais.....	114
2.2 Desenho Experimental.....	114
2.3 Coleta de Amostras, Procedimentos e Parâmetros Bioquímicos e Tratamento Estatístico dos dados.....	114
<b>3 RESULTADOS</b> .....	115
3.1 Alterações Comportamentais e Biometria.....	115
3.2 Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	116
3.3 Análise de Antioxidantes Não-Enzimáticos.....	118
3.4 Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica.....	122
3.5 Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas.....	123
3.6 Análise dos Níveis de Proteína Total.....	124
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	125
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	145

**CAPÍTULO VI: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>) SOBRE A CONTRATILIDADE CARDÍACA DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)**

<b>RESUMO</b> .....	150
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	151
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	154
2.1 Animais.....	154
2.2 Desenho Experimental.....	154
2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais.....	154
2.3 Protocolos Experimentais.....	158
2.3.1 Efeito do tempo.....	158
2.3.2 Aumento da frequência de estimulação (relação força-freqüência).....	158
2.3.3 Tensão pós-reposo.....	159
2.3.4 Efeito da rianodina.....	160

2.4 Análise dos Resultados.....	161
2.4.1 Forma de apresentação dos dados.....	161
2.4.2 Tratamento estatístico dos dados.....	162
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>163</b>
3.1 Efeito do tempo.....	163
3.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequencia) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC).....	165
3.3 Tensão pós-reposo.....	177
3.4 Papel do RS.....	179
3.5 Massa ventricular relativa (MVR).....	181
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>182</b>
4.1 Efeito do tempo.....	182
4.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequencia) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC).....	189
4.3 Tensão pós-reposo.....	198
4.4 Papel do RS.....	205
4.5 Massa ventricular relativa (MVR).....	206
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>208</b>

***CAPÍTULO VII: EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR E SUB-CRÔNICA POR MERCÚRIO INORGÂNICO SOBRE A CONTRATILIDADE CARDÍACA DA TRAÍRA, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)***

<b>RESUMO.....</b>	<b>210</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>211</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>212</b>
2.1 Animais.....	212
2.2 Desenho Experimental.....	212
2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais, Protocolos Experimentais e Análise dos Resultados.....	212
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>213</b>
3.1 Efeito do tempo.....	213
3.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequencia) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC).....	215
3.3 Tensão pós-reposo.....	227
3.4 Papel do RS.....	229

3.5 Massa ventricular relativa (MVR).....	231
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>233</b>
4.1 Efeito do tempo.....	233
4.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequencia) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC).....	237
4.3 Tensão pós-reposo.....	242
4.4 Papel do RS.....	246
4.5 Massa ventricular relativa (MVR).....	247
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>249</b>

**CAPÍTULO VIII: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>) SOBRE A FUNÇÃO CÁRDIO-RESPIRATÓRIA DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)**

<b>RESUMO.....</b>	<b>251</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>252</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>254</b>
2.1 Animais.....	254
2.2 Desenho Experimental.....	254
2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais.....	254
2.4 Variáveis Ventilatórias.....	259
2.5 Variáveis Cardíacas.....	261
2.5 Tratamento Estatístico dos Dados.....	265
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>266</b>
3.1 Respostas Respiratórias.....	266
3.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).....	266
3.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ ).....	268
3.1.3 Extração de O <sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO <sub>2</sub> ) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ).....	271
3.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO).....	273
3.2 Caracterização Eletrocardiográfica.....	275



3.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ ).....	275
3.2.2 Análises eletrocardiográficas.....	276
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	286
4.1 Respostas Respiratórias.....	286
4.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).....	286
4.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ ).....	292
4.1.3 Extração de $O_2$ da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ).....	296
4.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO).....	298
3.2 Caracterização Eletrocardiográfica.....	301
4.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ ).....	301
4.2.2 Análises eletrocardiográficas.....	304
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	308

**CAPÍTULO IX: EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR E SUB-CRÔNICA POR MERCÚRIO INORGÂNICO SOBRE A FUNÇÃO CÁRDIO-RESPIRATÓRIA DA TRAÍRA, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**

<b>RESUMO</b> .....	311
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	312
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	314
2.1 Animais.....	314
2.2 Desenho Experimental.....	314
2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais.....	315
2.4 Tratamento Estatístico dos Dados.....	318
<b>3 RESULTADOS</b> .....	319
3.1 Respostas Respiratórias.....	319
3.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).....	319
3.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ ).....	321
3.1.3 Extração de $O_2$ da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ).....	324

3.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO).....	326
3.2 Caracterização Eletrocardiográfica.....	328
3.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ ).....	328
3.2.2 Análises eletrocardiográficas.....	329
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>338</b>
4.1 Respostas Respiratórias.....	338
4.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).....	338
4.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ ).....	343
4.1.3 Extração de $O_2$ da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).....	349
4.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO).....	351
3.2 Caracterização Eletrocardiográfica.....	353
4.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ ).....	353
4.2.2 Análises eletrocardiográficas.....	357
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>365</b>
<b>CAPÍTULO X: CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>367</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>369</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> - Transformações do mercúrio no ambiente aquático. Adaptado de Azevedo (2003).....	04
<b>Figura 2</b> - Esquema do ciclo do mercúrio no ambiente aquático (adaptado de Mercury in the Environment Fact Sheet 146-00 - <a href="http://www.usgs.gov/themes/factsheet/146-00/">http://www.usgs.gov/themes/factsheet/146-00/</a> ).....	05
<b>Figura 3</b> - <i>Brycon amazonicus</i> (SPIX & AGASSIZ, 1829).....	15
<b>Figura 4</b> - <i>Hoplias malabaricus</i> (BLOCH, 1794).....	17

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1:</b> Curva de porcentagem de mortalidade de matrinxã, <i>B. amazonicus</i> , em resposta a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) na água, mostrando o valor da $\text{CL}_{50}$ 96 horas ( $0,71 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{HgCl}_2$ ) e de seu intervalo de 95% de confiança ( $0,67$ a $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{HgCl}_2$ ) calculados pelo método de “Trimmed Spearman-Kärber”.....	32
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1:</b> Evolução temporal da concentração de Hg inorgânico na água durante a exposição de matrinxãs, <i>B. amazonicus</i> , por 96 horas, a $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{HgCl}_2$ . Os valores são médias $\pm$ E.P.M. de amostras de água ( $n = 3$ ) coletadas 4 e 96 horas de adição do $\text{HgCl}_2$ .....	52
<b>Figura 2:</b> Conteúdo de Hg total em alevinos de matrinxãs inteiros dos grupos controle (Ct) e exposto a $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{HgCl}_2$ por 96 horas ( $\text{HgCl}_2$ ) usados na alimentação das traíras dos grupos experimentais Ct e Hg. Valores são médias $\pm$ E.P.M ( $n = 6$ ).....	55
<b>Figura 3:</b> Depuração do Hg total em matrinxãs inteiros expostos durante 96 h a $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{HgCl}_2$ que permaneceram por mais 96 h em água limpa. Valores são médias $\pm$ E.P.M ( $n = 6$ ).....	56
<b>Figura 4</b> - Modelo proposto para a captação de mercúrio inorgânico em intestino de vertebrado. Adaptado de Hoyle & Handy (2005).....	63

## CAPÍTULO IV

- Figura 1** - Esquema representando os sistemas de defesa antioxidante (enzimático e não-enzimático) e os danos oxidativos (lipoperoxidação e oxidação protéica). Modificado de Fang et al. (2002)..... 70
- Figura 2** - Danos celulares resultantes das lesões oxidativas induzidas pelas ERO. Adaptado de Marks et al. (1996)..... 71
- Figura 3** - Níveis de metalotioneína (MT –  $\mu\text{g. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ , n = 10). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ )..... 88
- Figura 4** - Níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP –  $\text{nmol. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ , n = 10). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ )..... 89
- Figura 5** - Níveis de equivalentes de malondialdeído (MDA –  $\text{nmol. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ , n = 10). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ )..... 90
- Figura 6:** Níveis de proteína carbonilada (PC –  $\text{nmol. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ , n = 10). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ )..... 91
- Figura 7** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no fígado de matrinxã após 96 horas de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 107
- Figura 8** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas nas brânquias de matrinxã após 96 horas de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 108
- Figura 9** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no músculo branco de matrinxã após 96 horas de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 109
- Figura 10** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no coração de matrinxã após 96 horas de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 110

## CAPÍTULO V

- Figura 1:** Níveis de metalotioneína (MT –  $\mu\text{g. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ )..... 121
- Figura 2:** Níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ )..... 122
- Figura 3:** Níveis de equivalentes de malondialdeído (MDA – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ )..... 123
- Figura 4:** Níveis de proteína carbonilada (PC – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ )..... 124
- Figura 5** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no fígado de traíras alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostos por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 146
- Figura 6** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas nas brânquias de traíras alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostos por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 147
- Figura 7** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no músculo branco de traíras alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostos por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 148
- Figura 8** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no coração de traíras alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostos por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ ..... 149

## CAPÍTULO VI

- Figura 1** - Esquema da cubeta experimental: a. transdutor de força; b. fio de fixação e estiramento da preparação; c. argola metálica; d. tira ventricular; e. eletrodo de estimulação; f. entrada de mistura carbogênica; g. entrada de água para termostatar a cubeta; h. saída de água da cubeta..... 156
- Figura 2** - Equipamentos utilizados (“setup” experimental) para os experimentos in vitro no presente estudo: A: banho com quatro cubetas; B: banho termostatizado; C: cilindro de mistura carbogênica; D: estimuladores elétricos; E: transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; F: amplificador de força; G: sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados..... 156
- Figura 3** - Detalhes do set experimental (A) e dos registros de força de contração isométrica (B) e da cubeta com uma tira ventricular (C)..... 157
- Figura 4** - Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, na frequência de estimulação de 0,2 Hz ou 12 bpm..... 158
- Figura 5** - Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, em diferentes frequências de estimulação elétrica..... 159
- Figura 6** - Registros típicos da força de contração isométrica desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, após estabilização a 0,2 Hz e suas respectivas potenciações (setas) após pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 segundos..... 160
- Figura 5** - Variáveis medidas no registro de força de contração isométrica nos diferentes protocolos experimentais. Fc: força de contração isométrica; TPT: tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento; dFc/dT: taxa de contração; -dFc/dT: taxa de relaxamento; RT: tensão de repouso..... 162
- Figura 6** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração isométrica (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em D: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN..... 167

**Figura 7** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão isométrica (TPT - ms) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em D: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN..... 168

**Figura 8** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em D: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN..... 169

**Figura 9** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para o pico de tensão e a força de contração isométrica (TPT/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em D: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN..... 170

**Figura 10** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para 50% do relaxamento e a força de contração isométrica (THR/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em D: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN..... 171

**Figura 11** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a tensão de repouso ( $RT - mN.mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h ( $HgCl_2$ , n = 12) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em A: grupos Ct e  $HgCl_2$  e os efeitos do  $HgCl_2$  (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN e em D: grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN..... 172

**Figura 12** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de contração ( $dFc/dT - mN.mm^{-2}.ms^{-1}$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h ( $HgCl_2$ , n = 12) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em A: grupos Ct e  $HgCl_2$  e os efeitos do  $HgCl_2$  (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN e em D: grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN..... 174

**Figura 13** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de relaxamento ( $dFc/dT - mN.mm^{-2}.ms^{-1}$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h ( $HgCl_2$ , n = 12) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em A: grupos Ct e  $HgCl_2$  e os efeitos do  $HgCl_2$  (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN e em D: grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN..... 175

**Figura 14** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $mN.mm^{-2}.min^{-1}$ ) de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h ( $HgCl_2$ , n = 12) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em A: grupos Ct e  $HgCl_2$  e os efeitos do  $HgCl_2$  (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN e em D: grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN (para detalhes, ver capítulo VIII)..... 176



- Figura 15** - Valores da tensão isométrica ( $F_c$  - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 s desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 12$ ) e exposto a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ ,  $n = 12$ ) registrados na primeira contração após os períodos das pausas na ausência e na presença de  $10 \text{ }\mu\text{M}$  de rianodina. Em A: grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ ; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{HgCl}_2$ +RIAN e em D: grupos Ct+RIAN e  $\text{HgCl}_2$ +RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \*: indica diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa; #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ )..... 178
- Figura 16** – Contribuição relativa do retículo sarcoplasmático (RS) no desenvolvimento da força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN.mm}^{-2}$ ) e do índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $\text{mN.mm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ) em função da frequência de estimulação das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 12$ ) e exposto a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ ,  $n = 12$ ). Em A e D: grupos Ct e Ct+RIAN; em B e E: grupos  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{HgCl}_2$ +RIAN; em C e F: papel do RS nos grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ . Valores são médias  $\pm$  E.P.M.  $\odot^*$ : indica diferença significativa do papel do RS entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ )..... 180
- Figura 17.** Massa (g), comprimento (cm) e área de seção transversal (CSA -  $\text{mm}^2$ ) das tiras ventriculares e massa ventricular relativa (MVR - %) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 12$ ) e exposto a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ ,  $n = 12$ ). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$  ( $p < 0,05$ )..... 181
- Figura 18** – Esquema ilustrando o excesso da oxidação nos múltiplos grupamentos tióis (-SH) dos receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático o que leva a ativação irversível do canal e vazamento do  $\text{Ca}^{2+}$ . RS: retículo sarcoplasmático; RyR: receptor de rianodina do RS; SERCA:  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RS; LTCC: canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L da membrana plasmática; SOx: grupos tióis oxidados. Adaptado de Zimmet & Hare (2006)..... 202
- Figura 19** – Esquema evidenciando a alteração da atividade do trocador NCX através do intercâmbio tiol-dissulfeto pela modulação redox. P representa a proteína carreadora do trocador. Adaptado de Reeves et al. (1996)..... 205
- Figura 20** - Diagrama ilustrativo dos possíveis efeitos de 96 horas de exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  no acoplamento E-C (setas em vermelho) no miocárdio de matrinxã, *B. amazonicus* (Adaptado de BERS, 2002; 2008). As setas amarelas representam as alterações induzidas pelo  $\text{HgCl}_2$  nos parâmetros analisados..... 209

## CAPÍTULO VII

**Figura 1** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa. $\text{dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 217

**Figura 2** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão isométrica (TPT - ms) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa. $\text{dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 218

**Figura 3** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa. $\text{dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 219

**Figura 4** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para o pico de tensão e a força de contração isométrica (TPT/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 220

**Figura 5** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para 50% do relaxamento e a força de contração isométrica (THR/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 221

**Figura 6** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a tensão de repouso (RT - mN.mm<sup>-2</sup>) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 222

**Figura 7** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de contração (dFc/dT - mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 224

- Figura 8** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de relaxamento ( $dF_c/dT$  -  $mN.mm^{-2}.ms^{-1}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa.dia $^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 225
- Figura 9** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $mN.mm^{-2}.min^{-1}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa.dia $^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e Hg. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN. A seta branca em B representa a frequência cardíaca *in vivo* obtida para o grupo Ct. A seta preta em C representa a frequência cardíaca *in vivo* obtida para o grupo  $HgCl_2$  (para detalhes, ver capítulo VII)..... 226
- Figura 10** - Valores da tensão isométrica ( $F_c$  - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 s desenvolvida pelas tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa.dia $^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em A: grupos Ct e Hg; em B: grupos Ct e Ct+RIAN; em C: grupos Hg e Hg+RIAN e em D: grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa; #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ )..... 228
- Figura 11** - Contribuição relativa do retículo sarcoplasmático (RS) no desenvolvimento da força de contração isométrica ( $F_c$  -  $mN.mm^{-2}$ ) e no índice de capacidade de bombeamento de bombeamento cardíaco (CBC -  $mN.mm^{-2}.min^{-1}$ ) em função da frequência de estimulação das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa.dia $^{-1}$ ) Em A e D: grupos Ct e Ct+RIAN; em B e E: grupos Hg e Hg+RIAN; em C e F: papel do RS nos grupos Ct e Hg. Valores são médias  $\pm$  E.P.M.  $\odot^*$ : indica diferença significativa do papel do RS entre os grupos Ct e Hg ( $p < 0,05$ )..... 230

- Figura 12** - Massa (g), comprimento (cm), área de seção transversal (CSA – mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares e massa ventricular relativa (MVR - %) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa do papel do RS entre os grupos Ct e Hg (p < 0,05)..... 231
- Figura 13** – Contrações espontâneas exibidas pelas tiras ventriculares das traíras expostas troficamente ao Hg. Em A: contrações espontâneas nas tiras estimuladas a 0,2 Hz; em B: contrações espontâneas durante a pausa da estimulação elétrica indicada pela seta..... 232
- Figura 14** – Hiperatividade crônica de β-receptores levando a hiperfosforilação da serina 2809 do RyR2 pela PKA. Adaptado de Wehrens & Marks (2004)..... 237
- Figura 15** – Modelo explicando o aumento da corrente basal do canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L do miocárdio como resultado do estresse oxidativo. Adaptado de Hool (2007)..... 245
- Figura 16** - Diagrama ilustrativo dos possíveis efeitos da exposição trófica e sub-crônica (30 dias) ao HgCl<sub>2</sub> no acoplamento E-C (setas em vermelho) no miocárdio de traíra, *H. malabaricus* (Adaptado de BERS, 2002; 2008). As setas amarelas representam as alterações induzidas pelo HgCl<sub>2</sub> nos parâmetros analisados... 250

## CAPÍTULO VIII

- Figura 1** - Fotos mostrando em A: a posição de inserção dos cateteres de polietileno da boca e dos opérculos e, em B: os eletrodos de ECG positivo e negativo em matrinxã, *Brycon amazonicus*..... 255
- Figura 2** - Em A: Esquema mostrando a posição de inserção dos cateteres de polietileno e eletrodos de ECG para as medidas dos parâmetros cardio-respiratórios in vivo em matrinxã, *B. amazonicus*. Em B: Detalhe de um eletrodo de ECG e do cateter para medidas de PO<sub>2</sub>: a. ponta biselada de agulha hipodérmica cujo tamanho varia em função da distância entre a superfície corpórea e o coração do animal; b. pedaço de cateter com a extremidade flangeada; c. revestimento termo-retrátil; d. fixação do fio de cobre no interior da agulha; e. fio de cobre encapado; f. cateter de polietileno com a extremidade flangeada para a tomada de água; g. flange de fixação (adaptado de OLLE, 2007 e MARICONDI-MASSARI, 1993)..... 256

<b>Figura 3</b> - Esquema do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos in vivo. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro.....	257
<b>Figura 4</b> - Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias de <i>Brycon amazonicus</i> . A: respirômetro; B, C: cateteres de polietileno para tomada da água que entra ( $P_{in}O_2$ ) e que sai ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, respectivamente; D, E: cateteres de polietileno para tomada da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ), respectivamente; F, G: eletrodos cardíacos positivo e negativo; H: torneiras de 3 vias; I: transdutor de pressão MLT0380/D; J: cuvetas termostatzadas com eletrodos de $O_2$ FAC-001; K: analisadores de $O_2$ FAC-204A; L: amplificador de pressão ML 224; M: amplificador de ECG ML 136; N: sistema de aquisição de dados Powerlab 8/30; O: computador para o registro de dados; P: frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; Q: bomba para circulação de água; R: balde para circulação de água; S: termostato para manutenção da temperatura; T: entrada de quantidades controladas de $N_2$ ou ar comprimido. As setas indicam a direção do fluxo de água no sistema. (adaptado de MARICONDI-MASSARI, 1993).....	258
<b>Figura 5:</b> Esquema da duração da onda P.....	261
<b>Figura 6:</b> Esquema da duração do complexo QRS.....	261
<b>Figura 7:</b> Esquema da duração da onda T.....	262
<b>Figura 8:</b> Esquema da duração do intervalo R-R.....	262
<b>Figura 9:</b> Esquema da duração do intervalo P-R.....	262
<b>Figura 10:</b> Esquema da duração do intervalo Q-T.....	263
<b>Figura 11:</b> Esquema da duração do intervalo J-T.....	263
<b>Figura 12:</b> Esquema da duração do segmento S-T.....	263
<b>Figura 13:</b> Esquema da amplitude do complexo QRS.....	264
<b>Figura 14:</b> Esquema da amplitude do complexo QRS.....	264
<b>Figura 15:</b> Esquema da amplitude da onda T.....	264
<b>Figura 16</b> - (A) Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ - $mLO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ) de matrinxãs, <i>B. amazonicus</i> , do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a $0,15 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ de $HgCl_2$ por 96 horas ( $HgCl_2$ , n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. (B e C) Efeito da redução das tensões de $O_2$ da água inspirada ( $P_iO_2$ ) sobre a $\dot{V}O_2$ dos grupos Ct e $HgCl_2$ , respectivamente. Valores médios $\pm$ E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). As setas representam a $P_cO_2$ .....	267

- Figura 17** - (A) Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), (B) freqüência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e (C) ventilação total ( $V_T$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 270
- Figura 18** - (A) Extração de oxigênio (EO<sub>2</sub> - %) e (B) necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  - mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 272
- Figura 19** - (A) Pressão intra-bucal (PIB - mmHg) e (B) pressão intra-opercular (PIO - mmHg) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 274
- Figura 20** - Frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 275
- Figura 21** - (A) Registro eletrocardiográfico (onda P, complexo QRS e onda T) de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg); (B) Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> por 96 horas em normóxia (140 mmHg)..... 276
- Figura 22** - (A) Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg); (B) Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> por 96 horas em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg)..... 277
- Figura 23** - Traçado eletrocardiográfico exibido pelos exemplares de *B. amazonicus* do grupo controle (traçado contínuo) e do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> (traçado pontilhado) em normóxia. Como principais efeitos do HgCl<sub>2</sub> são mostrados: o aumento da duração do intervalo P-R e do segmento S-T e redução da duração da onda T..... 281
- Figura 24** - (A) Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo controle em hipóxia moderada (100 mmHg) e severa (20 mmHg); (B) Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> por 96 h em hipóxia moderada (100 mmHg) e severa (20 mmHg). As setas indicam as extra-sístoles. As estrelas representam despolarizações atriais sucessivas (ondas P) entre duas despolarizações ventriculares (complexos QRS)..... 282

- Figura 25** - Efeito da hipóxia sobre o tamanho do lábio de *B. amazonicus*. A foto A representa um peixe do grupo Ct em normóxia (140 mmHg) e a foto B um peixe do grupo Ct em hipóxia severa (20 mmHg). A seta indica o edema labial. 283
- Figura 26** - Esquema do desenvolvimento de toxicidade em peixes (adaptado de Moissenko, 2000)..... 291
- Figura 27** - Diagrama ilustrativo dos possíveis efeitos de 96 horas de exposição a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> no sistema cardio-respiratório de matrinxã, *B. amazonicus*..... 310

## CAPÍTULO IX

- Figura 1** - Fotos mostrando em A: a posição de inserção dos cateteres de polietileno da boca e dos opérculos e, em B: os eletrodos de ECG positivo e negativo em traíra, *Hoplias malabaricus*..... 315
- Figura 2** - Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias de *Hoplias malabaricus*. A: respirômetro; B, C: cateteres de polietileno para tomada da água que entra (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>) e que sai (P<sub>out</sub>O<sub>2</sub>) do respirômetro, respectivamente; D, E: cateteres de polietileno para tomada da água inspirada (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) e expirada (P<sub>e</sub>O<sub>2</sub>), respectivamente; F, G: eletrodos cardíacos positivo e negativo; H: torneiras de 3 vias; I: transdutor de pressão MLT0380/D; J: cuvetas termostatizadas com eletrodos de O<sub>2</sub> FAC-001; K: analisadores de O<sub>2</sub> FAC-204A; L: amplificador de pressão ML 224; M: amplificador de ECG ML 136; N: sistema de aquisição de dados Powerlab 8/30; O: computador para o registro de dados; P: frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; Q: bomba para circulação de água; R: balde para circulação de água; S: termostato para manutenção da temperatura; T: entrada de quantidades controladas de N<sub>2</sub> ou ar comprimido. As setas indicam a direção do fluxo de água no sistema. (adaptado de MARICONDI-MASSARI, 1993)..... 316
- Figura 3** - (A) Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$  - mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. (B, C) Efeito da redução das tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) sobre a  $\dot{V}O_2$  dos grupos Ct e Hg, respectivamente. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05). As setas representam a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>..... 320
- Figura 4** - (A) Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mL H<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), (B) frequência respiratória (f<sub>R</sub> - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e (C) ventilação total (V<sub>T</sub> - mL H<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 323



- Figura 5** - (A) Extração de oxigênio ( $EO_2$  - %) e (B) necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  - mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. (B') detalhe da necessidade ventilatória entre as tensões de O<sub>2</sub> de 140 a 60 mmHg. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 325
- Figura 6** - (A) Pressão intra-bucal (PIB - mmHg) e (B) pressão intra-opercular (PIO - mmHg) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 327
- Figura 7** - Frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05)..... 328
- Figura 8** - (A) Registro eletrocardiográfico (onda P, complexo QRS e onda T) de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg); (B) Registro eletrocardiográfico (onda P, complexo QRS e onda T) de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo exposto ao Hg em normóxia (140 mmHg)..... 329
- Figura 9** - (A) Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg); (B) Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo exposto ao Hg em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg)..... 330
- Figura 10** - Traçado eletrocardiográfico exibido pelos exemplares de *H. malabaricus* do grupo controle (traçado contínuo) e do grupo exposto ao Hg (traçado pontilhado) em normóxia. Como principais efeitos do Hg são mostrados: o aumento da duração da onda P e do intervalo P-R, aumento da duração e da amplitude do complexo QRS, aumento do segmento S-T e do intervalo Q-T e diminuição da duração e da amplitude da onda T..... 334
- Figura 11** - (A) Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg) e em hipóxia (10 mmHg); (B) Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo exposto ao Hg em normóxia (140 mmHg) e em hipóxia (10 mmHg)..... 335
- Figura 12** - Diagrama ilustrativo dos possíveis efeitos da exposição trófica e sub-crônica ao Hg no sistema cardio-respiratório de traíra, *H. malabaricus*..... 366

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Mortalidade cumulativa durante o ensaio preliminar no controle (n = 6) e nas diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub>) na água (n = 6) em 96 horas de exposição..... 29
- Tabela 2:** Características físico-químicas na água do grupo do controle e das diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub>) em 0 e em 96 horas de exposição durante o ensaio preliminar. --- não determinado, pois todos os peixes morreram antes das 96 horas de exposição..... 30
- Tabela 3:** Mortalidade cumulativa durante o no ensaio de toxicidade aguda em sistema estático (CL<sub>50</sub> 96 horas) do cloreto de mercúrio para o matrinxã, *Brycon amazonicus*. Valores são mortes observadas nas três réplicas realizadas para o controle (n = 10) e para cada concentração de HgCl<sub>2</sub> testada (n=10): 0,58; 0,70; 0,84; 1,00 e 1,20 mg.L<sup>-1</sup> ..... 31
- Tabela 4:** Características físico-químicas da água no grupo controle e nas diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,58; 0,70; 0,84; 1,0 e 1,2 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub>) testadas no Ensaio de Toxicidade Aguda (CL<sub>50</sub> 96 horas). Os valores são médias ± E.P.M. das quatro amostras de água coletadas a cada 24 horas de experimento..... 33
- Tabela 5:** Valores de CL<sub>50</sub> 96 horas do cloreto de mercúrio em mg.L<sup>-1</sup> para diferentes espécies de peixes juvenis descritos na literatura..... 36

### CAPÍTULO III

- Tabela 1:** Características físico-químicas e níveis de mercúrio total na água do grupo controle (Ct) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96h (HgCl<sub>2</sub>), medidas ao longo do período experimental. Os valores são médias ± E.P.M. das quatro amostras de água coletadas a cada 24 horas de experimento, com exceção da análise de mercúrio, onde amostras de água (n = 3) foram coletadas após 4 horas de adição do HgCl<sub>2</sub>..... 51
- Tabela 2:** Níveis de mercúrio total (mg.kg tecido<sup>-1</sup>) nos tecidos de matrinxãs dos grupos controle (Ct) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>)..... 53
- Tabela 3:** Fatores de bioconcentração do mercúrio (FBC) e seus logaritmos em fígado, brânquias, músculo branco e coração de matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas..... 54
- Tabela 4:** Níveis de mercúrio total (mg.kg tecido<sup>-1</sup>) nos tecidos das traíras alimentadas com matrinxãs controles (Ct) ou com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>)..... 57

**Tabela 5:** Fatores de transferência trófica (FTT) do mercúrio em fígado, brânquias, músculo branco e coração de traíras alimentadas com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). 57

## CAPÍTULO IV

**Tabela 1:** Valores médios ± E.P.M. dos parâmetros biométricos e índice hepático-somático (IHS) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 40) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 40). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 82

**Tabela 2:** Valores médios ± E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes no fígado dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 83

**Tabela 3:** Valores médios ± E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes nas brânquias dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 84

**Tabela 4:** Valores médios ± E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes no músculo branco dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 84

**Tabela 5:** Valores médios ± E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes no coração dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 6) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 6). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 85

**Tabela 6:** Valores médios ± E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no fígado dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 86

**Tabela 7:** Valores médios ± E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada nas brânquias dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 86

**Tabela 8:** Valores médios ± E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no músculo branco dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 87

- Tabela 9:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no coração dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 6) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 6). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 87
- Tabela 10:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos níveis proteína total nos tecidos dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 91

## CAPÍTULO V

- Tabela 1:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos parâmetros biométricos, índice hepático-somático (IHS) e fator de condição (FC) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 24) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 24) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 115
- Tabela 2:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes no fígado das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 116
- Tabela 3:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes nas brânquias das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 117
- Tabela 4:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes no músculo branco das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 117
- Tabela 5:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes no coração das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 6) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 6) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 118
- Tabela 6:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no fígado das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 118

- Tabela 7:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada nas brânquias das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 119
- Tabela 8:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no músculo branco das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 120
- Tabela 9:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no coração das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 6) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 6) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 120
- Tabela 10:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos níveis proteína total nos tecidos das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05)..... 124

## CAPÍTULO VI

- Tabela 1:** Valores absolutos da Fc e RT, do TPT e THR, das relações TPT/FC e THR/FC e das taxas dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus* do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 12 bpm, na ausência ou na presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN..... 164
- Tabela 2:** Valores médios de TPT, THR, dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus* do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) após pausas diastólicas variando de 10 a 300 s na ausência ou na presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN..... 179

## CAPÍTULO VII

- Tabela 1:** Valores absolutos da Fc e RT, do TPT e THR, das relações TPT/FC e THR/FC e das taxas dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas a 40 min de estimulação à frequência de 12 bpm, na ausência ou na presença de 10 µM de rianodina. Valores são médias ± E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e Hg # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 214
- Tabela 2:** Valores médios de TPT, THR, dFc/dT e -dFc/dT tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) após pausas diastólicas variando de 10 a 300 s na ausência e na presença de 10 µM de rianodina. Valores são médias ± E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e Hg. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN..... 229

## CAPÍTULO VIII

- Tabela 1:** Análises eletrocardiográficas de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg); #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais Ct e HgCl<sub>2</sub> (p < 0,05)..... 280
- Tabela 2:** Análise de variância ANOVA two-way das variáveis respiratórias e da frequência cardíaca de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da exposição ao HgCl<sub>2</sub>, ou nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> (p < 0,05)..... 284

**Tabela 3:** Análise de variância ANOVA two-way das análises eletrocardiográficas de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da exposição ao HgCl<sub>2</sub>, ou nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> (p < 0,05)..... 285

## CAPÍTULO IX

**Tabela 1:** Análises eletrocardiográficas de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg); #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais Ct e Hg (p < 0,05)..... 332

**Tabela 2:** Análise de variância ANOVA two-way das variáveis respiratórias e da frequência cardíaca de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da presença de Hg na dieta, ou nos grupos Ct e Hg, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e Hg (p < 0,05)..... 336

**Tabela 3:** Análise de variância ANOVA two-way das análises eletrocardiográficas de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da presença de Hg na dieta, ou nos grupos Ct e Hg, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e Hg (p < 0,05)..... 337

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\text{☿}$  = Símbolo alquímico do mercúrio

$\alpha_{\text{O}_2}$  = Coeficiente de solubilidade do oxigênio na água

**A<sub>APD</sub>** = Duração do potencial de ação atrial, intervalo P-R

**ACh** = Acetilcolina

**AChE** = Acetilcolinesterase

**CAT** = Catalase

**CBC** = Índice de capacidade de bombeamento cardíaco

**CHP** = Cumeno hidroperóxido

**Cis** = Cisteína

**CSA** = Área da seção transversal

**dF<sub>c</sub>/dT** = Derivada máxima da contração ou taxa de contração

**-dF<sub>c</sub>/dT** = Derivada máxima do relaxamento ou taxa de relaxamento

**ECG** = Eletrocardiograma

**EO<sub>2</sub>** = Extração de oxigênio obtida pela equação 
$$\text{EO}_2 = \frac{P_i\text{O}_2 - P_e\text{O}_2}{P_i\text{O}_2} \cdot 100$$

**ERO** = Espécies reativas de oxigênio

**FBC** = Fator de bioconcentração dado pela fórmula  $\{C_o/C_a\}$ , onde  $C_o$  é a concentração do composto no peixe e  $C_a$  é a concentração real do composto na água

**F<sub>c</sub>** = Força ou tensão isométrica de contração

**f<sub>H</sub>** = Frequência cardíaca

**FOX** = Ferrous oxidation-xylenol orange

**f<sub>R</sub>** = Frequência respiratória

**FTT** = Fator de transferência trófica dado pela fórmula  $\{C_n/C_{n-1}\}$ , onde,  $C_n$  são as concentrações de Hg nos tecidos do nível trófico superior e  $C_{n-1}$  são as concentrações no primeiro nível trófico inferior

**γ-Glu-CisSH** = Gama glutamil cisteína

**G6PDH** = Glicose 6-fosfato desidrogenase

**GCL** = Glutamato-cisteína ligase

**Gli** = Glicina

**GPx** = Glutathione peroxidase

**GR** = Glutathione reductase

**GSH** = Glutathione reduzida

**GSH<sub>eq</sub>** = Equivalentes de glutathione reduzida total obtidos pela fórmula  $\{GSH + 2 \cdot GSSG\}$

**GSH:GSSG** = Índice redox da glutathione dado pela razão  $\{(GSH - 2 \cdot GSSG)/GSSG\}$



**GSSG** = Glutathiona oxidada  
**GST** = Glutathiona S-transferase  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** = Peróxido de hidrogênio  
**Hg** = Mercúrio  
**HO<sup>•</sup>** = Radical hidroxil  
**HO<sub>2</sub><sup>•</sup>** = Radical hidroperoxil  
**HP** = Hidroperóxido de lipídio  
**IHS** = Índice hepático-somático  
**J-T** = Intervalo JT, repolarização ventricular  
**L** = Comprimento total  
**L<sup>•</sup>** = Radical lipídico  
**LH** = Ácido graxo poli-insaturado  
**LO<sup>•</sup>** = Radical alcoxil  
**LOH** = Álcool derivado de ácido graxo  
**LOO<sup>•</sup>** = Radical peroxil  
**LOOH** = Hidroperóxido orgânico  
**LPO** = Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica  
**MDA** = Malondialdeído  
**MeHg** = Metilmercúrio  
**MT** = Metalotioneína  
**MVR** = Massa ventricular relativa  
**NADP<sup>+</sup>** = Nicotinamida de adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)  
**NADPH** = Nicotinamida de adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
**NCX** = Trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
**O<sub>2</sub>** = Oxigênio molecular  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** = Radical superóxido ou ânion superóxido  
**P** = Onda P, despolarização atrial  
**P.A.** = Potencial de ação  
**PC** = Proteína carbonilada  
**P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>** = Tensão crítica de oxigênio  
**P<sub>e</sub>O<sub>2</sub>** = Tensão de oxigênio da água expirada pelo animal  
**PIB** = Pressão intra-bucal  
**P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>** = Tensão de oxigênio da água de entrada do respirômetro  
**PIO** = Pressão intra-opercular  
**P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>** = Tensão de oxigênio da água inspirada pelo animal  
**PKC** = Proteína quinase C

**P<sub>out</sub>O<sub>2</sub>** = Tensão de oxigênio da água de saída do respirômetro

**P-R** = Intervalo PR, tempo de condução átrio-ventricular

**P<sub>w</sub>O<sub>2</sub>** = Pressão parcial do oxigênio na água

**QRS** = Complexo QRS, despolarização ventricular

**Q-T** = Intervalo QT, despolarização e repolarização do ventrículo

**R\*** = Radical

**R** = Não-radical

**R5P** = Ciclo das pentoses fosfato

**R-R** = Intervalo RR, variabilidade cardíaca

**RS** = Retículo sarcoplasmático

**RT** = Tensão de repouso

**RyR** = Receptor de rianodina

**Se** = Selênio

**SERCA** = Ca<sup>2+</sup> - ATPase do retículo sarcoplasmático

**-SH** = Radical sulfidrílico

**SOD** = Superóxido dismutase

**S-T** = Segmento ST, platô do potencial de ação ventricular

**T** = Onda T, repolarização ventricular

**TBARS** = Thiobarbituric acid-reactive substances

**THR** = Tempo para 50% do relaxamento

**THR/Fc** = Razão entre tempo para o pico de força e força de contração

**TPT** = Tempo para o pico de tensão

**TPT/Fc** = Razão entre tempo para 50% do relaxamento e a força de contração

**Ṡ<sub>G</sub>** = Ventilação branquial dada pela equação 
$$\dot{V}_G = \frac{(P_{in}O_2 - P_{out}O_2 / P_iO_2 - P_eO_2) \cdot V_R}{W_T}$$

**Ṡ<sub>G</sub> / Ṡ<sub>O<sub>2</sub></sub>** = Necessidade ventilatória, quociente entre ventilação branquial e taxa metabólica

**Ṡ<sub>O<sub>2</sub></sub>** = Taxa metabólica dada pela fórmula 
$$\dot{V}O_2 = \frac{(P_{in}O_2 - P_{out}O_2) \cdot \alpha_{O_2} \cdot V_R}{W_T}$$

**V<sub>R</sub>** = Fluxo de água através do respirômetro

**V<sub>T</sub>** = Volume ventilatório obtido pelo quociente  $\dot{V}_G / f_R$

**W<sub>T</sub>** = Massa corpórea

# CAPÍTULO I

## Introdução Geral



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Mercúrio: Ocorrência, Usos e Contaminação de Ecossistemas Aquáticos

Sexta substância química mais tóxica em um universo de seis milhões, o mercúrio ainda não foi totalmente desvendado pela ciência e continua sendo lançado em grandes quantidades na natureza por atividades humanas (DAHER et al., 1999). Avaliar os riscos ecotoxicológicos, conhecer os reais danos e compreender os riscos para a saúde animal e para a vida aquática e empregar instrumentos eficientes de prevenção e recuperação de áreas já degradadas são algumas das lacunas a serem preenchidas.

O mercúrio (Hg) está presente naturalmente nos diversos compartimentos ambientais (atmosfera, solo e água), em pequenas concentrações, nas formas inorgânicas e orgânicas, em estado dissolvido e particulado e igualmente na fase líquida e gasosa. Dentre as formas inorgânicas destacam-se os sais de mercúrio como o sulfeto de mercúrio, o óxido de mercúrio e o cloreto de mercúrio, entre outros. Os compostos onde o Hg encontra-se ligado covalentemente ao carbono são denominados formas orgânicas alquiladas ou organomercuriais, como o dimetilmercúrio, fenilmercúrio, etilmercúrio e metilmercúrio (SILVA, 2006).

O símbolo moderno do mercúrio encontrado na tabela periódica, Hg, é derivado do nome grego **Hidrargyrium**, o qual significa prata líquida, sendo este o único metal no estado líquido à temperatura ambiente. O Hg é utilizado pelo homem desde a Pré-História como pigmento de coloração vermelha intensa, na forma do mineral cinábrio (HgS), usado nas pinturas faciais e nas pinturas das paredes das cavernas e dos objetos de argila (AZEVEDO, 2003). O cinábrio, utilizado pelos hindus e chineses na Antiguidade, foi encontrado em tumbas do Egito datadas de antes de 1500 a.C. e admite-se que tanto o Hg quanto o cinábrio começaram a ser extraídos de minas há mais de 2300 anos (GRAEME & POLLOCK, 1998). Durante a Idade Média, o Hg já era utilizado em processos de amalgamação (formação de ligas, geralmente com prata e com ouro), mas seu principal papel foi de dominar o mundo da alquimia e, por ser um metal prateado líquido, tinha um significado mágico, representado graficamente pelo símbolo alquímico ☿ (FARIA, 2003). Do século XVI até o século XIX, o mercúrio e seus compostos foram ainda empregados na tentativa de cura de várias doenças como no tratamento da sífilis, em pomadas para massagens cutâneas, no tratamento da obstrução intestinal ou ainda como anti-séptico (AZEVEDO, 2003).

O Hg foi a primeira entidade química a ser objeto de legislação para controle de intoxicações causadas em trabalhadores. A história das questões legais em relação à exposição ao mercúrio remonta ao ano de 1700, na Itália, quando moradores da Vila de Finale moveram ação judicial contra uma fábrica de cloreto de mercúrio, cujas emanações tinham intoxicado

numerosos cidadãos (RAMADE, 1977). Segundo Azevedo (2003), o hidrargirismo ou mercurialismo (intoxicação crônica por mercúrio), a mais antiga das doenças profissionais conhecidas, foi descrito por Pope em 1665.

No século XX aparece o Mal de Minamata, conjunto de sintomas e sinais de intoxicação grave derivada da exposição da população de pescadores da cidade japonesa de Minamata que, ao se alimentar de peixes e outros frutos do mar que continham elevados teores de metilmercúrio, passou a desenvolver vários sintomas. Uma fábrica de acetaldeído e de cloreto de vinila usava o mercúrio como elemento catalisador em seu processo de produção, entre 1920 e 1968. Os resíduos de mercúrio eram despejados no estuário que desembocava na Baía de Minamata. Infelizmente, apesar dos sintomas de intoxicação mercurial já terem sido detectados em 1956 naquela população, a fábrica continuou despejando os resíduos contendo mercúrio até 1968, o que resultou num total de 150 toneladas do produto despejadas na área. Nos anos 60 e 70, os médicos da região foram constatando um número cada vez maior de efeitos tóxicos em pessoas contaminadas, principalmente nos filhos de mães que ingeriram peixes e frutos do mar da região: ataxia, deterioração da fala, constrição do campo visual, dificuldades auditivas, alterações sensoriais, deficiência mental e paralisia mental (AZEVEDO, 2003). Até 1997, mais de 40 anos após a descoberta oficial do problema, o número de vítimas fatais já havia chegado a 887, sendo que mais 2200 casos da "Doença de Minamata" tinham sido registrados (LACERDA, 1997; MICARONI et al., 2000).

De acordo com revisão feita por Bisinoti & Jardim (2004), na década de 70, no Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala ocorreram vários casos de contaminação de agricultores e seus familiares, que utilizavam grãos tratados com fungicidas à base de metil e etilmercúrio na confecção de pão caseiro. No caso particular do Iraque, mais de 6.900 pessoas foram hospitalizadas e pelo menos 459 morreram. Em 1997, a pesquisadora americana Karen Wetterhahn da Universidade de Dartmouth morreu contaminada, alguns meses após duas gotas de dimetilmercúrio puro terem atravessado as suas luvas de látex durante experimento usando o composto. A literatura apresenta vários casos de contaminação que vão desde a quebra de termômetros, passando por contaminações em garimpos na região norte do Brasil e até a contaminação de lagos e rios por atividades industriais, principalmente de indústrias de cloro-álcali. Um dos casos mais recentes ocorreu em Sorocaba-SP no ano de 2001, na Rede Ferroviária Federal S.A., quando um vazamento de mercúrio contaminou 10 adolescentes com idades entre 13 e 17 anos. O Hg metálico era proveniente de um reator elétrico desativado, avariado por saqueadores de sucata de cobre (NASCIMENTO & CHASIN, 2001).

Apesar dos inúmeros e lamentáveis acidentes de intoxicação por Hg e do conhecimento de seus efeitos nocivos para a saúde humana e de outros animais, o metal ainda apresenta ampla aplicação nas áreas de garimpagem para extração de ouro e no setor

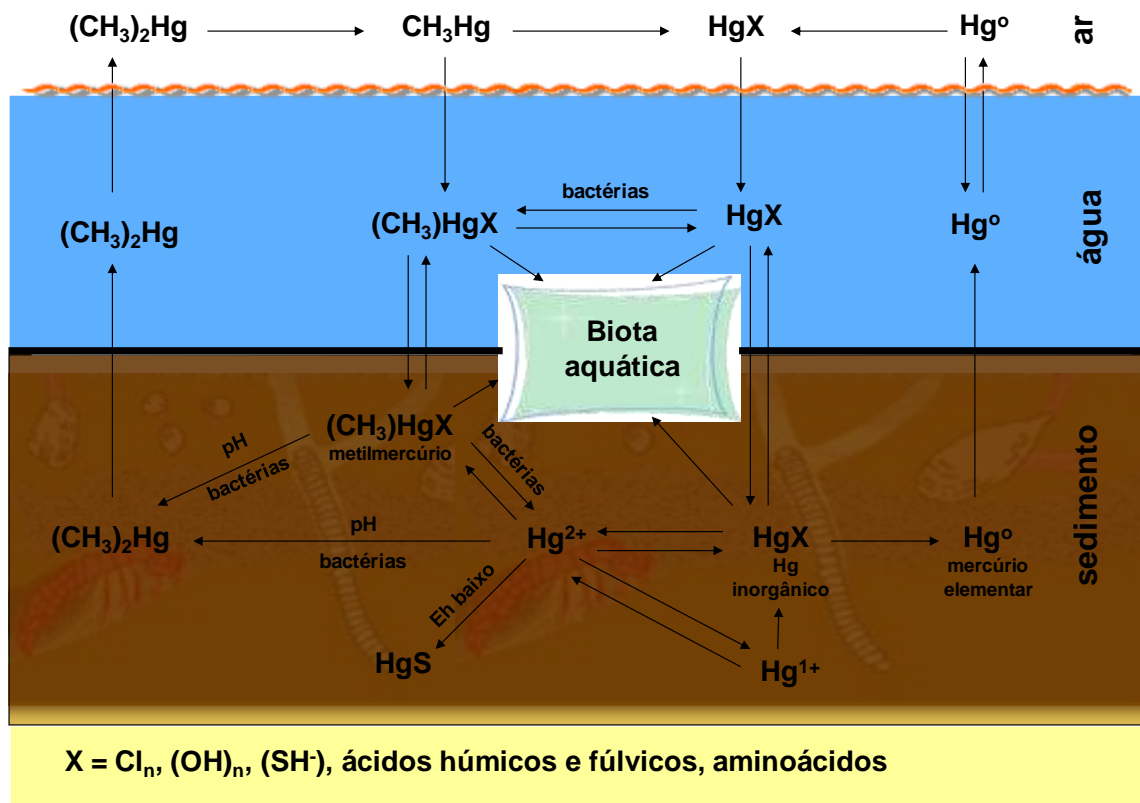
industrial e pode facilmente atingir os ecossistemas aquáticos constituindo séria ameaça por sua toxicidade, longa persistência, bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. Do Hg encontrado na água, uma parte é de origem natural, outra é resultante da atividade antropogênica. De acordo com a WHO (1991), as fontes naturais reconhecidas são desgaseificação da crosta terrestre, intemperismo e erosões, emissões de vulcões, a evaporação de corpos aquáticos, degradação de minerais e incêndios florestais. Já o aporte antropogênico do Hg ocorre pela atividade de indústrias que queimam combustíveis fósseis (petróleo e carvão), pela amalgamação de mercúrio em extração de ouro (garimpos) e pelo lançamento dos rejeitos das indústrias de produção de cloro-soda, pisos e revestimentos cerâmicos, equipamentos elétricos e eletrônicos, papel e celulose, tintas, pesticidas, fungicidas e lâmpadas fluorescentes. Dessa forma, a entrada do Hg nos corpos d'água ocorre devido à contaminação antropogênica direta ou da deposição vinda da atmosfera para superfície.

A distribuição das diversas espécies de Hg que entram no sistema aquático é regulada por processos físicos, químicos e biológicos, os quais ocorrem nas interfaces ar/água e água/sedimento (MICARONI et al., 2000). Nos sistemas aquáticos e na forma inorgânica, o mercúrio pode ser encontrado sob três diferentes estados de oxidação: o Hg elementar ( $Hg^0$ ), o qual se encontra principalmente na forma de gás, o íon mercurioso ( $Hg_2^{2+}$ ), forma pouco estável em sistemas aquáticos naturais, e o íon mercúrico ( $Hg^{2+}$ ), forma dominante em águas naturais (LACERDA et al., 2007). Na superfície da água, o  $Hg^{2+}$  pode se complexar com a hidroxila ( $HgOH^+$ ,  $Hg(OH)_2$ ,  $Hg(OH)_3^-$ ) e/ou com íons cloreto ( $HgCl^+$ ,  $HgClOH$ ,  $HgCl_2$ ,  $HgCl_4^{2-}$ ), dependendo do pH e da concentração de cloreto. Na forma orgânica o metilmercúrio ( $CH_3Hg^+$ ) e o dimetilmercúrio ( $(CH_3)_2Hg$ ) são os mais comuns (AZEVEDO, 2003). Entretanto, em qualquer ambiente aquático, somente pequena porção do Hg total existe como  $CH_3Hg^+$ , geralmente menos que 0,1%. O Hg está, na sua maior parte, disponível na forma inorgânica (WATRAS et al., 1998). Em águas, de um modo geral, há predominância da forma oxidada, divalente, que pode ou não estar associada a ligantes orgânicos ou inorgânicos (MARINS et al., 2002).

Segundo a literatura os organismos aquáticos apresentam elevada capacidade de absorver os compostos de mercúrio, quer sejam de origem orgânica ou inorgânica (BISINOTI & JARDIM, 2004). Ikingura & Akagi (1999) demonstraram que, para peixes de aquário expostos ao mercúrio inorgânico ( $HgCl_2$ ), o coeficiente de partição ( $K_{fw}$ ) peixe-água foi de 5000-7000. No entanto, quando ocorreu produção de metilmercúrio na água este coeficiente foi de 10000-22000. Isto indica que o mecanismo pelo qual os peixes acumulam a forma metilada difere daquele observado para mercúrio inorgânico, embora a bioconcentração ocorra nos dois casos.

A disponibilidade do mercúrio nos sistemas aquáticos é governada pelos fluxos entre compartimentos e as transformações naturais que podem sofrer as diferentes formas químicas mercuriais presentes nestes compartimentos. Cada forma apresenta potencial tóxico

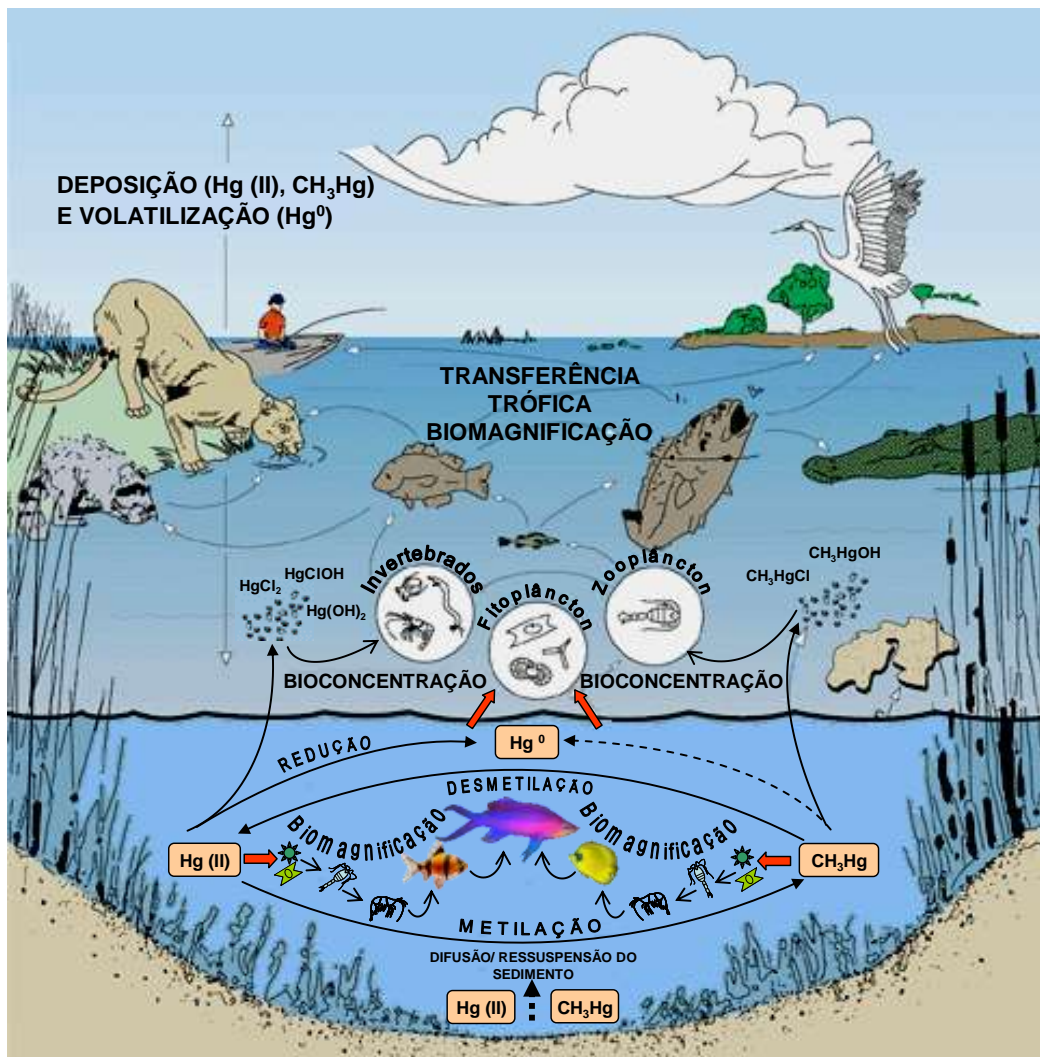
bem diferenciado podendo, inclusive, ocorrer interconversão entre elas. A Figura 1 mostra as complexas inter-relações e transformações do mercúrio no ambiente aquático.



**Figura 1** - Transformações do mercúrio no ambiente aquático. Adaptado de Azevedo (2003).

A complexidade da química do Hg deve-se ao fato desse elemento formar vários complexos iônicos solúveis, com variados graus de estabilidade, e à possibilidade da existência de vários estados de oxidação. Além disso, outro fator agravante é que o íon mercúrico é capaz de formar muitos complexos estáveis com importantes moléculas biológicas. Uma vez na água, o Hg iônico pode formar grande quantidade de complexos quelantes com o material orgânico, aderindo-se assim a partículas em suspensão ou do sedimento (MUCCI et al., 1995; AZEVEDO, 2003). Todos estes processos revelam-se primordiais por alterarem as propriedades físico-químicas do Hg e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade (SILVA, 2006).

Nos ecossistemas aquáticos as formas metiladas do Hg são consideradas as mais tóxicas, podendo ser facilmente incorporadas pela biota. A metilação ocorre, principalmente, nos dois centímetros superiores do sedimento, pois é nessa camada que se encontra a maioria da população microbiana responsável pela síntese do metilmercúrio (MeHg) (AZEVEDO, 2003). A Figura 2 mostra o ciclo do mercúrio no ambiente aquático.



**Figura 2** - Esquema do ciclo do mercúrio no ambiente aquático (adaptado de Mercury in the Environment Fact Sheet 146-00 – <http://www.usgs.gov/themes/factsheet/146-00/>).

A metilação do mercúrio favorece a inclusão do mesmo na cadeia alimentar aquática. Várias hipóteses de como e onde a metilação ocorre têm sido propostas (WHO, 1990). As principais são: a. metilação biológica por bactérias que produzem MeHg; b. metilação por microorganismos associados ao muco branquial ou ao intestino dos peixes; c. metilação no fígado de peixes. Segundo Bisogni & Lawrence, (1973, *apud* WHO, 1989), o mono MeHg é o produto predominante da metilação biológica, em pH neutro. Em condições aeróbicas, o processo de metilação é maior do que sob condições anaeróbicas, sendo que a liberação de MeHg dobra a cada aumento de 10 vezes do mercúrio inorgânico. Além disso, o processo de metilação aumenta com a temperatura e o crescimento biológico. Assim, ao subirmos na cadeia trófica, não apenas a concentração de mercúrio aumenta (biomagnificação), mas também ocorre a transformação em MeHg, o que aumenta ainda mais o potencial de contaminação por mercúrio.



Os organismos planctônicos são capazes de acumular altas concentrações de mercúrio e, dessa forma, constituem uma via importante de introdução do Hg nas cadeias alimentares (NASCIMENTO et al., 2007). Os peixes captam e acumulam o mercúrio da água e do alimento principalmente sob a forma de MeHg. O MeHg, composto lipossolúvel, é estável na maior parte dos organismos e é capaz de atravessar facilmente a barreira sangue-sistema nervoso central (SNC) bem como as membranas celulares (ASCHNER, 2002). Dessa maneira, a formação de espécies alquiladas via metilação, aumenta a biodisponibilidade do Hg e sua bioamplificação nas cadeias tróficas.

Inicialmente considerado um problema agudo e local, a poluição pelo Hg é atualmente entendida como global, difusa e crônica. Apesar do declínio na produção global, a produção e as emissões de mercúrio na América do Sul aumentaram acentuadamente na última década. O Brasil apresenta uma estimativa anual de uso e emissão de mercúrio (Hg) de aproximadamente 185,3 toneladas (ACPO, 2006), sendo os aportes de Hg nos ecossistemas aquáticos são oriundos principalmente das atividades associadas ao garimpo do ouro e das descargas de efluentes industriais, sendo relevantes as das indústrias de cloro-soda.

Nos processos de produção de ouro, o Hg, sob a forma metálica, é utilizado para formar um amálgama para recuperação do ouro de granulação fina. Em seguida, este amálgama é queimado, via de regra ao ar livre, e o mercúrio é liberado para a atmosfera na forma de vapor, restando o ouro (SANTOS et al., 2003). O excesso do mercúrio líquido e o vapor resultante da queima do amálgama depositam-se nos rios e lagos da região e, por intermédio da cadeia biológica, contaminam os peixes (CÂMARA & COREY, 1992; SANTOS et al., 1995). Assim, áreas onde o garimpo é uma atividade economicamente importante, como na Amazônia e no Pantanal Mato-Grossense, são potencialmente sujeitas a contaminação pelo metal. Na Amazônia, a corrida pelo ouro teria acarretado contaminação por cerca de mil toneladas de mercúrio, apenas no lado brasileiro, nos últimos 10 anos, ou seja, 100 toneladas por ano (AZEVEDO, 2003).

De acordo com revisão feita por Santos et al. (2003), até a segunda metade da década de 70, a lavra garimpeira na Amazônia era exclusivamente manual e se localizava tradicionalmente nas planícies de inundação dos cursos d'água, nos paleo-aluviões e, mais raramente, em aluviões ativos, e o mercúrio só era usado na concentração final do minério. A partir daí, o trabalho passa a ser desenvolvido com o auxílio de maquinário que retira o capeamento do solo através de desmonte hidráulico, utilizando um conjunto de moto-bomba. Agora, o mercúrio (azougue), além de ser usado na caixa concentradora, é lançado diretamente nos barrancos. Em alguns locais como nos rios Madeira e Tapajós, onde a garimpagem é igualmente feita no próprio leito ativo das drenagens, com a utilização de balsas e dragas, a agressão ao ecossistema aquático é mais grave e o assoreamento do rio mais rápido. Na Amazônia, nos últimos 10 anos, a corrida pelo ouro teria acarretado contaminação por cerca de

mil toneladas de Hg, apenas no lado brasileiro, sendo que para 1 g de ouro produzido, aproximadamente 2 g de Hg são utilizados, dos quais 50% são introduzidos nos rios pelos efluentes (AZEVEDO, 2003).

Em decorrência do elevado uso do Hg na amalgação do ouro, a maioria dos estudos sobre a contaminação por Hg em ambientes dulciaquícolas brasileiros foi realizada em áreas de garimpo. De acordo com Padberg (1990, *apud* BIDONE et al., 1997), a concentração total de Hg nas águas do rio Tapajós é menor que  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  e segundo Fadini & Jardim (2001) no rio Negro é menor que  $7,5 \text{ ng.L}^{-1}$  sendo que apenas 10 % da concentração total está sob a forma de MeHg. Cabe ressaltar que de acordo com a literatura, os valores basais de Hg total em águas de rios e lagos não afetados por poluição variam de 2 a  $5 \text{ ng.L}^{-1}$  (MASON et al., 1994; WATRAS et al., 1995). A Resolução CONAMA 357/05 estabelece que o limite máximo de mercúrio total permitido para águas das Classes I e II, destinadas á conservação da vida aquática, é de  $200 \text{ ng.L}^{-1}$  e a Organização Mundial da Saúde (OMS) fixou em  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  o limite máximo de Hg que pode ser encontrado em peixes para o consumo humano. Contudo, Bidone et al. (1997) encontraram concentrações superiores a  $0,6 \text{ mg.Kg}^{-1}$  em espécies carnívoras dessa região, como por exemplo, a traíra (*Hoplias* sp.) e o peixe-cachorro (*Hydrolycus scomberoides*), concentrações essas que excedem o limite máximo permitido pela OMS. Dessa forma, os baixos níveis de Hg na água contrastam com os teores elevados encontrados na biota, o que sugere eficientes mecanismos de transferência dos compartimentos abióticos para os bióticos.

Por outro lado, Pfeiffer et al (1989) observaram que, na região de mineração de Rondônia, as concentrações nas águas de rios tributários de florestas variavam de 100 a  $8.600 \text{ ng.L}^{-1}$  e no sedimento atingiam  $19.800.000 \text{ ng.L}^{-1}$ . Nas partes comestíveis dos peixes desses rios a concentração de mercúrio alcançava até  $2,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . Vieira (1991) analisou o teor de mercúrio total no tecido muscular em amostras de peixe-cachorro, traíra, piranha e cachara capturados no Rio Bento, na região do Pantanal, outra importante área de garimpo de ouro no Brasil, e encontrou valores da ordem de 2,29; 7,92; 10,25 e  $12,78 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso úmido, respectivamente. Hylander et al. (1994) determinaram teores de mercúrio total entre  $0,09 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (min.) e  $0,51 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (max.) em pintado e piranha capturados nas localidades do Pantanal de Santo Antônio, Barão de Melgaço, Porto Jofre, Porto Conceição, Rosário Oeste, Porto Cercado e Pixaim.

Dessa maneira, altas concentrações de Hg podem ser encontradas nos ecossistemas aquáticos, apesar da maioria dos estudos conduzidos com o objetivo de avaliar níveis de Hg total em rios retratarem níveis que vão de 1,3 a  $42,7 \text{ ng.L}^{-1}$ , conforme revisão feita por TOMAZELLI (2003). Isso pode ocorrer em parte devido ao efeito da diluição, uma vez que as amostras foram analisadas ao longo dos rios e, em parte, pelo fenômeno de adsorção do metal aos sedimentos.

Durante muito tempo, a contaminação por mercúrio no Brasil foi atribuída

exclusivamente aos garimpos de ouro, porém, estudos mais recentes na região indicam cada vez mais a possibilidade de origens múltiplas. Muito menos conhecidas, porém não menos perigosas, são as fontes industriais de mercúrio. As bacias do estado de São Paulo vêm sofrendo, nas últimas décadas, um crescente impacto da contaminação do mercúrio proveniente dessas fontes industriais. Indústrias de equipamentos elétricos e eletrônicos, tintas, cloro-álcali, cerâmica, acetaldeído e cloreto de vinila, entre outras, utilizam mercúrio e diversos metais em suas linhas de produção e acabam lançando parte deles nos cursos de água. Como fontes de emissão de mercúrio para o ambiente, destacam-se os efluentes líquidos, ricos no íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) (CETEM, 2006). O emprego do metal em vários processos industriais acarreta perdas significativas para o ambiente (MAURO et al., 1999).

Embora o mercúrio orgânico ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ) seja considerado a forma mais tóxica do metal, o mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) é a forma mais comum liberada nos ecossistemas aquáticos por indústrias sendo capaz de se acumular nos organismos ao longo da cadeia alimentar, biomagnificando-se (AZEVEDO et al., 2009). Segundo relatório da ACPO (2006), até os anos 80, as indústrias de cloro-soda não realizavam tratamento de seus efluentes, lançando estes resíduos com altas concentrações de Hg inorgânico na rede pública de esgotos ou nos rios próximos. Informações dão conta que em 1975, apenas uma empresa, a Carbocloro, chegou a consumir 440 g de Hg por tonelada de cloro produzido. Desta forma, estima-se que somente naquele ano foram perdidas cerca de 40 toneladas do metal. Esse tipo de processo (células de Hg) produz uma soda mais barata, mas provoca uma perda muito grande de Hg para o ambiente acarretando vários problemas ambientais que se refletem na saúde pública e ocupacional. Nos anos de 2000 e 2001, foram transportados, em caminhões, da cidade de Cubatão-SP para um aterro industrial na cidade de São José dos Campos-SP, cerca de 3.000 toneladas de resíduos altamente contaminados com Hg, uma operação que colocou em risco fontes e áreas de preservação ambiental.

Ainda de acordo com os dados da ACPO, no ano de 2004, uma empresa de reciclagem de mercúrio em Paulínia, região de Campinas, que recebia resíduos de uma importante indústria de cloro-álcali do Estado de São Paulo, foi obrigada a abandonar a destilação destes resíduos, depois que foi constatada a contaminação dos ambientes no entorno da empresa. Foram detectados até  $1.352 \text{ ng/m}^3$  de mercúrio no ar do ambiente bem próximo de uma escola de educação fundamental e também em outros pontos do entorno da empresa de reciclagem para onde também era destinada grande quantidade de lâmpadas fluorescentes. A contaminação se alastrou de tal maneira que os trabalhadores da empresa em questão também foram afetados pelo mercúrio. A empresa de cloro-soda que anteriormente destina seus resíduos para esta empresa de reciclagem que fechou destinou, no ano de 2006, para a cidade de Belford Roxo-RJ, uma carga de 60.000 quilos de lama contaminada com até 6% de mercúrio de seu processo de fabricação de cloro-soda, ou seja, cerca de 3.600 quilos de mercúrio sem qualquer

tipo de tratamento. O que antes era destilado e recuperado deixou de receber qualquer tipo de tecnologia, aferindo uma periculosidade ainda maior aos resíduos e ao risco no seu transporte.

As informações acima apresentadas, além de demonstrar a incapacidade das empresas de cloro-soda em gerenciar corretamente seus resíduos de mercúrio, também deixam claro que há necessidade de monitoramento das empresas recicladoras e das que oferecem serviços de armazenagem (aterros) de resíduos ricos em mercúrio.

A legislação brasileira específica quanto ao uso de Hg por parte das indústrias de cloro-soda no Brasil é extremamente parcial e dada às dificuldades nacionais de fiscalização devido à falta de estrutura e manutenção de ultrapassados limites de exposição e padrões de emissão. Assim, a lei não protege nem a qualidade ambiental e tampouco a saúde da população. Seus termos impedem que novas indústrias deste ramo se instalem com a tecnologia de células de mercúrio (o que já é um pequeno avanço), porém tendenciosamente garante o funcionamento daquelas que já faziam uso de tal tecnologia obsoleta, contraproducente e poluente, implicando na garantia legal de continuidade das importações oficiais de Hg para este setor. Embora tal legislação não tenha obtido total regulamentação, não existe outra norma federal que possa substituí-la nesse momento (BRASIL, 2000).

Outra fonte importante de contaminação no mercúrio no Brasil provém das lâmpadas fluorescentes. Aquelas de 40 Watts (tamanho médio, se considerarmos os demais modelos) apresentam cerca de 20 mg de mercúrio em seu interior. O Brasil fabrica algo em torno de 80 milhões de lâmpadas fluorescentes por ano, conforme dados levantados junto à ABILUX - Associação Brasileira da Indústria de Iluminação (ACPO, 2006). Segundo estudos da ABILUX, o Brasil importa anualmente cerca de 300 toneladas de Hg metálico por ano. Desta quantidade, aproximadamente 1,1 tonelada é utilizada na fabricação de lâmpadas fluorescentes e mistas, de todos os modelos encontrados no mercado. Esta mesma associação indica que a fabricação de lâmpadas no Brasil corresponde ao número de lâmpadas queimadas e quebradas anualmente. Assim, como a maioria de lâmpadas queimadas e quebradas ainda não conta com uma coleta seletiva em nível nacional, quando são descartadas pelos domicílios e estabelecimentos do comércio, seguem para “lixões” e aterros, sendo uma parcela mínima reciclada. Portanto, só em termos de lâmpadas fluorescentes, temos uma estimativa de emissão de 1,1 tonelada de Hg/ano no Brasil. A falta de uma regulamentação rigorosa e eficaz faz de todo processo: indústria, comércio, distribuição, uso e descarte de lâmpadas um mercado extremamente perigoso que coloca em risco a saúde das pessoas que as manuseiam diariamente.

Devido ao seu elevado uso industrial na produção de cloro, soda cáustica, equipamentos elétricos e eletrônicos, tinta látex, amálgamas dentárias, fungicidas, herbicidas, lâmpadas de mercúrio, entre outros, o mercúrio inorgânico tem grande importância na exposição ocupacional e na poluição ambiental (BROUSSARD et al., 2002). Em ecossistemas aquáticos

próximos a sítios com extensa atividade industrial, a concentração de Hg total detectada na água atinge  $0,23 \text{ mg.L}^{-1}$  (ALINNOR, 2005; BOLLEN et al., 2008) e as concentrações de Hg encontradas em pescados coletados de áreas contaminadas, excedem o nível crítico de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  permitido para o consumo humano pela Organização Mundial de Saúde (ALHO & VIEIRA, 1997).

Pela existência dessas múltiplas fontes de contaminação por Hg acima mencionadas, níveis de Hg, antes inexistentes, vêm sendo relatados em diversos rios como Mogi-Guaçu ( $< 3,5 - 8,6 \text{ ng.L}^{-1}$ , TOMAZELLI, 2003; TAVARES et al., 2003); Piracicaba ( $< 3,5 - 17,5 \text{ ng.L}^{-1}$ , TOMAZELLI, 2003; PIRACENA, 1998) e Rio do Peixe ( $< 3,5 - 24,4 \text{ ng.L}^{-1}$ , TOMAZELLI, 2003). Dados da CETESB (2002) demonstraram que, em algumas amostras de água do rio Mogi-Guaçu, as concentrações de Hg encontradas no ano de 2001 estavam em desacordo com a resolução CONAMA 357/05, que estabelece  $200 \text{ ng.L}^{-1}$  como o limite máximo permitido de Hg para águas classe 2 (ou seja, águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional). Outros rios das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Tietê, Piracicaba e Paranapanema também mostraram resultados desconformes em relação aos padrões legais de qualidade referentes ao mercúrio, conforme os Relatórios de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo feitos pela CETESB (CETESB, 1998, 1999, 2001).

O relatório da CETESB referente ao ano de 2006 mostra que determinados pontos dos Rios Jundiá, Ribeirão Lageado, Tietê, Mogi-Guaçu e do Peixe exibem níveis de mercúrio em suas águas superiores aos valores máximos permitidos pela Resolução CONAMA 357/05 (CETESB, 2007). Em relação aos teores de mercúrio nos sedimentos, o mesmo relatório aponta para altíssimos valores de mercúrio nos sedimentos do Reservatório Billings e Rio Grande ( $0,85$  e  $2,21 \text{ mg.kg}^{-1}$ , respectivamente). E se for considerado o valor de  $12 \text{ ng.L}^{-1}$ , estabelecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1985), como o limite máximo permissível para a proteção da vida aquática, a situação dos rios do estado de São Paulo torna-se ainda mais preocupante. Além disso, a relevância de tais dados aumenta ainda mais se for levado em consideração que grande parte destes rios está sobre o aquífero Guarani e o mercúrio é um metal que pode facilmente atingir as águas subterrâneas. BOLLEN et al. (2008) mostraram que o aquífero, localizado a 11 metros de profundidade, abaixo de fontes potenciais de lançamento de cloreto de mercúrio, apresentou valores de mercúrio total de até  $230 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Muitos dos córregos que desembocam nas bacias dos rios Mogi-Guaçu e Piracicaba ficam próximos a importantes pólos cerâmicos como Mogi-Guaçu, Porto Ferreira, Santa Gertrudes e Cordeirópolis. Um dos grandes problemas das indústrias cerâmicas é o grande volume de rejeito após o processamento dos insumos minerais que são utilizados nos seus processos industriais. A isso se soma também, o grande consumo de água, tanto na elaboração das massas cerâmicas, como na lavagem industrial. Nesse sentido, OLIVEIRA & FILHO (2003), analisando amostras de águas superficiais e subterrâneas (de poços profundos) de áreas

próximas às fábricas de cerâmica, observaram que os resíduos lançados nessas águas apresentavam em torno de  $8,35 \text{ mg.L}^{-1}$  de mercúrio, teor acima do permitido no material solubilizado e na massa bruta.

As formas inorgânicas do Hg, apesar de não apresentarem um caráter lipofílico como o MeHg, são absorvidas da água pelos peixes (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 1996; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2000, ELIA et al., 2003). Há evidências de que os vários transportadores de membranas, presentes nas brânquias e no intestino, responsáveis pela captação de metais essenciais para a saúde dos peixes, apresentem um caráter promíscuo, podendo atuar no transporte de metais pesados como o mercúrio (BURY et al., 2003; FOULKES, 2000; ZALUPS, 1998). Ou ainda, complexos inorgânicos hidrofóbicos como  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{HgCLOH}$  e  $\text{Hg(OH)}_2$  podem ser captados por difusão passiva ou transporte facilitado através da membrana (BLACK et al., 2007; GOLDING et al., 2002). OLIVEIRA-RIBEIRO et al. (2000) desenvolveram bioensaios, sob condições controladas, para estudar a distribuição e acumulação do mercúrio inorgânico nos tecidos do peixe-gato tropical *Trichomycterus zonatus* e da espécie nórdica de salmão *Salvelinus alpinus*. O trabalho revelou que a exposição por 96 horas a  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  de mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) provoca danos pronunciados na espécie tropical *T. zonatus* em comparação com a espécie de região de clima temperado. A espécie *T. zonatus* apresentou severos danos branquiais e altos níveis de bioacumulação de mercúrio em órgãos vitais como os rins, o fígado e as brânquias, sendo a espécie mais sensível frente à exposição ao Hg inorgânico.

Vale destacar que, além da contaminação proveniente de atividades humanas, nos peixes cultivados a contaminação por Hg ainda pode ocorrer através da farinha de peixe utilizada na formulação de rações na proporção de até 20%. Johnston & Savage (1991) encontraram níveis de 0,02 a  $7,70 \text{ mg.Kg}^{-1}$  em silagem e farinha de peixe.

## 1.2 Mecanismos de Ação do Mercúrio

O mercúrio é tóxico para vários órgãos. Os seus efeitos deletérios são devidos à liberação de íons que favorecem a precipitação de proteínas, sendo altamente tóxicos para as células (CLARKSON, 1968, 1972 a, b; FELTON et al., 1972; FRIBERG & VOSTAL, 1972). Os compostos mercuriais desnaturam proteínas, inativam enzimas e rompem membranas celulares (BRUBAKER et al., 1973; LUCIER et al., 1973; BRYAN et al., 1974; SOUTHARD et al., 1974; SHAMOO & MAC LENAM, 1975; FOWLER, 1978; STARA & DRAHOTA, 1978). Na membrana celular seu efeito é geralmente irreversível, devido à sua forte ligação aos radicais sulfidrilas (-SH). Conseqüentemente, ele reduz a atividade de enzimas tais como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em vários

tecidos (CHÁNEZ et al., 1989; ANNER et al., 1992). Essa enzima tem um papel importante nas funções neuronais, na manutenção do gradiente eletroquímico de sódio e potássio transmembrana e no controle de captação e liberação de neurotransmissores em nível pré-sináptico (SCHWARTZ, 1972; SCHURMANS-STEKHOVENS & BONTING, 1981; ANNER, 1985).

No miocárdio, também foi observada uma inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sarcolemal, o que diretamente favorece um aumento na força de contração (HALBACH et al., 1981; OLIVEIRA et al., 1994). A redução da atividade dessa enzima pelo Hg, em baixas concentrações, pode aumentar a concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular, o que diminui a eficácia do mecanismo de troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (VASSALO et al., 1990). Essa redução no gradiente transsarcolemal de  $\text{Na}^+$  reduziria a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ , elevando sua concentração intracitoplasmática, favorecendo o aumento da força de contração em corações isolados de ratos (OLIVEIRA & VASSALO, 1992). Além de reduzir a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, o mercúrio ainda deprime a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, interferindo na captação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) cardíaco (AHAMMAD-SAHIB et al., 1988; REDDY et al., 1988; HECHENBERG & BEYERSMANN, 1991; HALBACH et al., 1981), e dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  que se abrem na dependência de radicais -SH, facilitando a sua penetração no sarcoplasma (ABRAMSON & SALAMA, 1989).

O mercúrio afeta ainda outras enzimas que exercem funções importantes no sistema cardiovascular, tal como a enzima conversora de angiotensina (ECA), que tem sua atividade reduzida pela ação do  $\text{Hg}^{2+}$ . AMARAL et al. (1996) investigaram a possível ligação entre a queda de pressão arterial e a inibição da ECA e mostram que após a injeção de mercúrio, o efeito hipertensivo ocasionado pela angiotensina I foi reduzido, sugerindo que o  $\text{Hg}^{2+}$  inibe a atividade da ECA. SU & CHEN (1979) avaliaram os efeitos do dióxido de mercúrio ( $\text{MeHg}$ ) sobre a frequência do nódulo sino-atrial e a tensão isométrica do átrio esquerdo e músculo papilar de ratos estimulados eletricamente. Observaram que baixas doses (0,5 a 2 ppm) foram capazes de aumentar a frequência de disparo e diminuir a tensão isométrica do átrio direito isolado. Já em altas doses (> 2 ppm), ambos os parâmetros acima foram reduzidos. Os autores também verificaram dilatação e edema de mitocôndrias e RS e, ocasionalmente, depósito de material amorfo na mitocôndria e degeneração das fibras do miocárdio.

Além disso, esse metal é conhecido por suas propriedades pró-oxidantes. A contaminação aquática é citada como um dos principais responsáveis pelo estabelecimento do estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos organismos expostos (AHMAD et al., 2000; SILVA et al., 1999) tais como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), entre outros, que podem reagir com macromoléculas biológicas suscetíveis e causar peroxidação lipídica (LPO), danos no DNA e oxidação de proteínas, resultando em estresse oxidativo (LIVINGSTONE et al., 1993; NORDBERG & ARNÉR, 2001; SHI et al., 2005). O estresse oxidativo celular é um fenômeno

biológico que leva a perdas funcionais, gerando o envelhecimento dos tecidos, desencadeando patologias de caráter crônico-degenerativo. O acúmulo de metais nos tecidos pode potencializar esse mecanismo (PASCALICCHIO, 2002).

Em condições fisiológicas normais, os efeitos prejudiciais das ERO são efetivamente neutralizados por sistemas de defesas antioxidantes do organismo. Há dois tipos de defesas antioxidantes: (1) as defesas enzimáticas, conferidas por enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx); a glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) e a catalase (CAT); (2) defesas não-enzimáticas, exemplificadas pela ação do sistema glutathione - reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), da vitamina E, entre outras (HALLIWELL, 1996). Tais sistemas antioxidantes são os biomarcadores mais frequentemente utilizados na avaliação toxicológica (DOYOTTE et al., 1997; ORUÇ et al., 2004). Estes biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde dos ecossistemas aquáticos e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental de países desenvolvidos (WALKER et al., 1996).

Em ratos, o MeHg tem papel importante como mediador do estresse oxidativo, ativando proteínas quinases, causando distúrbios no metabolismo mitocondrial do músculo esquelético, induzindo a diminuição dos níveis de enzimas como a citocromo c oxidase e a succinato desidrogenase (USUKI et al., 2001). Em mamíferos, o mercúrio é capaz de induzir um estresse oxidativo via produção de  $H_2O_2$ , diminuição dos níveis de glutathione reduzida e causando peroxidação lipídica (STOHS & BAGCHI, 1995). A produção de ERO, em condições fisiológicas normais, está em equilíbrio com a ação desses sistemas de defesas. Na diminuição desses sistemas, no excesso da produção de ERO, ou na conjugação das duas situações, o meio celular fica sujeito ao estresse oxidativo (BIESALSKI, 2000).

Uma vez estabelecido o estresse oxidativo, as ERO podem produzir danos, como a peroxidação de lipídios insaturados das membranas celulares, oxidação de proteínas e danos oxidativos ao DNA. A lipoperoxidação é o evento citotóxico primário desencadeado pela ação das ERO, uma reação em cadeia que se propaga continuamente, resultando em transtornos de permeabilidade, alteração do fluxo iônico e de outras substâncias, perda de seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes levando à destruição e morte celular (HOGG & KALYANARAMAN, 1998). A oxidação de proteínas e DNA pode fazer com que estas biomoléculas percam total ou parcialmente sua função, o que por sua vez, pode afetar o metabolismo celular. A oxidação do DNA pode provocar quebra da dupla fita e modificações de bases nitrogenadas, o que pode acarretar processos mutagênicos e carcinogênicos (SIES, 1986; LIVINGSTONE, 2001).

As ERO também estão associadas a lesões oxidativas dos miócitos e disfunções no miocárdio. O aumento da produção das ERO no tecido cardíaco como resultado de lesões isquêmicas ou xenobióticas levam a alterações bioquímicas que incluem diminuição na atividade



das ATPases da sarcolema, responsáveis pela manutenção das concentrações de íons intracelulares e modificações na permeabilidade da membrana, como resultado dos processos oxidativos como a peroxidação lipídica (TAYLOR & SHAPPEL, 1995). Vários estudos feitos com corações de ratos, usando o modelo de isquemia-reperfusão, mostraram que as ERO geradas durante estes processos reduziram a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e esse efeito foi inibido em vários graus pela administração de SOD e de CAT (BURTON et al., 1984; YTREHUS et al., 1986; JACKSON et al., 1986; KIM & AKERA, 1987).

As enzimas da sarcolema podem ser inibidas em decorrência da peroxidação lipídica, pois a diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase foi acompanhada por um concomitante aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) (KIM & AKERA, 1987). KRAMER et al. (1984) verificaram que miócitos de cães adultos expostos a um sistema produtor de radicais livres mostraram perda de atividade enzimática da sarcolema, juntamente com aumentos na peroxidação lipídica medidos pela formação de MDA. Além disso, a destruição peroxidativa das membranas celulares compromete a função dos miócitos através de um aumento geral na permeabilidade de íons como o sódio, devido à perda da integridade da dupla camada de fosfolipídios da membrana (TAYLOR & SHAPPEL, 1995).

### 1.3 Considerações sobre as Espécies Estudadas

O matrinxã, *Brycon amazonicus*, (Figura 3) é uma espécie migratória nativa das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins (HOWES, 1982). Apresenta crescimento rápido podendo atingir massa de até 5 kg e a maturação sexual ocorre em torno dos 3 anos de idade. Possui hábito alimentar onívoro, o que lhe confere mais uma vantagem em sua utilização em sistemas de cultivo, pois aceita vários tipos de fontes alimentares (VAL & HONCZARYK, 1995). É uma espécie migratória, ou de piracema, e sua reprodução em ambiente natural ocorre no início do período de enchente, entre dezembro e fevereiro.

Os lagos de várzea e as florestas alagadas são as áreas de criação das larvas e alevinos desta espécie que completam o seu desenvolvimento aproveitando eficientemente o alimento disponível (frutos, sementes, flores, zooplâncton, restos de peixes e insetos) (PIZANGO-PAIMA, 1997; LEITE, 2004). É uma espécie reofílica que prefere águas limpas e bem oxigenadas de igarapés, onde passa boa parte do seu ciclo de vida crescendo e desenvolvendo suas gônadas, para depois descer até o encontro das águas dos rios Solimões e Negro para desovar (ZANIBONI FILHO, 1985; VILLACORTA CORREA, 1987).

Essa espécie possui grande interesse comercial devido a excelente qualidade da

carne, o rápido crescimento, fácil aceitação de rações comerciais e pela grande esportividade na pesca sendo, por isso, um peixe muito utilizado e procurado em sistemas de cultivo do tipo "pesque e pague" (SCORVO FILHO et al., 1998). Dessa forma, são muito importantes comercialmente e encontram-se entre os peixes de escama mais esportivos da Amazônia (VAL & HONCZARIK, 1995).



**Figura 3:** *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

Segundo BRITSKI (1972), o matrinxã ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Sub-classe: ACTINOPTERYGI

Superordem: OSTARIOPHYSI

Ordem: CHARACIFORMES

Família: CHARACIDAE

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

O matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) anteriormente foi catalogado como *B. cephalus* (GÜNTHER, 1869). A espécie foi descrita com ampla distribuição em toda a bacia Amazônica, Prata e São Francisco (GOULDING, 1981). Entretanto, em revisão

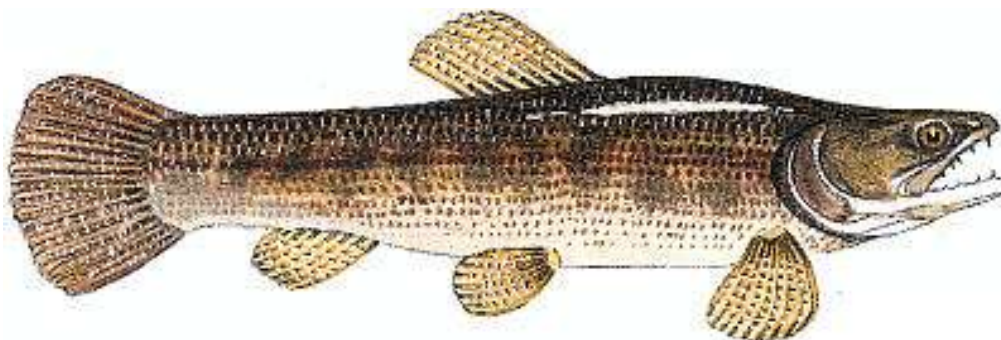
recente, LIMA (2003) constatou que a espécie *Brycon cephalus* somente ocorre no alto rio Amazonas no Peru e na Bolívia e que a espécie restrita às bacias Amazônica e Araguaí-Tocantins é a *Brycon amazonicus*. Devido à ausência de consenso por parte dos pesquisadores e das publicações, ambas as denominações da espécie, ou seja, *B. cephalus* e *B. amazonicus*, vêm sendo utilizadas como sinônimos.

A traíra, *Hoplias malabaricus*, (Figura 4) é uma espécie tipicamente neotropical, encontrada em ambientes lóticos, e principalmente lênticos, dos sistemas hidrográficos da América do Sul (FOWLER, 1950). No Brasil, a espécie ocorre nas bacias do Amazonas, São Francisco, Paraíba, Paranaíba, Doce, Paraná (incluindo o Rio Mogi-Guaçu) e nos grandes e pequenos açudes do Nordeste (LEITÃO, 1947; PAIVA, 1972; GODOY, 1975).

A espécie chega a atingir 40 cm de comprimento e no estágio adulto possui hábitos sedentários, apresentando preferência por ambientes lênticos (BARBIERI et al., 1994), especialmente em corpos d'água com pequenas profundidades e com vegetação abundante (PAIVA, 1972). Na fase larval esta espécie é planctófaga e na fase de alevino é um insetívoro voraz (AZEVEDO & GOMES, 1943). Entretanto, no estágio adulto, sua dieta é composta exclusiva ou predominantemente por pequenos peixes. É considerado um predador crepuscular-noturno, que se alimenta através da predação de emboscada (PAIVA, 1972). Geralmente fica à espreita de presas como peixes, sapos e insetos, sendo mais ativa durante a noite. É facilmente utilizado como fonte alimentar por aves piscívoras e também por mamíferos, incluindo o homem (BARROS et al., 2007).

Devido ao fato da traíra ocupar níveis tróficos superiores da cadeia alimentar e de que alguns trabalhos com esta espécie mostram uma intensa bioacumulação de metais pesados, incluindo o Hg (PFEIFFER et al., 1989; BRADO et al., 2000), esta tem se mostrado um excelente bioindicador de poluição ambiental nesses ecossistemas.

Adicionalmente, devido às suas inúmeras adaptações fisiológicas, *H. malabaricus* é capaz de resistir a altas temperaturas, baixa disponibilidade de oxigênio e longos períodos de jejum (RIOS, 2001; RIOS et al., 2002). A espécie apresenta baixo metabolismo aeróbico, ampla ventilação branquial, alta afinidade hemoglobina-oxigênio, alta capacidade anaeróbica e extensa área de superfície respiratória (DRIEDZIC et al., 1978; KALININ et al., 1993; RANTIN et al., 1993; FERNANDES et al., 1993). Por ser uma espécie altamente resistente e que exhibe grande plasticidade ecológica, torna-se um modelo biológico interessante para o estudo da exposição a xenobióticos por via trófica.



**Figura 4:** *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)

Segundo BRITSKI (1972), a traíra ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Sub-classe: ACTINOPTERYGI

Superordem: OSTARIOPHYSI

Ordem: CHARACIFORMES

Família: ERYTHRINIDAE

Gênero: *Hoplias*

Espécie: *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)

#### 1.4 Justificativa

A contaminação do ambiente por inúmeros poluentes como os metais é produto da sociedade altamente industrializada. O mercúrio é um dos metais tóxicos de maior risco ambiental e ocupacional. O Departamento Nacional de Produção Mineral estima que cerca de 1.200 toneladas de Hg foram descarregadas na Amazônia durante a década de 80 (GONÇALVES et al., 1999). Nos últimos 15 anos, cerca de 1.500 a 3.000 toneladas de Hg foram usados na extração de ouro na Amazônia (FARIA, 2003). Além disso, as bacias do estado de São Paulo vêm sofrendo contaminações crescentes de mercúrio proveniente de fontes industriais como fábricas de cerâmica, cloro-soda, papel e celulose, que são fontes de liberação de Hg menos conhecidas, porém não menos perigosas (AZEVEDO, 2003).

Em decorrência dos fatores mencionados e dada à relevância do crescente impacto do mercúrio nos ecossistemas aquáticos brasileiros, é de fundamental importância que se conheça os efeitos desse metal em organismos aquáticos, principalmente em peixes tropicais,

cujas informações sobre efeitos de xenobióticos disponíveis na literatura são escassas, dada ao grande diversidade de espécies e o número proporcionalmente restrito de pesquisadores que se dedicam a tais estudos. Uma das principais finalidades da ecotoxicologia é avaliar os riscos ecológicos o que, pela complexidade e diversidade dos sistemas naturais, é ainda uma tarefa difícil. Um novo paradigma e também desafio da ecotoxicologia é a identificação de "alvos ecológicos" - elementos ou sinais-chaves que traduzam os processos de controle e suas alterações no ecossistema em risco. Embora estes "alvos" possam diferir entre os ecossistemas, uma vez identificados, a condição de normalidade pode ser avaliada por qualquer tipo de resposta biológica, seja ao nível bioquímico celular, orgânico, de populações ou de comunidades. Um outro paradigma é a mudança na abordagem dos problemas ecológicos, que antes visavam reparar danos e/ou restaurar vida e hoje visam, sobretudo, proteger/preservar o ecossistema. Nesta óptica de preservação, e por estarem relacionados às respostas primárias das células aos impactos recebidos do meio, os biomarcadores (bioquímicos e fisiológicos) são vistos como instrumentos eficientes de prevenção de avaliação de riscos ecológicos.

A capacidade de prever os efeitos dos poluentes sobre os organismos e de extrapolar os efeitos tóxicos encontrados em laboratório para populações e comunidades naturais vem se tornando um fator de grande interesse e importância. Para tanto, indicadores biológicos podem ajudar na identificação de problemas ambientais antes que a saúde dos sistemas aquáticos se torne seriamente alterada (Jimenez & Stegeman 1990). A utilização de biomarcadores fisiológicos permite identificar possíveis distúrbios homeostáticos que possam comprometer a sobrevivência do organismo avaliando os possíveis efeitos subletais dos poluentes. Venturino et al. (2003) enfatizam que a utilização de diversos biomarcadores com múltiplos "endpoints" é necessária para relacionar a exposição à resposta, fornecendo, desta forma, ferramentas mais preditivas e úteis para a proteção dos ambientes ocupados por populações de anuros ameaçadas.

Uma vez que o Hg atinge os ecossistemas aquáticos principalmente na forma inorgânica, há um grande interesse no processo de como ocorre a metilação e bioacumulação em níveis tróficos mais elevados (HILL et al., 1996) e se o Hg inorgânico precisa ser necessariamente metilado para que os processos de bioconcentração e biomagnificação ocorram. Adicionalmente, o conhecimento dos efeitos dos contaminantes e os mecanismos pelos quais são absorvidos e biomagnificados nas cadeias alimentares é de fundamental importância na avaliação de risco ambiental e em estudos de biodisponibilidade química (GOBAS et al., 1999).

No Brasil, a maior parte dos estudos de contaminação por mercúrio em ambientes de água doce se concentra na quantificação do metal em águas, sedimentos e/ou em tecidos de peixes. Os efeitos do mercúrio sobre os biomarcadores do estresse oxidativo e as funções cardíaca e respiratória em peixes ainda não são bem estudados e na literatura há poucos dados

disponíveis sobre os efeitos do mercúrio em peixes, ainda mais se tratando de peixes de ambientes tropicais freqüentemente sujeitos a contaminação por mercúrio, ao que se propôs o presente estudo. Dessa forma, é necessário o investimento em estudos que visam esclarecer e entender os mecanismos de ação do mercúrio em peixes, na tentativa de elucidar lacunas ainda não preenchidas a respeito dos potenciais danos deste metal sobre a ictiofauna e, conseqüentemente, fornecer subsídios para sua preservação.

## 1.5 Objetivos

Dada sua toxicidade e capacidade de bioacumulação, o mercúrio freqüentemente oferece um alto risco ecotoxicológico para os organismos aquáticos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos:

1. Determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>-96 horas) do cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) para o matrinxã, *Brycon amazonicus*.

A partir de uma concentração sub-letal e ambientalmente relevante escolhida tanto a partir do valor obtido para a CL<sub>50</sub>-96 horas como dos dados disponíveis na literatura sobre a concentração desse metal encontrada em águas brasileiras, estabelecer dois grupos experimentais de matrinxãs - grupo controle e grupo exposto a uma concentração sub-letal de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas - para:

2. Avaliar a distribuição do mercúrio no coração, brânquias, fígado e músculo através da determinação das concentrações de mercúrio total. Estimar fatores de bioconcentração (razão entre a concentração de mercúrio nos tecidos e a concentração de exposição) para os diferentes tecidos;

3. Analisar de biomarcadores do estresse oxidativo no coração, brânquias, fígado e músculo branco: antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutathione peroxidase - GPx, glutathione S-transferase - GST e glutathione redutase - GR); antioxidantes não-enzimáticos (glutathione reduzida - GSH, glutathione oxidada - GSSG e glutathione total - GSH+GSSG); peroxidação lipídica (níveis de cumeno hidroperóxido - CHP e de malondialdeído - MDA) e oxidação protéica (níveis de proteína carbonilada);

4. Avaliar as respostas cárdio-respiratórias *in vivo* em condições normóxicas e durante a hipóxia gradual determinando os seguintes parâmetros: taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ), tensão

crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ), ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ), volume ventilatório ( $V_T$ ), extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ), necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), pressões intra-bucal (PIB) e intra-opercular (PIO), frequência cardíaca ( $f_H$ ) e componentes do eletrocardiograma (ondas P e T, complexo QRS, segmento S-T e intervalos P-R, R-R, Q-T e J-T);

5. Avaliar os efeitos do  $HgCl_2$  sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração (E-C) de tiras ventriculares estimuladas eletricamente *in vitro*, ao longo de um período máximo de 40 minutos, a uma frequência sub-fisiológica de 0,2 Hz ou 12 bpm, determinando os seguintes parâmetros: força de contração isométrica (Fc), tensão de repouso (RT) e parâmetros tempo-dependentes como tempos para o pico máximo de tensão - TPT e para 50% de relaxamento - THR, taxas de contração ( $dFc/dT_{Max}$ ) e relaxamento ( $-dFc/dT_{Min}$ );

6. Analisar os possíveis efeitos do aumento da taxa de estimulação sobre as respostas inotrópicas e cronotrópicas das tiras ventriculares tanto dos animais controle quanto dos intoxicados, e relacionar esses resultados com o acoplamento excitação-contração, além de comparar as taxas atingidas *in vitro* com a frequência cardíaca observada *in vivo*;

7. Determinar indiretamente a importância do retículo sarcoplasmático (RS) como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil, através da análise da potenciação da Fc pós-repouso e dos parâmetros tempo-dependentes após pausas diastólicas não fisiológicas de 10, 30, 60 e 300 segundos na presença ou ausência de rianodina (bloqueador dos canais de cálcio do RS) verificando também um possível efeito do  $HgCl_2$  sobre a função desta organela. Avaliar também, na presença da rianodina, o efeito do tempo experimental e do aumento da taxa de estimulação sobre as respostas inotrópicas e cronotrópicas das tiras ventriculares;

8. A partir dos resultados obtidos *in vitro*, avaliar alterações no índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) frente à exposição ao  $HgCl_2$  na presença ou na ausência de rianodina, ou seja, quando o RS tem sua função bloqueada ou não;


9. Verificar os parâmetros dos itens 2 a 8, acima citados, em traíras, *Hoplias malabaricus*, após a exposição sub-crônica (30 dias) a uma dose sub-letal de  $HgCl_2$  via dieta composta de matrinxãs de pequeno porte e expostos por 96 horas a concentração sub-letal de  $HgCl_2$  previamente escolhida. Os mesmos parâmetros serão analisados em traíras controles submetidas a uma dieta composta de matrinxãs não contaminados por  $HgCl_2$ ;

10. Avaliar a distribuição do mercúrio nos diferentes tecidos de traíra após 30 dias de alimentação com matrinxãs intoxicados com  $HgCl_2$ . Comparar a bioacumulação desse metal via captação pela água (bioconcentração) determinada previamente em matrinxã com a via trófica pela ingestão de alimento contaminado (biomagnificação).

## CAPÍTULO II

# Toxicidade aguda do mercúrio inorgânico (HgCl<sub>2</sub>) em matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

---

 Publicado em: Monteiro, D.A.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the neotropical fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*, v. 19, p. 105-123, 2010.



---

**RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi determinar a  $CL_{50}$  96 horas do cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ) para o matrinxã, *Brycon amazonicus*. Para tanto, foram feitos ensaios de toxicidade aguda preliminar e definitivo, este último em triplicata, em sistema estático, para a determinação da concentração de  $HgCl_2$  capaz de matar 50% dos organismos-testes. O  $HgCl_2$  não alterou os parâmetros físico-químicos da água e o valor da  $CL_{50}$  96 horas do  $HgCl_2$  para o matrinxã, *B. amazonicus*, em sistema estático, foi de  $0,71 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ , mostrando que o mercúrio é altamente tóxico para a espécie.

## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos adversos dos poluentes sobre organismos vivos podem ser quantificados por uma variedade de critérios como: número de organismos mortos ou vivos, taxa de reprodução, comprimento e massa corpórea, número de anomalias ou incidência de tumores, alterações fisiológicas, e, mesmo, a densidade e diversidade de espécies numa determinada comunidade biológica, dentre outras (ZAGATTO, 2006).

Uma das ferramentas úteis para avaliar os danos causados pelos contaminantes ambientais são os testes de toxicidade. Os testes de toxicidade com organismos aquáticos em condições de laboratório possibilitam a mensuração dos efeitos dos produtos tóxicos sobre a biota e a estimativa dos riscos de intoxicação ao ambiente. Para efeito de monitoramento de um corpo d'água possivelmente contaminado com substâncias tóxicas, os testes de toxicidade mais utilizados são os de avaliação da toxicidade aguda e crônica (RAND e PETROCELLI, 1985).

Através dos testes de toxicidade, determinam-se o tempo e as concentrações em que o agente químico é potencialmente prejudicial, pois para qualquer produto o contato com a membrana ou sistema biológico pode não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa, ou o tempo de contato for insuficiente. Concentração e tempo de exposição estão diretamente relacionados e, portanto, altas concentrações poderão ter efeitos prejudiciais em tempos de exposição extremamente curtos (FONSECA, 1991). Mas devemos lembrar que as pequenas concentrações geralmente produzem efeitos crônicos sub-letais e, até mesmo, letais durante longos períodos de exposição. O conhecimento da toxicidade desses agentes a diferentes organismos aquáticos possibilita, além do estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para proteção da vida aquática, avaliar o impacto momentâneo que esses poluentes causam à biota dos corpos hídricos (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

Dessa forma, os ensaios de toxicidade fornecem dados fundamentais na avaliação do impacto de determinadas substâncias tóxicas sobre um organismo. O matrinxã, *Brycon amazonicus*, é um teleósteo bastante cultivado e comercializado no Brasil sendo que, na Amazônia Ocidental, ocupa o quinto lugar dentre as espécies mais comercializadas, apresentando um grande volume de desembarque e comercialização no mercado consumidor de Manaus (IZEL et al., 2004). Assim, o teste de toxicidade para o cloreto de mercúrio contribuirá com o conjunto de dados hoje existentes sobre esta espécie, levando-nos, talvez, a refletir melhor antes da aplicação de determinadas substâncias no ambiente ao avaliar a toxicidade do mercúrio inorgânico e a sensibilidade relativa da espécie em questão, fornecendo subsídios para estimação dos possíveis impactos negativos em acidentes ambientais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais relacionados ao uso do metal pesado e dos animais experimentais no presente estudo e em todos os capítulos subseqüentes foram aprovados pela Comissão de Ética Ambiental da Universidade Federal de São Carlos - CEA/UFSCar, conforme parecer no 003/06 e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA/UFSCar, da mesma instituição, conforme parecer no 04/2007.

### 2.1 Animais

Alevinos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram adquiridos do Centro de Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros com recirculação de água de clorada (pH 7,0-7,5; DO<sub>2</sub> 6,5-7,3 mg.L<sup>-1</sup>; dureza 48-56 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade 40-43 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e condutividade 120-128 µS.cm<sup>-1</sup>), aeração constante (P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural. Os alevinos, com peso de 3 a 6 g, ficaram estocados, no LZBC, em densidades de até 100 peixes por tanque. Marques et al. (2004) concluíram que a densidade de estocagem de 96 alevinos por m<sup>3</sup> é a mais indicada para a espécie nesta faixa de peso, uma vez que nessa densidade obtiveram os melhores valores de biomassa total, conversão alimentar, ganho e uniformidade de peso dos matrinxãs, sem alterações nos parâmetros de sobrevivência.

Os peixes permaneceram sob tais condições por um período mínimo de 45 dias para a recuperação do estresse decorrente da coleta e do transporte, para a aclimação às condições laboratoriais e até alcançarem o peso apropriado para o uso nos experimentos (~ 18 g). Durante este período, os matrinxãs foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes com 40% de proteína (Pira Alevinos - Guabi Nutrição Animal®). Após o período de aclimação, os peixes (W<sub>T</sub> = 17,94 ± 3,13 g; L = 11,15 ± 0,83 cm) foram utilizados nos ensaios de toxicidade agudos preliminares e definitivos (CL<sub>50</sub> 96 horas).

### 2.2 Ensaio de Toxicidade Aguda (CL<sub>50</sub> 96 horas)

#### 2.2.1 Ensaio preliminar

Normalmente, um teste de toxicidade é antecedido por um teste preliminar, feito nas mesmas condições, porém com concentrações estabelecidas com limites de grande amplitude. Assim é possível determinar o intervalo de concentrações, delimitado pela menor

concentração que causa mortalidade e a concentração mais elevada na qual não ocorre efeito. Este intervalo, por sua vez, é utilizado na elaboração do ensaio definitivo. Dessa forma, um ensaio preliminar foi realizado para estabelecer um intervalo de concentrações de cloreto de mercúrio a ser utilizado no ensaio definitivo. Valores de  $CL_{50}$  96 horas de mercúrio inorgânico disponíveis na literatura para outras espécies foram usados para a determinação da faixa de concentração a ser utilizada no ensaio preliminar.

Cinco concentrações de mercúrio, na forma de cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ,  $\geq 99,5\%$  de pureza, Sigma-Aldrich, USA), foram utilizadas no ensaio preliminar (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10  $mg.L^{-1}$  ou ppm de  $HgCl_2$ ). Além dessas concentrações-teste, um tratamento controle, contendo somente água e sem adição do agente tóxico, também foi utilizado. As diferentes concentrações de cloreto de mercúrio nas caixas experimentais foram obtidas por diluições a partir de soluções-estoques de 100 ou 1.000  $mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  (solubilidade de 6,9 g/100 ml a 20 °C de acordo com “Material Safety Data Sheet” do Reagent World, Inc.).

Seis peixes foram colocados em cada caixa experimental, inclusive no controle, totalizando o uso de 36 peixes. O ensaio preliminar em sistema estático, ou seja, sem renovação de água, teve duração de 96 horas e a massa total dos organismos em cada caixa experimental não excedeu a relação de 1 g por litro de solução-ensaio. Assim, cada caixa experimental tinha o volume de água de 100 L com temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ C$ ) e aeração constante, além de serem cobertas para prevenir a volatilização do mercúrio. Os registros dos valores de temperatura, pH, condutividade, dureza total e oxigênio dissolvido foram efetuados no início e no final do ensaio. Todo comportamento anormal dos peixes, bem como o número de organismos mortos foram registrados a cada 2 horas nas primeiras 6 horas de experimento e, posteriormente, a cada 24 horas. Os peixes mortos eram retirados das caixas experimentais durante o decorrer do teste. Ao final do ensaio, foi estabelecido o intervalo de concentrações a ser utilizado no ensaio definitivo, ou seja, a menor concentração que causa mortalidade a 100% dos organismos e a concentração mais elevada na qual não se observa mortalidade.

### 2.2.2 Ensaio definitivo ( $CL_{50}$ 96 horas)

Um teste de toxicidade aguda avalia uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas (RAND & PETROCELLI, 1985). A determinação da concentração letal para 50% dos organismos-teste ( $CL_{50}$ ) do cloreto de mercúrio, em sistema estático, após 96 horas para a espécie *Brycon amazonicus* foi realizada de acordo com a norma OECD 203 - Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD, 1992). Utilizando-se as informações conhecidas sobre o intervalo de concentrações estabelecido no ensaio preliminar, uma série de diluições

intermediárias de razão de diluição 1,2 foi preparada. Foram utilizadas cinco diferentes concentrações de cloreto de mercúrio e um controle, com três repetições por tratamento. As concentrações utilizadas foram 0,58; 0,70; 0,84; 1,0 e 1,2 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub>.

As caixas experimentais usadas no ensaio definitivo tinham a capacidade de 180 L, água em temperatura controlada (24 ± 2°C), aeração constante e foram cobertas para prevenir a volatilização do mercúrio. Os animais tiveram a alimentação suspensa 24 horas antes do início dos experimentos para evitar efeitos prandiais e prevenir deposição de fezes ao longo do ensaio. A transferência dos organismos-teste para o recipiente-teste foi feita de forma aleatória, com redes apropriadas. Os peixes ( $W_T = 17,9 \pm 0,4$  g;  $L = 11,1 \pm 0,1$  cm) permaneceram nas caixas experimentais por 12 horas para adaptação e, após este período, a água foi renovada e o cloreto de mercúrio adicionado a partir de uma solução-estoque de 1.000 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>. Foram utilizados 10 peixes por caixa experimental mantendo a relação 1 g de peixe por litro de solução-teste. O ensaio de toxicidade aguda em sistema estático foi realizado em triplicata, ou seja, 30 peixes para cada concentração, totalizando o uso de 180 animais. Cabe ressaltar que o mercúrio é altamente persistente na água, com uma meia-vida de aproximadamente 200 dias (EPA, 1999, 2000). De acordo com Aragão & Araújo (2006), o sistema estático geralmente é aplicado em testes de curta duração (ao redor de 48 horas), com substância não volátil ou pouco degradável. Esse sistema pode ser utilizado, também, para agentes químicos que apresentam efeito tóxico agudo de imediato, o qual permanece constante por períodos prolongados (até 96 horas).

As características físico-químicas da água como temperatura, pH, condutividade, dureza total, alcalinidade, oxigênio dissolvido e concentração de amônia e de nitrito foram monitoradas no início e no final do ensaio. A mortalidade foi registrada a cada 24 horas de exposição sendo que os peixes mortos eram retirados para a biometria. Alterações no comportamento dos animais foram registradas. Ao final das 96 horas, os animais sobreviventes foram sacrificados em benzocaína 1% e também utilizados para a biometria. Os dados de mortalidade foram utilizados para a determinação do valor da CL<sub>50</sub>-96h do HgCl<sub>2</sub> para o matrinxã.

## **2.3 Determinação das Características Físicas e Químicas da Água**

### **2.3.1 pH e alcalinidade**

Amostras de 100 mL de água foram coletadas das caixas experimentais, transferidas para um becker e mantidas sob agitação para a determinação do valor do pH da água. A determinação da alcalinidade foi efetuada de acordo com as técnicas descritas por GOLTERMAN & CLIMO (1969) utilizando-se ácido sulfúrico 0,01 N como indicador da

alcalinidade, para titular até o pH 4,0. Para o cálculo da alcalinidade, em  $\text{mg.L}^{-1}$  de carbonatos e bicarbonatos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{ALCALINIDADE (mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}) = (\text{mL de H}_2\text{SO}_4) \times N \times \text{Eq} / \text{volume da amostra (mL)}$$

$$N (\text{normalidade do H}_2\text{SO}_4) = 0,01$$

$$\text{Eq (equivalente do H}_2\text{SO}_4) = 50.000$$

### 2.3.2 Dureza total

A análise de dureza foi feita por titulação das amostras de água, previamente tamponadas com EDTA, até o ponto de viragem de lilás para azul, usando-se como indicador o Eriocromo Negro de acordo com o método descrito por Adad (1982). Para o cálculo da dureza, em  $\text{mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}$ , foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{DUREZA (mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}) = \text{EDTA}_{(\text{mL})} \times 1000 / \text{AMOSTRA}_{(\text{mL})}$$

### 2.3.3 Nitrito

A concentração de nitrito foi determinada segundo SIPAÚBA-TAVARES (1994). Em amostras de 5 ml de água coletada dos tanques experimentais, foi adicionado 0,1 mL de sulfanilamida 58,07 mM em HCl 10%. Em seguida, as amostras foram agitadas e após 10 minutos adicionou-se 0,1 mL da solução bicloridrato de N-naftaleno-diamina 3,86 mM. O produto da reação de coloração rosa escuro foi determinado colorimetricamente em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 nm. A concentração de nitrito, em  $\text{mg.L}^{-1}$ , foi estimada a partir de uma curva-padrão feita com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ).

### 2.3.4 Cloreto

A concentração de cloreto foi determinada pelo método de Mohr descrito em OHWEILER (1968), onde os íons cloreto são titulados com solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), na presença de cromato de potássio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) como indicador. O ponto final da titulação é identificado quando todos os íons  $\text{Ag}^+$  tiverem se depositado sob a forma de  $\text{AgCl}$ , logo em seguida, haverá a precipitação de cromato de prata ( $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ ) de coloração marrom-avermelhada. Adicionou-se 1 mL de cromato de potássio 5% nas amostras de água coletadas das caixas experimentais e diluídas 1:10 com água destilada. Essas amostras de água foram mantidas sob

agitação e tituladas com nitrato de prata 0,01 N até a viragem do amarelo para o vermelho tijolo. Para o cálculo da concentração de íons cloretos das amostras, em  $\text{mg.L}^{-1}$ , foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{CLORETO (mg. L}^{-1}\text{)} = (\text{mL de AgNO}_3) \times \text{N} \times \text{Eq} / \text{AMOSTRA}_{(\text{mL})}$$

$$\text{N (normalidade do AgNO}_3\text{)} = 0,01$$

$$\text{Eq (equivalente do AgNO}_3\text{)} = 35.450$$

### 2.3.5 Amônia total

A concentração de amônia foi determinada pelo método de Nessler (GREENBERG et al., 1976), utilizando-se 2 mL de amostra de água e 0,5 mL de reativo de Nessler. Após 20 minutos à temperatura ambiente, a leitura óptica foi realizada em  $\lambda = 420 \text{ nm}$ . Os valores de amônia foram expressos em  $\text{mg.L}^{-1}$  e estimados a partir de curva-padrão feita com cloreto de amônia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).

### 2.3.6 Oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura

A temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) da água nos tanques experimentais foi tomada periodicamente e os parâmetros oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e condutividade elétrica ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ) foram determinados por processo eletrométrico utilizando-se o oxímetro YSI-55 e o condutímetro Check Mate II Corning. As análises foram efetuadas nas próprias caixas experimentais.

## 2.4 Tratamento dos Rejeitos de Mercúrio

Segundo a Resolução CONAMA 358/05, os resíduos contendo substâncias químicas podem ser lançados em corpo receptor desde que atendam as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais. Para evitar risco de contaminação dos corpos d'água da Universidade pelo mercúrio, foi feito o tratamento da água contendo cloreto de mercúrio proveniente dos ensaios toxicológicos de acordo com o procedimento descrito por MICARONI et al., 2000. Na água dos ensaios, foi realizado o ajuste do pH da água para 10, utilizando uma solução de NaOH a 10%. Em seguida, adicionou-se solução de sulfeto de sódio a 20%, sob agitação, até que não se observou mais precipitação. O precipitado foi embalado em recipiente plástico e enviado para a Unidade de Gestão de Resíduos da UFSCar. A água restante foi tratada com hipoclorito para

neutralização do sulfeto e posteriormente eliminada no esgoto comum.

A Resolução CONAMA 357/05 estabelece como valor máximo de mercúrio permitido em águas de classe I (águas destinadas ao abastecimento para consumo humano e à preservação do equilíbrio natural de comunidades aquáticas) o de  $0,0002 \text{ mg.L}^{-1}$  e para águas da classe III (águas destinadas ao abastecimento após tratamento convencional e à proteção de comunidades aquáticas) o valor de  $0,002 \text{ mg.L}^{-1}$ . Segundo a mesma resolução, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e, no caso de efluentes contendo mercúrio, os valores não devem ultrapassar  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ . Dessa forma, após o tratamento descrito acima, e levando-se em conta a diluição da água resultante do tratamento quando lançada em esgoto, os possíveis resíduos de mercúrio que ainda poderão existir não excederão os limites estabelecidos pelo CONAMA 357/05. Foram avaliados os níveis de mercúrio total nos efluentes dos ensaios experimentais do presente trabalho antes do tratamento para a remoção do mercúrio descrito acima, após as 96 horas de exposição. Em média, após 96 horas de exposição dos matrinxãs a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , restava cerca de 37% do valor inicial de Hg total (para detalhes ver no capítulo III). Dessa forma, após o tratamento para remoção do metal, e levando-se em conta a diluição da água resultante do tratamento no momento do descarte e quando lançada em esgoto, os possíveis resíduos de mercúrio que ainda poderiam existir não excederiam os limites estabelecidos pelo CONAMA 357/05 como comprovado pela quantificação de mercúrio no efluente antes da diluição.

As carcaças dos peixes contaminados por mercúrio foram recolhidas pela Empresa Vega Engenharia Ambiental S.A. sendo tratadas como resíduos da classe A, destinados à incineração de acordo com os padrões RDC ANVISA nº 306/2004 não excedendo o limite de emissão atmosférica para o mercúrio que é de  $0,05 \text{ mg.m}^{-3}$  de acordo com a POSIÇÃO COMUM (CE) N.º 7/2000 do Parlamento Europeu e o Conselho da União Européia (JOCE, 2000).

## 2.5 Tratamento Estatístico dos Dados

O valor da  $CL_{50}$  foi determinado utilizando-se o método “Trimmed Spearman-Kärber” (HAMILTON et al., 1977) e o programa “ $LC_{50}$  Program JSpear test” (GW-BASIC 3.10, Phoenix Software Associates Ltd, 1984) com intervalo de confiança de 95%. Segundo este programa a  $CL_{50}$  é determinada lançando-se o número total de indivíduos e o número de indivíduos mortos em cada concentração do composto testado, após o período do ensaio de toxicidade.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Ensaio preliminar

Os resultados do ensaio preliminar estão apresentados na Tabela 1. A mortalidade foi observada nas concentrações de 1 e 10 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>, sendo que em 1 mg.L<sup>-1</sup> todos os animais morreram em 24 h de exposição enquanto que em 10 mg.L<sup>-1</sup> todos os peixes morreram em apenas 4 h de exposição. Nenhuma morte ocorreu em 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> ou abaixo dessa concentração. Dessa forma, pelo ensaio preliminar, o valor da CL<sub>50</sub> 96 h, em sistema estático, para o matrinxã, ficou entre 0,1 e 1 mg.L<sup>-1</sup> de do HgCl<sub>2</sub>.

**Tabela 1:** Mortalidade cumulativa durante o ensaio preliminar no controle (n = 6) e nas diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub>) na água (n = 6) em 96 horas de exposição.

Grupos experimentais	Número de animais mortos durante o período experimental						
	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	0	0	0	0	0	0	0
0,001 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0
0,01 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0
0,1 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0
1,0 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	3	6	6	6	6
10,0 mg.L <sup>-1</sup>	4	6	6	6	6	6	6

Quando comparados com o controle, os peixes expostos ao do HgCl<sub>2</sub> ficaram mais escuros e mostraram intensa agitação, permanecendo na superfície da água com perda de equilíbrio e postura e frequentemente pulando das caixas experimentais. Além disso, os peixes expostos a concentrações mais altas de cloreto de mercúrio exibiram sinais de hemorragia branquial. As características físico-químicas da água no início e no final da exposição estão apresentadas na Tabela 2. Todos os parâmetros analisados, com exceção da concentração de amônia e nitrito, se mantiveram aproximadamente constantes, sem apresentarem alterações pronunciadas. As concentrações de amônia e nitrito na água de todas as caixas experimentais aumentaram ao final das 96 h de exposição.

**Tabela 2:** Características físico-químicas na água do grupo do controle e das diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub>) em 0 e em 96 horas de exposição durante o ensaio preliminar. --- não determinado, pois todos os peixes morreram antes das 96 horas de exposição.

Grupos experimentais	Temperatura °C		pH		Condutividade µS.cm <sup>-1</sup>		Oxigênio Dissolvido mg.L <sup>-1</sup>		Dureza total mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>		Alcalinidade mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>		Cloreto mg.L <sup>-1</sup>		Amônia mg.L <sup>-1</sup>		Nitrito mg.L <sup>-1</sup>	
	0	96	0	96	0	96	0	96	0	96	0	96	0	96	0	96	0	96
<b>Controle</b>	25,5	24,3	7,3	7,4	127,5	128,0	6,2	7,4	40	40	46	48	40	38	0,3	0,8	0,1	1,0
<b>0,001 mg.L<sup>-1</sup></b>	25,6	24,8	7,5	7,6	127,2	133,4	6,7	7,3	48	44	45	48	37	39	0,4	1,6	0,1	1,1
<b>0,01 mg.L<sup>-1</sup></b>	25,3	24,0	7,6	7,8	126,0	129,1	6,6	7,5	44	48	45,5	45,5	36	37	0,4	1,0	0,2	0,9
<b>0,1 mg.L<sup>-1</sup></b>	25,4	24,0	7,5	7,5	125,2	128,4	6,2	7,2	48	53	45	48	38	36	0,3	1,7	0,2	1,1
<b>1,0 mg.L<sup>-1</sup></b>	25,2	---	7,5	---	126,7	---	6,9	---	56	---	45	---	42	---	0,2	---	0,1	---
<b>10,0 mg.L<sup>-1</sup></b>	25,4	---	7,5	---	128,6	---	7,5	---	50	---	44,5	---	40	---	0,2	---	0,2	---

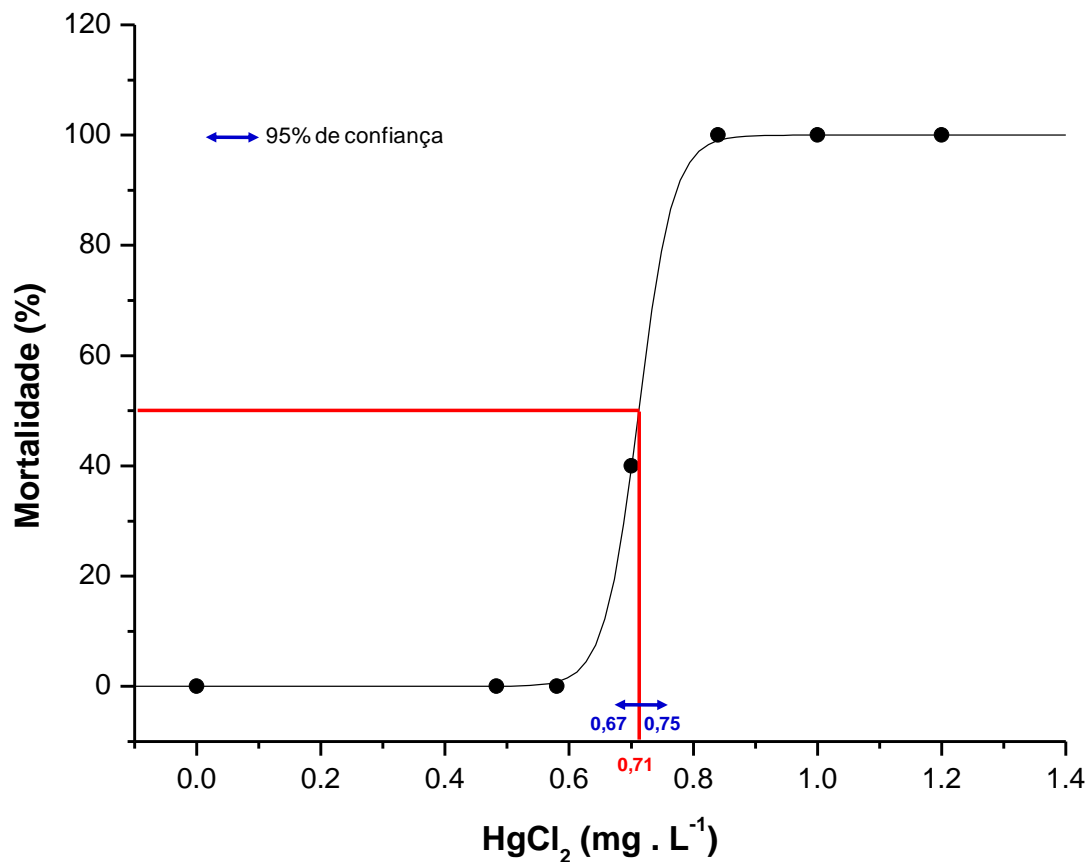
### 3.2 Ensaio definitivo (determinação da CL<sub>50</sub> 96 horas em sistema estático)

Durante os experimentos, não ocorreu mortalidade dos animais nos grupos controles (Tabela 3). Na concentração de 0,7 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> houve 60% de mortalidade e, em concentrações acima desta, a mortalidade atingiu 100%. A menor concentração do ensaio na qual nenhum efeito foi observado foi a de 0,58 mg.L<sup>-1</sup>. A partir das porcentagens de mortalidade obtidas em cada concentração de cloreto de mercúrio, foi calculado o valor da CL<sub>50</sub> 96 horas do HgCl<sub>2</sub>, para o matrinxã exposto em sistema estático, que foi de 0,71 ± 0,04 mg.L<sup>-1</sup> com um intervalo de confiança variando de 0,67 a 0,75 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 1).

**Tabela 3:** Mortalidade cumulativa durante no ensaio de toxicidade aguda em sistema estático (CL<sub>50</sub> 96 horas) do cloreto de mercúrio para o matrinxã, *Brycon amazonicus*. Valores são mortes observadas nas três réplicas realizadas para o controle (n = 10) e para cada concentração de HgCl<sub>2</sub> testada (n=10): 0,58; 0,70; 0,84; 1,00 e 1,20 mg.L<sup>-1</sup>.

Grupos experimentais	Número de animais mortos durante o período experimental						
	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	0	0	0	0	0	0	0
0,58 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0
0,70 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	0	0	6	12	12
0,84 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	0	3	18	30	30
1,0 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	0	9	21	30	30
1,2 mg.L <sup>-1</sup>	0	0	6	21	30	30	30

Todos os animais que vieram a óbito apresentaram grande número de escoriações e sinais de hemorragia branquial. O aspecto macroscópico do fígado dos peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub> sugeriu lesões de estruturas e absorção de água, sendo os órgãos facilmente rompidos ao serem manuseados.



**Figura 1** - Curva de porcentagem de mortalidade de matrinxã, *B. amazonicus*, em resposta a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) na água, mostrando o valor da CL<sub>50</sub> 96 horas (0,71 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>) e de seu intervalo de 95% de confiança (0,67 a 0,75 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>) calculados pelo método de “Trimmed Spearman-Kärber”.

As características físico-químicas da água monitoradas durante o ensaio definitivo de toxicidade aguda (CL<sub>50</sub> 96 horas) estão apresentadas na Tabela 4. Os parâmetros analisados foram semelhantes entre os grupos experimentais. As médias dos níveis de amônia e de nitrito das amostras de água coletadas a cada 24 horas de experimento tenderam a ser menores a partir da concentração de 0,84 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>, provavelmente devido a diminuição no número de peixes como resultado da mortalidade nessas concentrações.

**Tabela 4:** Características físico-químicas da água no grupo controle e nas diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,58; 0,70; 0,84; 1,0 e 1,2 mg.L<sup>-1</sup> ou mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>) testadas no Ensaio de Toxicidade Aguda (CL<sub>50</sub> 96 horas). Os valores são médias ± E.P.M. das quatro amostras de água coletadas a cada 24 horas de experimento.

Grupos experimentais	Temperatura °C	pH	Condutividade µS.cm <sup>-1</sup>	Oxigênio dissolvido mg.L <sup>-1</sup>	Dureza total mg.L <sup>-1</sup> CaCo <sub>3</sub>	Alcalinidade mg.L <sup>-1</sup> CaCo <sub>3</sub>	Cloreto mg.L <sup>-1</sup>	Amônia mg.L <sup>-1</sup>	Nitrito mg.L <sup>-1</sup>
<b>Controle</b>	25,10 ± 0,37	7,22 ± 0,03	128,16 ± 0,44	7,53 ± 0,03	42,60 ± 3,78	35,55 ± 0,68	37,97 ± 2,14	0,93 ± 0,25	0,60 ± 0,29
<b>0,58 mg.L<sup>-1</sup></b>	24,50 ± 0,68	7,22 ± 0,09	128,5 ± 1,44	7,35 ± 0,30	42,10 ± 2,16	36,82 ± 0,82	38,99 ± 0,80	1,32 ± 0,36	0,43 ± 0,17
<b>0,70 mg.L<sup>-1</sup></b>	25,18 ± 0,40	7,30 ± 0,07	125,33 ± 1,45	7,39 ± 0,11	42,25 ± 2,33	34,53 ± 0,18	37,40 ± 0,93	1,35 ± 0,35	0,58 ± 0,26
<b>0,84 mg.L<sup>-1</sup></b>	24,72 ± 0,68	7,20 ± 0,06	131,33 ± 3,38	7,50 ± 0,10	41,18 ± 2,77	36,12 ± 0,62	38,54 ± 0,85	0,73 ± 0,32	0,29 ± 0,11
<b>1,0 mg.L<sup>-1</sup></b>	24,06 ± 0,64	7,2 ± 0,07	128,66 ± 3,28	7,22 ± 0,07	39,00 ± 0,57	36,12 ± 0,56	38,33 ± 1,75	0,54 ± 0,16	0,18 ± 0,05
<b>1,2 mg.L<sup>-1</sup></b>	24,37 ± 1,06	7,27 ± 0,08	124,85 ± 1,85	7,14 ± 0,16	40,9 ± 2,41	34,46 ± 0,25	38,39 ± 2,12	0,66 ± 0,19	0,34 ± 0,04

#### 4. DISCUSSÃO

Mudanças na composição química de ambientes aquáticos naturais podem afetar organismos não-alvos, particularmente os peixes, os quais são muito utilizados como bioindicadores de poluição para se avaliar a qualidade de sistemas aquáticos (ADAMS & GREELEY, 2000). Em áreas poluídas, a exposição de peixes a xenobióticos pode dar origem a distúrbios bioquímicos (GÜL et al., 2004a).

O elevado desenvolvimento industrial ocorrido nas últimas décadas tem sido um dos principais responsáveis pela contaminação de nossas águas e solos, seja pela negligência no tratamento dos efluentes antes de despejá-los nos rios ou por acidentes e descuidos cada vez mais freqüentes, que propiciam o lançamento de muitos poluentes nos ambientes aquáticos, acarretando um potencial tóxico à biota aquática e à saúde humana (BRAGA et al., 2002). Os poluentes mais tóxicos lançados são os metais pesados, altamente tóxicos e persistentes, dentre os quais se destaca o mercúrio como um dos principais contribuintes para a poluição dos ecossistemas aquáticos. O mercúrio, do ponto de vista ecotoxicológico, é, de longe, o metal pesado mais importante e preocupante, apresentando tanto o fenômeno de bioacumulação como o de biomagnificação.

Na indústria, o sal de mercúrio mais importante é o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), também chamado sublimado corrosivo. O cloreto de mercúrio, composto altamente reativo e tóxico, facilmente desnatura proteínas, por isso foi intensamente usado no século XIX como desinfetante. O sublimado corrosivo é atualmente empregado na homeopatia, em concentração apropriada, para o tratamento da disenteria. Além disso, o cloreto de mercúrio é vastamente empregado como catalisador na indústria química e pode, assim, ser parcialmente eliminado nos efluentes líquidos industriais. Por exemplo, o  $\text{HgCl}_2$  catalisa a síntese de acetaldeído e a fabricação de uma tonelada do produto libera de 30 a 100 g de mercúrio. Adicionalmente, o cloreto de mercúrio é utilizado na curtição de peles e como inseticida e/ou fungicida (AZEVEDO, 2003).

Dessa forma, o mercúrio inorgânico pode facilmente atingir os ecossistemas aquáticos. A forma oxidada ( $\text{Hg}^{2+}$ ) é predominante no sistema aquático, podendo ou não estar associada a ligantes orgânicos ou inorgânicos. Além disso, é a forma mais comum de mercúrio liberada no ambiente por indústrias, apresentando um forte efeito agudo sobre os tecidos de peixes (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1996), e os valores de  $\text{CL}_{50}$  obtidos a partir de ensaios de toxicidade aguda com peixes variam entre 33 a  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (WHO, 1991).

A toxicidade de um xenobiótico para organismos aquáticos pode ser classificada de acordo com o valor da  $\text{CL}_{50}$  96 horas (VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION, 1996). Se a  $\text{CL}_{50}$  for  $< 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ , o xenobiótico é considerado supertóxico; se  $0,01 < \text{CL}_{50} < 0,10$ , extremamente tóxico; se  $0,1 < \text{CL}_{50} < 1,0$ , altamente tóxico; se  $1,1 < \text{CL}_{50} < 10,0$ , moderadamente tóxico; se  $11 <$

$CL_{50} < 100$ , levemente tóxico e, se  $> 100$  minimamente tóxico. O valor da  $CL_{50}$  96 horas para o cloreto de mercúrio em matrinxã, obtido no presente estudo (0,71 ppm), deixa claro que o mercúrio inorgânico é altamente tóxico para esta espécie, que mostrou elevada sensibilidade a este metal. Alguns valores de  $CL_{50}$  96 horas do cloreto de mercúrio para várias espécies de peixes estão registrados na Tabela 5.

Observando-se a Tabela 5 fica evidente a necessidade de estudos de toxicidade sobre peixes tropicais, particularmente os peixes brasileiros, pois os pesticidas e metais pesados são testados em organismos-teste que são usualmente peixes de água doce originários de regiões temperadas. O valor da  $CL_{50}$  96 horas do cloreto de mercúrio obtido para o matrinxã no presente estudo ficou próximo aos valores de  $CL_{50}$  obtidos para *Cyprinus carpio*, *Fundulus heteroclitus*, *Europlus maculatus*, *Anabus testudineus* e *Tilapia mossambica*. Entretanto, valores diferentes podem ser obtidos para outras espécies. Estes valores podem variar tanto devido às características físico-químicas da água (pH, dureza, alcalinidade, temperatura, etc) quanto às características biológicas de cada espécie (sensibilidade) bem como a duração e o tipo de ensaio (sistema estático, semi-estático ou de fluxo contínuo).

De acordo com a EPA (1985), os valores de  $CL_{50}$  para peixes expostos ao mercúrio inorgânico (geralmente como  $HgCl_2$ ) variam de 150 a 420  $\mu g.L^{-1}$  em sistema de fluxo contínuo. Já para RAMAMOORTHY & BADDALOO (1995), os valores de  $CL_{50}$  do mercúrio inorgânico para peixes de água doce variam de 60 a 800  $\mu g.L^{-1}$ . Assim, o valor da  $CL_{50}$  96 horas do  $HgCl_2$  para o matrinxã, obtido no presente estudo, está em concordância com os descritos na literatura.

O cloreto de mercúrio exibe um comportamento diferente de outros sais de metais pesados em água. O  $HgCl_2$  solúvel em água (69  $g.L^{-1}$  a 20 °C), porém em solução o  $HgCl_2$  não se dissocia completamente em  $Hg^{2+}$  e  $Cl^-$ . Ao contrário, forma diferentes complexos com cloreto:  $HgCl$ ,  $HgCl_2$ ,  $HgCl_3^-$  e  $HgCl_4^{2-}$  e com os íons OH:  $HgClOH$ ,  $Hg(OH)_2$ ,  $Hg(OH)^+$  (AZEVEDO, 2003). A forma predominante dependerá do pH e da concentração de cloreto na água. De acordo com as características físico-químicas da água descritas no presente estudo para os ensaios de toxicidade, ou seja, pH ~7,3 e concentração de cloreto ~ 40  $mg.L^{-1}$ , as formas de mercúrio predominantes provavelmente são  $Hg(OH)_{2(aq)}$ ,  $HgClOH_{(aq)}$  e  $HgCl_{2(aq)}$  conforme descrito por POWELL et al. (2004, 2005). Segundo BLACK et al. (2007), cálculos de especiação química do cloreto de mercúrio em águas doces de pH 7,7 e com concentrações de cloreto inferiores a 5 mM assumem que a quantidade de  $Hg^{2+}$  é insignificante e que os complexos inorgânicos dominantes são  $Hg(OH)_{2(aq)}$ ,  $HgClOH_{(aq)}$  e  $Hg(Cl)_{2(aq)}$ , todos operacionalmente definidos como hidrofóbicos por não apresentarem cargas e, portanto, capazes de atravessar membranas biológicas mais facilmente que o  $Hg^{2+}$ .

**Tabela 5:** Valores de CL<sub>50</sub> 96 horas do cloreto de mercúrio em mg.L<sup>-1</sup> para diferentes espécies de peixes juvenis descritos na literatura.

Espécie	CL <sub>50</sub>	Teste	pH	D	T	Autores
<i>Anabas testudineus</i> (climbing perch)	0,64	estático	7,6	---	28	SINHA & KUMAR, 1992
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa)	0,71	renovável	7,1	---	23	ALAM & MAUGHAN, 1992
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa)	0,77	renovável	7,5	---	23	ALAM & MAUGHAN, 1995
<i>Etroplus maculatus</i> (pearlspot)	0,67	estático	7,85	---	21	GAIKWAD, 1989
<i>Fundulus heteroclitus</i> (mummichog)	0,80	estático	7,8	---	20	EISLER & HENNEKY, 1977
<i>Ictalurus melas</i> (black bullhead)	0,57	estático	7,6	298	13	ELIA et al., 2003
<i>Leuciscus cephalus</i> (european chub)	0,55	estático	7,2	20	22	GÜL et al., 2004b
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truta arco-íris)	0,40	estático	7,5-7,8	90	5	MACLEOD & PESSAH, 1973
<i>Oryzias latipes</i> (japanese medaka)	0,90	fluxo contínuo	---	---	18	HORI et al., 1996
<i>Tilapia mossambica</i> (tilapia)	0,74	estático	---	---	28 - 32	RAMAMURTHI et al., 1982
<i>Brycon amazonicus</i> (matrinxã)	0,71	estático	7,3-7,6	40-50	24 - 25	PRESENTE ESTUDO

--- = valor não informado

T = temperatura em °C

D = dureza total em mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>



Além das características discutidas até aqui discutidas, o mercúrio e outros metais pesados em ambientes aquáticos ligam-se predominantemente ao material particulado em suspensão (MASCARENHAS et al, 2004). Dessa forma, a quantidade de material particulado em suspensão na água também influenciará a quantidade de mercúrio disponível. Na água, os metais podem não interagir diretamente com a biota, mas ligar-se ao material particulado que irá precipitar e representar o compartimento sedimento, prejudicando a fauna local, os animais onívoros e iliófagos, além de novamente se disponibilizarem na coluna de água, sob condições ambientais específicas, sendo este compartimento ora um depósito ora uma fonte de contaminação aos corpos de água (FORSTNER, 1990). Dessa forma, a complexação do cloreto de mercúrio com ligantes inorgânicos e orgânicos pode contribuir também para os diferentes valores de  $CL_{50}$  96 horas do cloreto de mercúrio registrados na literatura para várias espécies de teleósteos.

Durante a realização dos nossos experimentos, não foram observadas diferenças nas características físico-químicas da água contendo cloreto de mercúrio em relação à água do controle. Entretanto, houve uma tendência de aumento da amônia e de nitrito na água após 96 horas de exposição tanto no controle como na água com  $HgCl_2$ . Esses aumentos nas concentrações de amônia e nitrito já eram esperados para um sistema estático, onde os peixes, permanecendo confinados na mesma água, excretam continuamente amônia como produto final do metabolismo protéico. A amônia, por sua vez, pode ser transformada em nitrito na presença de oxigênio. A não dissociação do  $HgCl_2$  em  $Hg^{2+}$  e  $Cl^-$  foi corroborada pela análise dos níveis de cloreto na água dos grupos experimentais, não tendo sido observadas alterações na concentração deste íon mesmo após a adição do cloreto de mercúrio.

Os efeitos da intoxicação pelo  $HgCl_2$  observados nos matrinxãs como intensa agitação e perda de equilíbrio e postura, podem ser o reflexo de danos no sistema nervoso central ocasionados pelo metal. Em peixes, o mercúrio é capaz de induzir disfunções bioquímicas no SNC como a inibição da atividade da  $Na^+/K^+$  ATPase, monoamino oxidase (MAO) e acetilcolinesterase (BERNTSEN et al., 2003; GILL et al., 1990; RAM & SATHYANESAN, 1985). Além disso, os metais dissolvidos na água são captados pelas brânquias afetando a morfologia do epitélio branquial, promovendo desequilíbrios osmóticos e iônicos, aumentando a produção de muco e levando ao comprometimento da função respiratória (EVANS, 1987; SKIDMORE, 1970). No presente estudo, as hemorragias brânquias e a permanência dos peixes mais na superfície da água corroboram tais assertivas.

## 5. CONCLUSÕES

O valor da  $CL_{50}$  96 h do  $HgCl_2$  para o *B. amazonicus*, em sistema estático, foi de  $0,71 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ , indicando que o mercúrio inorgânico é altamente tóxico para esta espécie, que mostrou elevada sensibilidade a este metal. O  $HgCl_2$  não alterou os parâmetros físico-químicos da água sendo observada apenas uma tendência de aumento de amônia e nitrito nas caixas experimentais tanto dos grupos controles quanto dos expostos ao metal. O aumento das concentrações de nitrito e amônia é esperado em um sistema estático de exposição, onde os peixes continuam a excretar a amônia como um produto do metabolismo protéico. A amônia posteriormente é transformada em nitrito.

## CAPÍTULO III

**Bioconcentração e biomagnificação do  
mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) em matrinxã,  
*Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) e  
em traíra, *Hoplias malabaricus*  
(BLOCH, 1794)**

---

☰ Parte do capítulo foi publicada em: Monteiro, D.A.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the neotropical fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Ecotoxicology**, v. 19, p. 105-123, 2010.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de bioconcentração e biomagnificação do Hg após uma exposição aguda, via água, e uma exposição sub-crônica, via alimento, a doses sub-letais de mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) em duas espécies de peixes brasileiros ecologicamente distintos, matrinxã (*Brycon amazonicus*) e a traíra (*Hoplias malabaricus*). Exemplares juvenis de matrinxãs foram divididos em dois grupos: um controle (Ct, n = 10) e o outro exposto por 96 horas a uma concentração nominal e sub-letal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (1/5 da  $\text{CL}_{50}$  96h) em sistema estático ( $\text{HgCl}_2$ , n = 10). Exemplares adultos de ambos os sexos de traíra também foram divididos em dois grupos. Um dos grupos foi utilizado como controle (Ct, n = 10) e o outro exposto troficamente ao Hg (Hg, n = 10). A exposição sub-crônica das traíras ao Hg foi realizada durante um período de 30 dias, via dieta consistindo de matrinxãs vivos expostos por 96 h a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (10 doses de 4 matrinxãs/traíra a cada 96 h, correspondendo a 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup>). A exposição aguda (96 horas) a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  promoveu bioconcentração de maneira pronunciada nos tecidos do matrinxã, *Brycon amazonicus*, seguindo o padrão: brânquias > fígado >> coração > músculo branco. Adicionalmente, as concentrações de Hg total nos diferentes tecidos dos matrinxãs, incluindo o filé, excederam o limite máximo de mercúrio permitido de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  para ingestão humana de acordo com a OMS para peixes não-carnívoros. Houve biomagnificação significativa em todos os tecidos de traíras seguindo esta ordem: brânquias >> fígado >> coração > músculo branco. Entretanto, os níveis de Hg total no filé não excederam o limite máximo permitido de  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  para ingestão humana de acordo com a OMS para peixes carnívoros. Essa biomagnificação observada refere-se exclusivamente a formas inorgânicas do Hg, uma vez que nos matrinxãs expostos por 96 horas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  que foram usados na contaminação trófica das traíras não foram detectados teores de metilmercúrio acima do limite de quantificação de 1 ppb ou  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Assim, o mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ), conhecido por ter baixo potencial de bioacumulação, bioconcentrou-se nos tecidos de matrinxã e biomagnificou-se nos tecidos de traíra expostos ao Hg por diferentes vias (água e alimento) mostrando que a forma inorgânica também é capaz de se bioacumular-se através dos níveis tróficos, mesmo com uma menor eficiência quando comparada com as formas orgânicas do Hg.

## 1 INTRODUÇÃO

Tanto o mercúrio orgânico quanto o inorgânico são absorvidos diretamente da água como dos alimentos ou da ingestão de sedimentos, sendo que o consumo de alimentos contaminados é uma das rotas mais importantes de acúmulo de mercúrio em peixes (KEHRIG et al., 2002). Ações antrópicas provocam mudanças em ecossistemas aquáticos e levam à necessidade de se entender as bases fisiológicas da biodiversidade e das diferentes capacidades de diferentes espécies de resistirem a essas mudanças. Esta questão é particularmente importante para o entendimento de como os metais pesados, que se bioacumulam ao longo das cadeias tróficas, podem influenciar esses sistemas.

Uma vez absorvidos por organismos, os metais são geralmente retidos por proteínas e então transportados pelo sangue até os tecidos onde podem ser estocados ou biotransformados. As espécies inorgânicas do mercúrio e o metilmercúrio têm capacidade de reagir com ligantes intracelulares, o que pode explicar o alto grau de bioacumulação desses compostos (WHO, 1989). Quando a velocidade de absorção de um xenobiotico, seja por exposição através da água, seja pelo consumo do alimento, excede a velocidade de eliminação do mesmo, ocorre um acúmulo do composto, processo conhecido como bioacumulação.

A bioacumulação é o fenômeno pelo qual uma substância química se acumula em espécies de peixes de acordo com seu nível trófico na cadeia alimentar, seja pela captação direta da água pelas brânquias e pele (bioconcentração), seja pela captação de partículas em suspensão (ingestão) ou via consumo de presas contaminadas (biomagnificação) (VAN der OOST et al., 2003). O termo biomagnificação é reservado principalmente para processos onde ocorrer uma bioacumulação associada aos diferentes níveis tróficos, sendo que peixes podem estar sujeitos a ambos os processos: bioconcentração diretamente da água ou alimento e biomagnificação através da cadeia alimentar (HEATH, 1995).

Como as espécies carnívoras estão no topo da cadeia, é consenso que a concentração de Hg em peixes carnívoros seja maior que nas espécies não-carnívoras. Isso significa que a concentração de Hg nos peixes pode ser muitas vezes superior àquela da água e, em um peixe carnívoro adulto, podemos encontrar mais de 90% de mercúrio na forma metilada (MALM et al., 1995). A literatura apresenta vários trabalhos sobre a concentração de Hg total em peixes no Brasil, sendo que para algumas regiões os valores encontrados estão acima do valor permitido na legislação brasileira. Estudos com pescado comercializado na cidade de São Paulo-SP demonstraram que as espécies predadoras estavam acima do limite tolerado, podendo atingir até  $4,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ . (KITAHARA et al., 2000; MORALES-AIZPURÚA et al., 1999; SANTOS et al., 1993), valor muito superior ao limite permitido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 0,5 e  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  para não-carnívoros e carnívoros, respectivamente.

De acordo com revisão feita por Bisinoti & Jardim (2004), as concentrações de Hg total em peixes piscívoros, onívoros e herbívoros coletados de diferentes regiões do Rio Madeira (Amazônia), variaram de 0,09 a 1,45 mg.kg<sup>-1</sup> e nos peixes coletados numa área de mineração do mesmo rio, a concentração de Hg total variou de 0,33 a 2,30 mg.kg<sup>-1</sup>. Para a Bacia do Tapajós os peixes como dourado, jaú, piraíba, mandubé, cachorro, traíra, pescada, tucunaré, filhote, pirarucu, acará, aruanã, pacú, surubim, matrinxã, sarda, jacunda, tambaqui e aracu apresentaram concentrações de Hg total variando de 0,02 até 2,75 mg.kg<sup>-1</sup> (AKAGI et al., 1995; BIDONE et al., 1997; MALM et al., 1997).

Dada às características de bioacumulação e biomagnificação do Hg e a posição dos peixes na cadeia trófica de um ecossistema aquático, somada à escassez de informações sobre a ação desse metal em peixes brasileiros, o uso de espécies tropicais e de interesse comercial como modelo de estudo é extremamente interessante em termos de preservação do ambiente e saúde humana. Os altos índices de toxicidade do Hg para os organismos, mesmo em baixas concentrações, associados à sua relativa facilidade de entrar e permanecer na cadeia trófica por longos períodos reforçam a importância de estudos que avaliem seu padrão de bioconcentração e biomagnificação, além de seus efeitos nos peixes, uma vez que a fauna íctica constitui-se uma fonte protéica importante na alimentação.

Os peixes representam uma alternativa saudável de alimentação, pois o pescado é uma importante fonte de proteína animal, micronutrientes, ácidos graxos essenciais e vitaminas A, D e ômega 3, além de ser um alimento de fácil digestão. Em todo o mundo, o consumo de peixe tem se tornado um hábito, como alternativa saudável a outras carnes (NASCIMENTO et al., 2009). Na Amazônia, os peixes são a principal fonte de alimentação da população, e podem apresentar elevadas concentrações de Hg, principalmente metilmercúrio, constituindo-se em importante fonte de exposição humana ao metal (WHO, 1990).

O risco de intoxicação pela ingestão de peixe contaminado depende de alguns fatores, sendo que o teor de mercúrio, a quantidade ingerida e a frequência de ingestão são determinantes para a acumulação de metilmercúrio no organismo humano (ASTDR, 1989; WHO, 1990). O peixe tem sido apontado como a principal via de intoxicação do ser humano por mercúrio e outros elementos tóxicos. Consequentemente, o conhecimento da concentração, transporte e dinâmica dos elementos químicos em ecossistemas aquáticos, não somente do ponto de vista da relação consumo de peixe e bioacumulação em seres humanos, mas também com relação a um mesmo ecossistema, é muito importante para avaliar tanto seu impacto potencial em humanos quanto para a vida aquática (NASCIMENTO et al., 2009).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizados, para a realização deste estudo, aproximadamente 1000 exemplares de matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829), com peso médio de  $5,20 \pm 0,38$  g (Média  $\pm$  E.P.M., amostragem de 40 peixes do lote aleatoriamente) e 20 exemplares adultos (fêmeas e machos) de traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), com peso médio de  $246,32 \pm 13,92$  g (Média  $\pm$  E.P.M.). Também foram utilizados 20 exemplares de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, com peso de 15 a 18 g.

Os exemplares de matrinxã e traíra foram comprados do Centro de Piscicultura Águas Claras (Mococa - SP) e do Parque do Lago (Dourado - SP), respectivamente. Os animais foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde os experimentos foram realizados. Os peixes ficaram em tanques de 500 e 1.000 L com recirculação de água sem cloro e termostalizada ( $25^{\circ}\text{C}$ ), com aeração constante ( $P_{\text{wO}_2} \geq 135$  mmHg) e sob fotoperíodo natural (~12h luz:12h escuro) por um período mínimo de 45 dias para a recuperação do estresse decorrente da coleta e do transporte e para a aclimação às condições laboratoriais.

Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e se mantiveram aproximadamente constante: pH 7,0 a 7,5;  $\text{DO}_2$  6,5 a 7,3  $\text{mg.L}^{-1}$ ; dureza 48 a 56  $\text{mg.L}^{-1}$  (como  $\text{CaCO}_3$ ) e alcalinidade 40 a 43  $\text{mg.L}^{-1}$  (como  $\text{CaCO}_3$ ). Durante o período de aclimação, os matrinxãs foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes com 40% de proteína (Pira Alevinos - Guabi Nutrição Animal<sup>®</sup>). As traíras foram alimentadas com pequenos matrinxãs uma vez por semana, na razão de aproximadamente 2% da biomassa.semana<sup>-1</sup>, totalizando o uso de aproximadamente 200 matrinxãs.

### 2.2 Desenho Experimental

**2.2.1 Exposição aguda (96 h) de matrinxãs a concentração nominal e sub-letal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (~1/5 da  $\text{CL}_{50}$  96 h)**

Antes do início do experimento, os juvenis de matrinxãs ( $W_T = 17,3 \pm 1,2$  g;  $L = 11,3 \pm 0,9$  cm) foram aleatoriamente divididos em dois grupos: controle (grupo Ct,  $n = 10$ ), em que os peixes permaneceram em água sem mercúrio e grupo exposto ao mercúrio inorgânico (grupo  $HgCl_2$ ,  $n = 10$ ) na concentração nominal e sub-letal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  ou ppm de  $HgCl_2$  por 96 horas ( $\sim 1/5$  da  $CL_{50}$  96 horas). As características físico-químicas da água como temperatura, pH, condutividade, dureza total, alcalinidade, oxigênio dissolvido e concentração de amônia e de nitrito foram monitoradas em ambos os grupos experimentais ao longo das 96 horas de exposição. Todos os procedimentos para essas análises foram detalhadamente descritos no capítulo anterior (Capítulo II). Conforme descrito a seguir, avaliou-se também a concentração de Hg total na água dos grupos Ct e  $HgCl_2$ .

A exposição foi conduzida de acordo com as normas da OECD 203 para teste de toxicidade em peixes (OECD, 1992) e se encontra minuciosamente descrita no capítulo anterior. Foram colocados 10 peixes em cada caixa experimental (180 L,  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e aeração constante), sendo mantida a relação de 1,0 g de peixe por litro de água. Duas réplicas para cada grupo experimental foram realizadas totalizando 20 animais por grupo experimental e 40 peixes no total. Os animais tiveram a alimentação suspensa 24 horas antes do experimento para evitar efeitos prandiais e prevenir deposição de fezes ao longo do ensaio. Os peixes permaneceram nas caixas experimentais por 12 horas para adaptação e, após este período, a água foi renovada e o cloreto de mercúrio adicionado a partir de uma solução-estoque de  $1.000 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $HgCl_2$ . Após a adição do  $HgCl_2$ , os peixes permaneceram em sistema estático por 96 horas.

A escolha da concentração de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $HgCl_2$  deveu-se ao fato de ser uma concentração sub-letal ( $\sim 1/5$  da  $CL_{50}$  96 horas), ou seja, não há mortalidade nessa concentração. Ao mesmo tempo, essa concentração de Hg pode existir em ambientes aquáticos contaminados, como em áreas próximas de lançamentos de efluentes industriais. OLIVEIRA & FILHO (2003), analisando amostras de águas superficiais e subterrâneas (de poços profundos) de áreas próximas às fábricas de cerâmica, observaram que os resíduos lançados nessas águas apresentavam em torno de  $8,35 \text{ mg.L}^{-1}$  de mercúrio. Em determinados pontos de lançamento de efluentes industriais no rio Aba, na Nigéria, a concentração de mercúrio total detectada na água variou de 0,002 até  $0,230 \text{ mg.L}^{-1}$  (ALINNOR, 2005). No lago de Titicaca, no Peru, concentrações de Hg total chegam a  $0,244 \text{ mg.L}^{-1}$  em áreas próximas ao descarte de efluentes de usinas (GAMMONS et al., 2006).

KUMMERER et al. (1997) estudaram a influência de soluções desinfetantes utilizadas para limpeza de "kits" de aspiração dental equipados com separador de amálgama. Essas soluções contêm oxidantes que dissolvem o mercúrio do amálgama e, então, o metal é lançado no ambiente junto com o efluente. As concentrações de mercúrio medidas no efluente depois da aplicação de desinfetantes diferentes variaram de 18,4 a  $1.396 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . Em 1998, 64%



das estações do Estuário de Santos apresentaram teores de mercúrio total na água em torno de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , valor muitas vezes superior ao limite recomendado para a preservação da vida aquática (CETESB, 1998; HYPOLITO et al., 2004).

Dessa maneira, não podem ser descartadas contaminações por mercúrio inorgânico em torno de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  nos corpos d'água próximos aos pontos de lançamento de efluentes industriais (BOLLEN et al., 2008), apesar da maioria dos estudos conduzidos com o objetivo de avaliar níveis de Hg total em rios retratarem níveis que vão de 1,3 a  $42,7 \text{ ng.L}^{-1}$ , conforme revisão feita por TOMAZELLI (2003). Isso pode ocorrer em parte devido ao efeito da diluição, uma vez que as amostras foram analisadas ao longo dos rios e, em parte, pelo fenômeno de adsorção do metal aos sedimentos. Nesse sentido, é importante destacar que a concentração de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  utilizada no presente trabalho é uma concentração nominal, pois parte do mercúrio inorgânico acaba se aderindo ao material particulado em suspensão, conforme os valores obtidos por análise de espectrofotometria de fluorescência atômica descritos nos resultados do presente trabalho.

Não se pode, ainda, deixar de ressaltar o sedimento como potencial disponibilizador de mercúrio para a biota. Nesse sentido, concentrações superiores a 0,15 ppm frequentemente são encontradas nos sedimentos e no material particulado em suspensão (AZEVEDO, 2003), refletindo contaminações aquáticas superiores a esse valor, dependendo da época e das mudanças nas condições físico-químicas da água entre outros fatores. De acordo com LUIZ-SILVA et al. (2002), a concentração de mercúrio total em amostras de sedimentos superficiais ( $< 63 \mu\text{m}$ ) do Estuário de Santos-Cubatão (SP) variou de 0,1 a 6,77 ppm. Já em estudos realizados por VIEIRA & ALHO (2004), as concentrações mais elevadas de Hg total no sedimento do rio Bento Gomes (Poconé - Mato Grosso) foram de 240 e 250 ppm.

Segundo MASCARENHAS et al. (2004), os teores de Hg total em sedimentos de fundo do rio Acre (Acre) variam entre 18 e 184 ppm e no material particulado de 67 a 220 ppm. NASCIMENTO et al. (2007) avaliaram as concentrações de Hg em amostras de plâncton do lago Puruzinho, localizado à margem esquerda do rio Madeira (Amazonas). Os níveis de Hg no plâncton variaram entre 34 a  $337 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ , concentrações essas compatíveis de regiões consideradas impactadas por Hg. Dessa forma, fica evidente que mesmo com a adsorção característica do Hg no sedimento, a sua ressuspensão, pode disponibilizar quantidades significativas desse metal para a biota.

Ao final das 96 horas de exposição ao  $\text{HgCl}_2$  os matrinxãs foram coletados das caixas experimentais e sacrificados por transecção da coluna espinal em conformidade com as normas da "American Veterinary Medical Association" (AVMA, 2001). Em seguida, o fígado, as brânquias, o coração e uma amostra de músculo branco da parte superior da linha lateral próxima à região cefálica foram coletados e devidamente dissecados em placas de vidro mantidas sob

gelo a fim de se obter o fígado sem gordura e vesícula biliar, os filamentos branquiais separados de seus arcos branquiais, o coração sem o bulbo e uma parte de músculo branco livre de pele e vestígios de músculo vermelho. Os tecidos foram lavados em salina 0,9% para retirada de impurezas, secos superficialmente em papel filtro, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da concentração de Hg total.

### **2.2.2 Exposição trófica (via alimento) e sub-crônica (30 dias) das traíras a uma dose sub-letal de Hg**

Antes do início do experimento, os exemplares foram divididos em 2 grupos de dez animais cada um. Um grupo foi utilizado como controle (grupo Ct,  $n = 10$ ) e o outro foi exposto ao Hg via alimento (grupo Hg,  $n = 10$ ). A contaminação trófica e sub-crônica foi realizada através de pequenos exemplares vivos (5 a 6 g) de matrinxãs (*B. amazonicus*) que foram expostos por 96 horas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  em sistema estático.

A contaminação trófica foi realizada durante um período de 30 dias, correspondendo a 10 doses (4 matrinxãs/traíra a cada 96 horas, correspondendo a  $\sim 2\%$  da biomassa.dia<sup>-1</sup> ou 8 % da biomassa a cada 4 dias), oferecidas após um período de 96 horas de jejum. Para cada uma das traíras eram oferecidos quatro matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ . Para a exposição dos matrinxãs ao  $\text{HgCl}_2$  foram adotados os mesmos procedimentos descritos no item anterior. Os peixes do grupo Ct foram alimentados com a mesma espécie, porém com exemplares não expostos ao  $\text{HgCl}_2$ . O grupo Ct também recebeu a alimentação durante um período de 30 dias, correspondendo a 10 doses (4 matrinxãs/traíra a cada 96 horas, correspondendo a  $\sim 2\%$  da biomassa.dia<sup>-1</sup>), oferecidas após um período de 96 horas de jejum. Assim, para ambos os grupos experimentais (Ct e Hg) usados na avaliação da bioacumulação, cerca de 800 exemplares vivos de pequenos matrinxãs foram utilizados na alimentação das traíras ao longo dos 30 dias.

Conforme experimento-piloto prévio, em 96 horas de jejum não há mais nada no conteúdo estomacal desses animais indicando que a próxima dose a ser administrada tenha maior chance de ser totalmente consumida. Nos quatro dias subsequentes a última dose, os peixes permaneceram em jejum para garantir o total consumo da última dose e evitar a regurgitação das presas e restos alimentares durante a coleta, uma vez que esta espécie reage ao estresse regurgitando seu conteúdo estomacal (ZAVALA-CAMIN, 1996).

A taxa de alimentação de  $2\%$  da biomassa.dia<sup>-1</sup> foi a mesma utilizada por Rios et al. (2005), que demonstrou que após 240 dias de jejum, uma realimentação de traíras com peixes vivos com a taxa de  $2\%$  da biomassa.dia<sup>-1</sup> recuperou a taxa metabólica, reverteu a eritropoese e

as reservas de glicogênio bem como reverteu parcialmente alterações no fígado, músculo e intestino. Isso sugere que, em condições normais de alimentação sem períodos prolongados de jejum, a taxa de alimentação de 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup> é suficiente para manter as condições metabólicas ótimas e garantir a saciedade dos animais. Essa taxa de alimentação também foi próxima àquela utilizada por ALVES COSTA et al. (2007) que alimentaram traíras com lambaris contendo chumbo ou metilmercúrio numa proporção de aproximadamente 10% da biomassa a cada cinco dias. Além disso, CARVALHO et al. (2002) estudando a alimentação de *Hoplias malabaricus* encontraram que o número de presas variou de uma a duas por estômago nos indivíduos adultos. No presente trabalho, cada traíra se alimentava de quatro presas, assegurando uma oferta maior do que normalmente o animal encontra na natureza.

As traíras ficaram em tanques de 500 L com recirculação de água sem cloro e termostatizada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com aeração constante e sob fotoperíodo natural (~12h luz:12h escuro), ou seja, as traíras permaneceram nos mesmos tanques de aclimatação. Os dois grupos de 10 peixes cada foram distribuídos em duas caixas de 500 L, perfazendo uma densidade de aproximadamente 5 g de peixe por litro de água. Experimentos-piloto estocando essas traíras em diferentes densidades (0,5; 1,5 e 5,0 g de peixe por litro de água) demonstraram que na densidade de 5 g.L<sup>-1</sup> as traíras não se atacam e não exibem comportamento agressivo, além de todas aceitarem o alimento vivo oferecido, comendo os peixes imediatamente, não regurgitando o alimento oferecido que, por sua vez, é um comportamento característico de estresse. As traíras estocadas em densidades menores exibiram canibalismo e não se alimentavam das presas oferecidas.

Durante o período de aclimatação das traíras, matrinxãs de pequeno porte foram expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> e ao final das 96 horas, foram sacrificados por transecção da coluna vertebral e congelados e mantidos em nitrogênio líquido para análise da concentração de mercúrio total. A dose de HgCl<sub>2</sub> utilizada na alimentação das traíras foi baseada em concentrações do metal encontradas em espécies forrageiras de presas de traíras. A quantidade de mercúrio total nos matrinxãs de pequeno porte inteiros foi avaliada em 8,11 mg.kg<sup>-1</sup> de Hg total (ver em Resultados, sub-item 3.2.2 “Mercúrio total nos exemplares inteiros de matrinxã, *Brycon amazonicus* usados na alimentação das traíras”). Dessa forma, os matrinxãs de massa aproximada de 5 a 6 g, apresentavam em torno de 0,045 mg de Hg total e cada traíra recebeu, em média, 0,18 mg Hg total a cada 96 horas ao consumir 4 matrinxãs. Esse nível de mercúrio é comumente encontrado em espécies não carnívoras que geralmente servem de presas para traíras.

KITAHARA et al. (2000) avaliaram níveis de Hg total em pescados de água doces comumente comercializados em São Paulo. Os resultados obtidos para as espécies mandi (*Pimelodus maculatus*), tilápia (*Tilapia* sp), sagüiru (*Cyphocharax modestus*), lambari (*Astyanax*

sp), sardela (*Triportheus* sp), curimatã (*Prochilodus* sp) e dourado (*Salminus* sp), comercializadas em São Paulo, e para o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*), curimatã (*Prochilodus nigricans*) e matrinxã (*Brycon* sp), procedentes da Amazônia brasileira, variaram de 0,01 a 0,39 mg Hg.kg<sup>-1</sup>.

BOLDRINI et al (1983) encontraram níveis de Hg total de 0,09 a 0,84 mg.kg<sup>-1</sup> em espécies de *Astyanax* nos rios Mogi Guaçu e Pardo no estado de São Paulo. ROCHA et al. (1985) encontraram níveis de Hg total de 0,07 a 0,71 mg.kg<sup>-1</sup> em tilápia (*Tilapia rendalli*) coletadas na Represa Billings em São Paulo.

FRACALANZA (2007) avaliando a concentração de mercúrio em peixes da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul (SP), encontrou para o acarã (*Geophagus brasiliensis*) a concentração de 0,15 a 0,40 mg.kg<sup>-1</sup> e para o peixe bocarra (*Oligosarcus hepsetus*), níveis de Hg total de 0,4 a 1,4 mg.kg<sup>-1</sup>.

TUOMOLA et al. (2008) avaliaram o conteúdo de Hg total em piracanjubas (*Brycon hilarii*) coletadas no Reservatório do Lago Manso em Cuiabá, Mato Grosso. Os autores encontraram níveis de Hg total de 0,07 a 1,03 mg.kg<sup>-1</sup>.

Dessa forma, se presas de pequeno porte variam de 30 a 50 g, a dose de mercúrio que cada traíra recebeu no presente trabalho, é uma dose real que pode ocorrer na natureza levando-se em consideração o conteúdo de mercúrio total encontrado em peixes coletados em águas brasileiras, em espécies que comumente servem de presas para traíras.

Adicionalmente, a literatura sobre *H. malabaricus* mostra que os adultos são piscívoros e podem se alimentar de peixes inteiros, tanto de pequeno como de grande porte (RESENDE et al., 1996; ALMEIDA et al., 1997; CARVALHO et al., 2002). Segundo PETRY et al. (2007), traíras aclimatadas a 26 °C em laboratório chegam a consumir de 10 a 25 presas de aproximadamente 5 cm de comprimento. assim, conforme a disponibilidade de alimento, não se pode descartar a possibilidade de que a contaminação via trófica na natureza possa ocorrer em magnitude maior do que aquela utilizada no presente estudo.

Ao final do período experimental as traíras foram sacrificadas por transecção da coluna espinal. Em seguida, o fígado, as brânquias, o coração e uma amostra de músculo branco da parte superior da linha lateral próxima à região cefálica foram coletados e devidamente dissecados. Os tecidos foram lavados em salina 0,9% para retirada de impurezas, secos superficialmente em papel filtro, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a -80°C para posterior análise da concentração de Hg total.

### 2.3 Quantificação do Teor de Mercúrio Total

A determinação do conteúdo de Hg total na água e nos tecidos dos matrinxãs e das traíras bem como nos matrinxãs inteiros usados como dieta para as traíras, foi realizada no Laboratório de Metais da empresa Bioagri Laboratórios, Piracicaba (SP). Esta empresa segue os requisitos exigidos pelos Sistemas de Qualidade NBR/ISO/IEC 17025 e Boas Práticas de Laboratório, os equipamentos são calibrados por laboratórios acreditados pela Rede Brasileira de Calibração (RBC) e a empresa possui acreditação no INMETRO (CRL 208) e credenciamento no Ministério da Agricultura.

As amostras de água foram coletadas das caixas experimentais (Ct e HgCl<sub>2</sub>) no início (4 horas após a adição de HgCl<sub>2</sub> a partir da solução estoque) e no final experimento (após 96 horas). A coleta das amostras foi realizada em frascos de polietileno de alta densidade com tampa do mesmo material. Para garantir a estabilidade da solução do metal evitando perdas por adsorção e/ou volatilização, adicionou-se em cada 100 mL de amostra coletada 5 mL de HNO<sub>3</sub> a 40% (LEERMAKERS et al., 1990; LOO & WAI, 1975; WEISS et al., 1976). Os frascos foram completados com água até transbordarem, sem deixar vestígios de bolhas na superfície, armazenados a 4°C e remetidas a Bioagri Laboratórios no prazo máximo de 24 horas. Durante o transporte as amostras foram mantidas em isopor com gelo para manter o resfriamento a 4°C. As amostras de tecidos dos matrinxãs e das traíras bem como os exemplares de matrinxã de pequeno porte inteiros utilizados na alimentação das traíras foram transportados para a empresa em nitrogênio líquido.

O Hg total foi determinado em amostras de água da exposição aguda a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por espectrofotometria de fluorescência atômica com geração de vapor a frio de acordo com método descrito pela EPA (2005), capaz de detectar níveis traço de mercúrio na água com um limite de quantificação de 0,05 µg.L<sup>-1</sup>. As amostras de água foram passadas por filtro de 0,45 µm. Todo Hg presente na amostra foi oxidado por brometo/bromato de potássio (KBr e KBrO<sub>3</sub>, respectivamente). Após a oxidação, as amostras foram pré-reduzidas com cloridrato de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH. HCl) para destruir o excesso de brometo e, então, o Hg iônico foi reduzido com cloreto de estanho (SnCl<sub>2</sub>) para converter Hg (II) em Hg<sup>0</sup> volátil. O Hg<sup>0</sup>, por sua vez, foi liberado na célula do espectrofotômetro de fluorescência de absorção atômica com geração de vapor a frio (GFAFS) e detectado em 253,7 nm.

O teor de Hg total nos diferentes tecidos dos matrinxãs e das traíras foi determinado por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, de acordo com o método descrito pela United States Pharmacopeia (USP, 2000). Aproximadamente 1 g de cada amostra de tecido foi diretamente pesado no balão de fundo chato e foram adicionados 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P.A. e 5 mL de HNO<sub>3</sub> P.A. O balão foi acoplado a um condensador e levado ao

aquecimento em manta aquecedora a 250 °C. Após total liberação de fumos marrons foram adicionados mais 2 mL de HNO<sub>3</sub> P.A. e o balão foi aquecido por mais 15 minutos. A solução da amostra foi resfriada e 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) foram adicionados, aquecendo-se novamente a amostra por 15 minutos. Em seguida, 200 µL de solução de dicromato de potássio 20% (m/v) foram adicionados à solução da amostra e esta foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com água ultra pura. O mercúrio da amostra foi reduzido com um solução SnCl<sub>2</sub> 25 % (m/v) em HCl 20% (v/v). As leituras foram feitas a 254 nm utilizando um espectrômetro Varian Spectra AA 240 FS acoplado com um gerador de vapor Varian Vapor Generation VGA 77. A curva analítica também foi preparada com 200 µL de solução de dicromato de potássio 20% (m/v).

O mesmo procedimento foi aplicado para a análise de Hg total nos matrinxãs utilizados na alimentação das traíras e os usados para a medida da depuração do mercúrio. Entretanto, a pré-digestão com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HNO<sub>3</sub> (1:1 v/v) foi realizada com os peixes inteiros. Após as etapas sucessivas do método, descritas anteriormente, a solução da amostra foi devidamente diluída para a leitura em espectrômetro de acordo com a linearidade da curva analítica. Como os matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> eram oferecidos a cada 96 h para as traíras que permaneciam em água limpa, havia a possibilidade de que algum animal ficasse no tanque e não fosse imediatamente devorado pelas traíras. Dessa forma, foi avaliada a depuração do Hg total em matrinxãs inteiros expostos durante 96 horas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> que permaneceram por mais 96 horas em água limpa.

Com os resultados obtidos foi calculado o fator de bioacumulação (FBC) do cloreto de mercúrio para cada tecido de matrinxã, *B. amazonicus*. Em termos genéricos, o FBC é uma constante de proporcionalidade que corresponde à razão entre a concentração de mercúrio no tecido e a concentração do mesmo na água (BARRON, 1990; BURATINI & BRANDELLI, 2006). O FBC é dado pela fórmula:  $FBC = C_o/C_a$ , onde  $C_o$  é a concentração do composto no peixe (mg.kg<sup>-1</sup>) e  $C_a$  é a concentração real do composto na água (mg.L<sup>-1</sup>). O FBC também foi calculado para os pequenos matrinxãs utilizados na alimentação das traíras.

Para verificar o quão biodisponível o Hg está para as traíras a partir das presas de matrinxãs contaminadas com HgCl<sub>2</sub> foram calculados fatores de transferência trófica (FTT). Os FTT para os diferentes tecidos de traíra foram estimados como  $FTT = (C_n/C_{n-1})$ , onde,  $C_n$  são as concentrações de Hg nos tecidos do nível trófico superior e  $C_{n-1}$  são as concentrações no primeiro nível trófico inferior, ou seja, na presa conforme descrito por DeFOREST et al. (2007). O FTT é um termo geral que pode incluir tanto a biomagnificação, onde a concentração do xenobiótico no organismo é maior que aquela presente na dieta, e a biodiluição, onde a concentração do xenobiótico no organismo é menor que da sua dieta.

## 2.4 Quantificação do Teor de Metilmercúrio

Durante o período da exposição trófica e sub-crônica das traíras ao mercúrio, matrinxãs de pequeno expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 horas utilizados na alimentação das traíras foram coletados e sacrificados por transecção da coluna vertebral e congelados em nitrogênio líquido para análise da concentração de metilmercúrio.

Essa análise foi realizada no Centro de Qualidade Analítica Ltda. - CQA Laboratórios (Campinas, SP) que é um laboratório analítico ISO 17025:2005 acreditado pelo INMETRO, habilitado pela ANVISA e capacitado para realização dessa análise em amostras de peixe. Os exemplares de matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  bem como exemplares controle foram transportados para a empresa em nitrogênio líquido. A determinação de metilmercúrio foi realizada por cromatografia gasosa- espectrometria de massa (CG-MS) de acordo com o método da AOAC (1995). As amostras foram preparadas baseadas na digestão ácida com HCl 6 M seguida de extração com tolueno. Antes da injeção do em CG-MS, as amostras passaram por processos de “clean up” do extrato.

## 2.5 Tratamento dos Rejeitos de Mercúrio

Todos os procedimentos para o tratamento dos efluentes contendo Hg gerados no presente estudo bem como das carcaças dos peixes contaminados estão descritos detalhadamente no capítulo anterior (Capítulo II).

## 2.6 Tratamento Estatístico dos Dados

Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. O teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade foi aplicado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre os grupos experimentais (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Parâmetros Físico-Químicos e Quantificação do Mercúrio Total na Água

Todos os matrinxãs dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> (exposição por 96 horas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub>) sobreviveram após as 96 horas de experimento. A concentração de Hg total bem como as análises dos parâmetros físico-químicos da água estão apresentadas na Tabela 1, expressas como média dos valores obtidos a partir das amostras de água coletadas ao longo do período experimental. A adição de HgCl<sub>2</sub> não resultou em alteração de nenhuma das características físico-químicas da água durante o ensaio experimental.

**Tabela 1:** Características físico-químicas e níveis de mercúrio total na água do grupo controle (Ct) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96h (HgCl<sub>2</sub>), medidas ao longo do período experimental. Os valores são médias ± E.P.M. das quatro amostras de água coletadas a cada 24 horas de experimento, com exceção da análise de mercúrio, onde amostras de água (n = 3) foram coletadas após 4 horas de adição do HgCl<sub>2</sub>.

Parâmetros físico-químicos da água e concentração de Hg total	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
pH	7,32 ± 0,03	7,40 ± 0,02
Temperatura (°C)	24,98 ± 0,25	24,92 ± 0,35
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	7,46 ± 0,32	7,13 ± 0,29
Amônia (mg.L <sup>-1</sup> )	1,10 ± 0,24	1,09 ± 0,27
Cloreto (mg.L <sup>-1</sup> )	38,99 ± 1,94	37,01 ± 0,82
Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )	0,54 ± 0,23	0,53 ± 0,21
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	39,48 ± 2,44	37,30 ± 2,49
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	44,06 ± 3,16	44,03 ± 2,73
Condutividade elétrica (µS.cm <sup>-1</sup> )	122,53 ± 3,27	126,60 ± 1,70
Mercúrio total (µg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	<LQ	106 ± 21,2

<sup>1</sup> Valores obtidos através da análise de espectrofotometria de fluorescência atômica

LQ = limite de quantificação (0,05 µg.L<sup>-1</sup>)

\* indica diferença significativa em relação à água do controle com 95% de confiança.

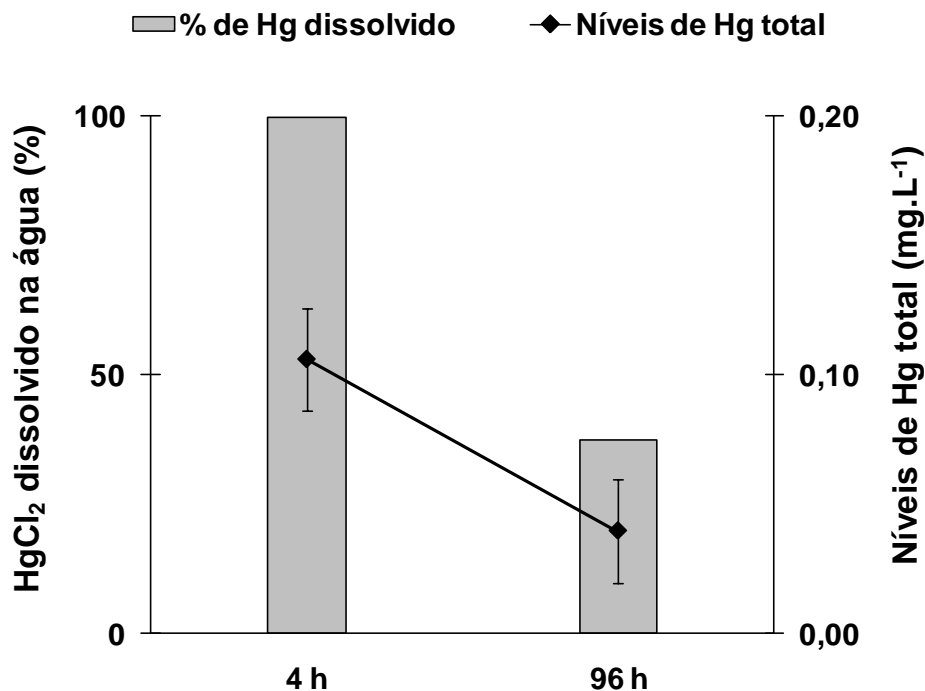


A análise do nível de Hg total na água revelou uma concentração real  $0,106 \pm 0,021$  mg.L<sup>-1</sup> de Hg total para a concentração nominal de  $0,15$  mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> utilizada. Em média, o valor de mercúrio total encontrado na água após 96 horas de exposição de matrinxãs (1 g peixe/L água) a  $0,15$  mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> foi de  $0,04 \pm 0,002$  mg.L<sup>-1</sup> (Figura 1), restando em média 37% do valor inicial medido após 4 horas de adição do Hg ( $0,106 \pm 0,02$  mg.L<sup>-1</sup>).

Essa perda de Hg está diretamente relacionada à acumulação do metal pelos peixes e/ou a sua adsorção ao material particulado ou a parede das caixas experimentais, resultando em uma concentração real de Hg total menor do que o valor nominal. A média da concentração de Hg na água durante o período experimental foi determinada pela regra do trapézio simples (OLIVEIRA RIBEIRO, 2000):

$$\frac{[(Pt' + Pt) \cdot 0,15 \text{ mg.L}^{-1} \cdot (t' - t)/2]}{96 \text{ h}}$$

Pt' e Pt representam, respectivamente, as porcentagens final e inicial da concentração de mercúrio na água medidas no tempo final (t' = 96 horas) e inicial (t = 4 horas). Através deste cálculo, a média da concentração de Hg total na água durante 96 horas de experimento foi de aproximadamente  $0,0985$  mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 1:** Evolução temporal da concentração de Hg inorgânico na água durante a exposição de matrinxãs, *B. amazonicus*, por 96 horas, a  $0,15$  mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>. Os valores são médias  $\pm$  E.P.M. de amostras de água (n = 3) coletadas 4 e 96 horas de adição do HgCl<sub>2</sub>.

## 3.2 Concentração de Mercúrio Total nos Peixes

### 3.2.1 Concentração de mercúrio total nos tecidos de matrinxã

Os níveis mercúrio total nos tecidos de matrinxãs controles (Ct) e expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>), estão apresentados na Tabela 2. Após a exposição aguda ao HgCl<sub>2</sub>, por 96 horas, as brânquias e o fígado foram os tecidos que mais acumularam mercúrio, seguidos pelo coração e músculo branco. Dessa forma, o padrão de bioacumulação do mercúrio inorgânico em matrinxã seguiu esta ordem: brânquias (B) > fígado (F) >> coração (C) > músculo branco (M). Foram observadas as seguintes razões: HgB:HgM de ~ 28:1, HgF:HgM de ~ 16:1, HgC:HgM 11:1, indicando uma bioacumulação 28 vezes maior nas brânquias, 16 vezes maior no fígado e 11 vezes maior no coração em relação ao músculo branco, tecido que apresentou menor conteúdo de Hg total.

**Tabela 2:** Níveis de mercúrio total (mg.kg tecido<sup>-1</sup>) nos tecidos de matrinxãs dos grupos controle (Ct) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>).

Tecidos analisados	Mercúrio Total (mg.kg tecido <sup>-1</sup> )	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
Fígado	<LQ (0,025)	10,46 ± 0,60
Brânquias	<LQ (0,010)	17,80 ± 1,83
Músculo branco	<LQ (0,028)	0,63 ± 0,05
Coração	<LQ (0,006)	7,23 ± 0,10 <sup>•</sup>

Valores médios ± E.P.M. (n = 6)

• = pool de 10 animais

LQ = limite de quantificação (0,05 mg.kg<sup>-1</sup>)

Em todos os tecidos analisados dos matrinxãs controles, os níveis de mercúrio total observados foram menores que o limite de determinação (0,05 mg.kg<sup>-1</sup>) do método de análise e os seus valores médios estão representados entre parênteses na Tabela 2. Em todos os tecidos analisados (incluindo o filé usado na alimentação de humanos), os níveis de mercúrio total ultrapassaram os limites de tolerância da OMS de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> após a exposição aguda por 96 horas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>.

Para verificar a disponibilidade do  $\text{HgCl}_2$  para os matrinxãs a partir da água, foram estimados fatores de bioconcentração (FBC) estimados como  $\text{FBC} = \text{Cb}/\text{Cw}$ , onde, Cb são as concentrações de Hg total nos diferentes tecidos de matrinxã e Cw a concentração real na água ( $0,106 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Os FBC do cloreto de mercúrio em cada um dos tecidos de matrinxã são encontrados na Tabela 3. Os maiores FBC foram encontrados para as brânquias, fígado e coração, tecidos que mais bioconcentraram mercúrio a partir da água (~ 168, 99 e 68 vezes a mais, respectivamente).

**Tabela 3:** Fatores de bioconcentração do mercúrio (FBC) e seus logaritmos em fígado, brânquias, músculo branco e coração de matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 horas.

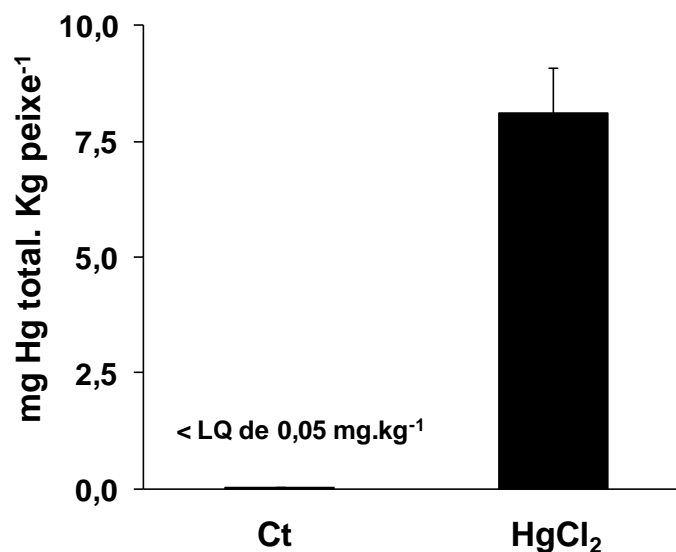
Tecidos analisados	FBC	log [FBC]
Fígado	$98,66 \pm 5,68$	1,99
Brânquias	$167,95 \pm 17,31$	2,22
Músculo branco	$5,94 \pm 0,49$	0,77
Coração	$68,20 \pm 0,50$	1,83

### 3.2.2 Concentração de mercúrio total nos exemplares inteiros de matrinxã usados na alimentação das traíras.

A Figura 2 mostra os níveis de Hg total ( $\text{mg.kg peixe}^{-1}$ ) nos matrinxãs inteiros, expostos ou não a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 horas  $\text{HgCl}_2$  e que foram utilizados na alimentação de traíras do grupos experimentais Ct e Hg. Os níveis de Hg nos matrinxãs controles ficaram abaixo do limite de quantificação de  $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Após 96 horas de exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , os matrinxãs inteiros apresentaram o valor médio de Hg total de  $8,11 \pm 0,96 \text{ mg.kg peixe}^{-1}$ . Como os pequenos matrinxãs tinham massa de 5 a 6 g, as traíras alimentadas com esses peixes receberam a dose aproximada de  $0,045 \text{ mg}$  de Hg/matrinxã. Como a proporção de alimentação foi de 4 matrinxãs para cada traíra, as traíras receberam aproximadamente  $0,2 \text{ mg}$  de Hg a cada 96 horas. Sendo a massa média das traíras de  $246,32 \pm 13,92 \text{ g}$ , as mesmas receberam em torno de  $0,8 \text{ mg}$  de Hg por kg de massa corpórea.

Para verificar a disponibilidade de  $\text{HgCl}_2$  na água para os matrinxãs utilizados na

alimentação das traíras, estimou-se o fator de bioconcentração (FBC) como  $FBC = C_b/C_w$ , onde,  $C_b$  é a concentração de Hg total nos pequenos matrinxãs e  $C_w$  a concentração real na água ( $0,106 \text{ mg.L}^{-1}$ ). O valor do FBC obtido foi de 76,5, ou seja, os pequeunos exemplares de matrinxãs conseguem bioconcentrar o mercúrio 76,5 vezes mais do que os níveis do metal na água.

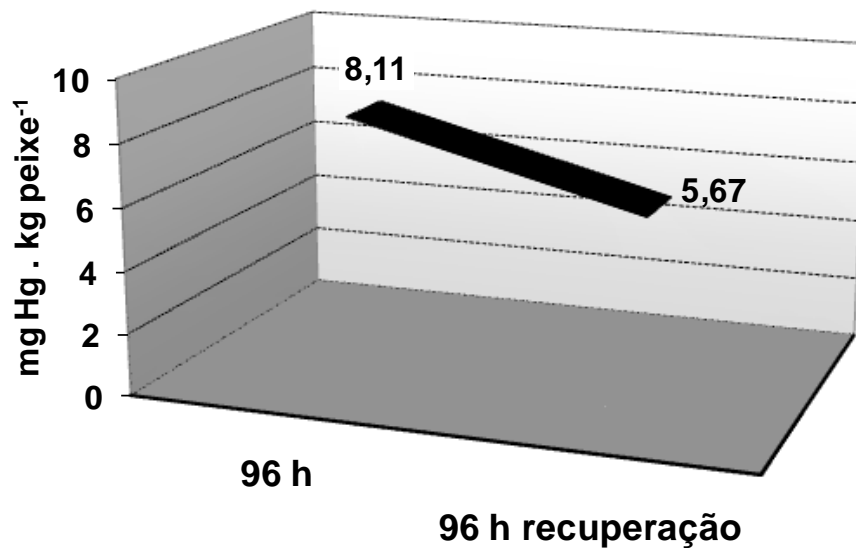


**Figura 2:** Conteúdo de Hg total nos matrinxãs inteiros dos grupos controle (Ct) e exposto a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 horas ( $\text{HgCl}_2$ ) usados na alimentação das traíras dos grupos experimentais Ct e Hg. Valores são médias  $\pm$  E.P.M ( $n = 6$ ).

### 3.2.3 Avaliação da depuração de Hg nos exemplares de matrinxã usados na alimentação das traíras

A Figura 3 mostra os valores médios dos níveis de mercúrio em matrinxãs inteiros após exposição por 96 horas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  e que permaneceram por mais 96 horas em água limpa. Houve cerca de 30% de depuração do mercúrio nos matrinxãs após 4 dias de recuperação em água limpa.

Cabe ressaltar que essa análise foi realizada porque os matrinxãs contaminados por  $\text{HgCl}_2$  eram oferecidos a cada 96 horas para as traíras que permaneciam em água limpa havendo, assim, a possibilidade de que algum animal ficasse no tanque e não fosse imediatamente devorado pelas traíras. Entretanto, as traíras alimentadas com matrinxãs contaminados com Hg atacavam as presas imediatamente quando eram oferecidas.



**Figura 3:** Depuração do Hg total em matrinxãs inteiras expostas durante 96 h a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  que permaneceram por mais 96 h em água limpa. Valores são médias  $\pm$  E.P.M ( $n = 6$ ).

### 3.2.4 Concentração de metilmercúrio nos exemplares de matrinxã usados na alimentação das traíras

Nos exemplares inteiros de matrinxãs expostos por 96 h a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  e usados na contaminação trófica das traíras, os níveis de metilmercúrio encontrados ficaram abaixo do limite de quantificação do método de 1 ppb, ou seja, menor que  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

### 3.2.5 Concentração de mercúrio total nos tecidos de traíra

Após a exposição sub-crônica ao  $\text{HgCl}_2$ , por via trófica, as brânquias e o fígado foram os tecidos que mais acumularam mercúrio, seguidos pelo coração e músculo branco (Tabela 4). Dessa forma, o padrão de bioacumulação do mercúrio em traíra seguiu esta ordem: brânquias (B) > fígado (F) >> coração (C) > músculo branco (M). Foi observada uma razão de  $\text{HgB}:\text{HgM}$  de  $\sim 10:1$  e uma razão de  $\text{HgF}:\text{HgM}$  de  $\sim 7:1$ , indicando uma bioacumulação 10 vezes maior nas brânquias e 7 vezes maior no fígado, em relação ao músculo branco, tecido que apresentou menor conteúdo de Hg total. Em todos os tecidos analisados das traíras do Ct, os níveis de mercúrio total observados foram menores que o limite de determinação ( $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) do método de análise e os seus valores médios estão representados entre parênteses na Tabela 3. Somente nas brânquias e no fígado, os níveis de mercúrio total ultrapassaram os limites de tolerância da OMS de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  após a exposição trófica e sub-crônica ao metal.

**Tabela 4:** Níveis de mercúrio total (mg.kg tecido<sup>-1</sup>) nos tecidos das traíras alimentadas com matrinxãs controles (Ct) ou com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>).

Tecidos analisados	Mercúrio Total (mg.kg tecido <sup>-1</sup> )	
	Ct	Hg
Fígado	<LQ (0,032)	1,083 ± 0,098
Brânquias	<LQ (0,028)	1,567 ± 0,010
Músculo branco	<LQ (0,036)	0,162 ± 0,009
Coração	<LQ (0,012)	0,85 ± 0,010 •

Valores médios ± E.P.M. (n = 6)

• = pool de 7 animais

LQ = limite de quantificação (0,05 mg.kg<sup>-1</sup>)

Para verificar a disponibilidade do Hg para as traíras a partir dos matrinxãs contaminadas com HgCl<sub>2</sub> foram calculados fatores de transferência trófica (FTT). Os FTT para os diferentes tecidos de traíra estão apresentados na Tabela 5. Cabe ressaltar que os FTT são referentes aos tecidos, ou seja, a concentração de Hg total em cada tecido das traíras (mg.kg de tecido<sup>-1</sup>) foi dividida pela concentração de mercúrio total encontrada nos matrinxãs inteiros (mg.kg de peixe<sup>-1</sup>) que serviram de presas para o Hg. Os maiores FTT foram encontrados para as brânquias, fígado e coração.

**Tabela 5:** Fatores de transferência trófica (FTT) do mercúrio em fígado, brânquias, músculo branco e coração de traíras alimentadas com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>).

Tecidos analisados	FTT
Fígado	0,134 ± 0,012
Brânquias	0,193 ± 0,001
Músculo branco	0,020 ± 0,001
Coração	0,104 ± 0,001

#### 4. DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo referentes à bioacumulação do Hg nos tecidos de matrinxã após a exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  suportam os resultados descritos nos trabalhos de Elia et al. (2003) e Oliveira-Ribeiro et al. (1996, 2000). Houve uma acumulação significativa do mercúrio em todos os tecidos dos matrinxãs seguindo a ordem: brânquias ( $17,80 \pm 1,83 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) >> fígado ( $10,46 \pm 0,60 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) >> coração ( $7,23 \pm 0,10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) > músculo branco ( $0,63 \pm 0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Todos os tecidos dos peixes controles apresentaram valores de mercúrio abaixo do limite de determinação uma vez que os animais não tiveram nenhum contato com o metal.

É importante destacar que a concentração de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  utilizada no presente trabalho é uma concentração nominal, pois parte do mercúrio inorgânico acaba se aderindo ao material particulado em suspensão e/ou adsorção pelos peixes, conforme os valores de Hg total na água ( $0,106 \pm 0,021 \text{ mg.L}^{-1}$ ) obtidos por análise por espectrofotometria de fluorescência atômica. No sistema estático utilizado no presente trabalho, a média da concentração de Hg na água durante o período experimental, determinada pela regra do trapézio simples, foi de aproximadamente  $0,0985 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo que após 96 horas de exposição de matrinxãs (1 g peixe/L água) a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  restou, em média, 37% do valor inicial de Hg. Dessa forma, mesmo com um sistema estático de exposição e a adsorção do mercúrio, o metal acumulou-se significativamente nos tecidos dos matrinxãs expostos, mostrando-se com um elevado potencial de bioconcentração a partir da água.

Segundo Black et al. (2007), cálculos de especiação química do cloreto de mercúrio em águas doces de pH 7,7 e com concentrações de cloreto inferiores a 5 mM assumem que a quantidade de  $\text{Hg}^{2+}$  é insignificante e que os complexos inorgânicos dominantes são  $\text{Hg}(\text{OH})_2(\text{aq})$ ,  $\text{HgClOH}(\text{aq})$  e  $\text{Hg}(\text{Cl})_2(\text{aq})$ , todos definidos como hidrofóbicos por não apresentarem cargas e, portanto, capazes de atravessar membranas biológicas mais facilmente que o  $\text{Hg}^{2+}$ . O mercúrio inorgânico pode ser assim absorvido pelas brânquias dos peixes. Klinck et al. (2005), estudando trutas arco íris (*O. mykiss*) expostas a 0,135; 0,27 e 0,54  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , observaram que a captação do Hg inorgânico ocorre principalmente por meio de difusão passiva de complexos neutros ( $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ , etc) através das brânquias. Os autores ainda verificaram uma alta constante de ligação Hg - brânquias, que excede muitas vezes a constante de ligação observada para outros metais como prata e cádmio. Em concordância com esses resultados, as brânquias dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  acumularam mais mercúrio que os demais tecidos analisados, provavelmente, devido a essa alta constante de ligação Hg - brânquias.

Em peixes que vivem em águas poluídas, a maioria dos metais tendem a acumular-se principalmente no fígado, rins e brânquias, enquanto os músculos contêm geralmente níveis baixos de metais (JEZIERSKA & WITESKA, 2007). A forma predominante de mercúrio no tecido

muscular é a metilada. Em outros tecidos, como fígado, rins e baço, sua forma predominante é a inorgânica, excedendo os valores encontrados no músculo (WINDOM & KENDALL, 1979; MALM et al., 1995; KEHRIG et al., 2002). Baixas concentrações de mercúrio também foram encontradas no músculo do peixe de água doce *Phoxinus phoxinus* após a exposição a  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de Hg inorgânico (CUVIN-ARALAR & FURNESS, 1990).

Oliveira-Ribeiro et al. (1996), avaliando a acumulação do Hg inorgânico no peixe gato *T. zonatus* após 96 h de exposição a  $15 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  (~ 1/10 da concentração utilizada no presente estudo), observaram níveis de mercúrio total de aproximadamente 3,0; 2,0 e  $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$  para brânquias, fígado e músculo branco, respectivamente. No bagre *I. melas*, a exposição por 10 dias a  $140 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (concentração próxima a utilizada no presente estudo) promoveu um acúmulo de mercúrio total na ordem de 15,28; 8,06 e  $0,80 \text{ mg.kg}^{-1}$  nas brânquias, fígado e músculo branco, respectivamente (ELIA et al., 2003). Boudou & Ribeyre (1983) observaram que alevinos<sup>1</sup> de truta arco-íris acumularam  $0,57 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Hg em 30 dias quando expostos a  $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{HgCl}_2$  dissolvidos na água. Trutas (*Salmo trutta*) de 30 g acumularam  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Hg quando expostas a  $0,150 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por cinco dias (SKAK e BAATRUP, 1993). Larvas de *P. promelas* quando expostas por 60 dias a  $0,00369 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  dissolvidos na água acumularam  $18,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Hg (SNASRKI e OLSON, 1982). A bioacumulação dos metais pesados nos peixes depende da via de absorção, encontrando-se níveis elevados nas brânquias no período inicial de exposição via água, enquanto que o sistema digestivo, fígado e rim acumulam grandes quantidades de metais pesados em situações de exposição por via alimentar. Contudo, o fígado apresenta normalmente concentrações elevadas de metais, independentemente da via de exposição (TELES, 2006).

De forma geral, o FBC de um elemento químico num organismo consiste no coeficiente de partição do elemento entre o organismo e o meio em que se encontra. Assim, o valor numérico do FBC indica o grau de partição do poluente entre o organismo e o meio. No presente trabalho, os FBCs obtidos para os diferentes tecidos de matrinxã após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  foram de aproximadamente 6 para o músculo branco, 68 para o coração, 98 para o fígado, 168 para as brânquias e 76 para os os pequenos exemplares de matrinxãs inteiros. FBCs menores que 100 indicam que o composto não apresenta bioconcentração substancial (BURATINI & BRANDELLI, 2006). Hill et al., (1996) estudaram a especiação do mercúrio nos peixes de água doce “stonerollers” (*Campostoma anomalum*) e “striped shiners” (*Luxilus chyssocephalus*) coletados de 3 pontos de um rio contaminado por mercúrio de origem industrial no Tennessee (Canadá). Os autores verificaram que o mercúrio inorgânico foi a forma predominante do metal em

<sup>1</sup> De acordo com Gomes et al. (2003), alevino é um termo utilizado somente para descrever uma fase de vida de peixes da família Salmonidae (salmões e as trutas), sendo um estágio inicial com saco vitelínico, fase correspondente aos estádios larvais dos peixes tropicais. A utilização desse termo para as espécies nativas, apesar de usual, não é correto, pois os peixes tropicais não possuem a fase de alevino durante seu desenvolvimento biológico, além do que a fase de desenvolvimento dos salmonídeos chamada alevino não corresponde à mesma fase de desenvolvimento dos peixes tropicais.



ambas as espécies, mostrando que o mercúrio inorgânico é incorporado em grandes quantidades pela biota aquática. FBCs menores que os encontrados no presente estudo foram observados por Oliveira-Ribeiro et al. (1996) ao avaliarem a bioacumulação do  $\text{HgCl}_2$  no peixe-gato tropical, *T. zonatus*, após a exposição por 96 horas a  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Hg inorgânico (~ 1/10 da concentração utilizada no presente estudo). Enquanto o fator de bioacumulação de cloreto de mercúrio se apresenta de baixo a moderado, fatores de bioacumulação extremamente elevados (superiores a 1000) são registrados para o metilmercúrio (LIAO et al., 2005; LIAO et al., 2006).

Os logaritmos dos fatores de bioconcentração do mercúrio inorgânico nos diferentes tecidos de matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  variaram de 0,77 a 2,22, sendo os valores maiores que 1,00 encontrados para as brânquias e fígado. Valores de log FBC próximos de 1 mostram que o composto não é cumulativo nos peixes. Dessa forma, o cloreto de mercúrio apresentou uma capacidade moderada de bioconcentração a partir da água nos matrinxãs. HILL et al. (1996) encontraram em peixes coletados de áreas impactadas pelo mercúrio logs dos FBCs de 0,5 a 1,5 unidades para o mercúrio inorgânico (valores próximos aos encontrados para os matrinxãs do presente estudo) e de 2 a 3 unidades de log para o metilmercúrio.

Com base no trabalho de Briggs (1981), o fator de bioconcentração de um xenobiótico em peixes pode ser estimado pela equação  $\log \text{FBC} = 0,87 \log \text{Kow} - 0,62$ , em que Kow é o coeficiente de partição do composto entre octanol e água. Assumindo o valor de 3,33 para o log Kow do cloreto de mercúrio (MASON et al., 1996; NAJERA et al., 2005), o valor estimado do fator de bioconcentração do composto (FBC) em peixes é de 2,27, que é próximo dos observados no presente trabalho. Compostos muito lipofílicos revelaram fatores de bioconcentração em peixes na faixa de 3 a 6 ordens de magnitude, os quais são condizentes com os altos valores de Kow de tais compostos. De acordo com Gobas et al. (1999), xenobióticos com valores de  $\log \text{Kow} < 3$  ( $\text{FBC} < 100$ ) não apresentam bioconcentração substancial; já os que possuem  $\log \text{Kow}$  entre 3 e 6 ( $\text{FBC} > 100$ ) são classificados como altamente cumulativos. Entretanto, essa estimativa do FBC leva em conta somente as propriedades físico-químicas da substância, mas não seu comportamento dentro dos organismos vivos, o que está relacionado ao metabolismo e a eficiência de assimilação de cada espécie.

Embora o processo de partição seja o fator preponderante sobre o grau de bioacumulação de um composto químico, outros devem ser considerados, como: variações das condições ambientais (temperatura, salinidade), fisiologia e bioquímica dos organismos (biotransformações), outras propriedades físico-químicas do composto (configuração espacial da molécula, alterações na sua biodisponibilidade, etc) e, em especial, as características e afinidades específicas de cada tecido analisado. Assim, a utilização do log Kow é somente um indicador do potencial de bioacumulação. No presente estudo, esse indicador ficou muito próximo dos FBC encontrados para os diferentes tecidos de matrinxã, validando o uso dessa estimativa.

Os resultados mostram que a exposição aguda (96 horas) a concentração nominal e sub-letal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  promove a bioconcentração de maneira pronunciada nos tecidos do matrinxã. As concentrações de Hg nos diferentes tecidos dos matrinxãs, incluindo o filé, excederam o limite máximo de mercúrio permitido de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  para ingestão humana de acordo com a OMS para peixes não-carnívoros.

As traíras alimentadas por 30 dias com matrinxãs expostos por 96 horas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  exibiram o seguinte padrão de bioacumulação do mercúrio: brânquias ( $1,567 \pm 0,010 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) > fígado ( $1,083 \pm 0,098 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) >> coração ( $0,85 \pm 0,010 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) > músculo branco ( $0,162 \pm 0,009 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Dessa forma, os órgãos viscerais acumularam mais mercúrio da dieta do que os músculos cardíaco e esquelético. A acumulação significativa do mercúrio nas brânquias e no fígado é um indicativo que o metal se acumulou no sangue, o que sugere que o mercúrio da dieta está realmente biodisponível. O tempo de alimentação de 30 dias foi suficiente para o mercúrio ser distribuído através do corpo das traíras e começar a se bioacumular no músculo branco. Segundo Leaner & Mason (2004), o mercúrio tende a se acumular primeiramente nos órgãos viscerais e depois no músculo branco. Corroborando essa idéia, no músculo branco das traíras do grupo Hg não foi observado aumento significativo no conteúdo de MT, indicando uma bioacumulação do metal não suficiente para induzir a metaloproteína.

Os valores de mercúrio total nos tecidos das traíras do grupo Hg estão dentro dos valores encontrados na literatura. Régine et al. (2006) estudando níveis de mercúrio total em vários tecidos de diversas espécies de peixes de rio Maroni na Guiana Francesa (Bacia Amazônica), encontraram valores de mercúrio total variando de  $0,013$  a  $6,14 \text{ mg.kg}^{-1}$  no músculo, de  $0,055$  a  $1,30 \text{ mg.kg}^{-1}$  nas brânquias e de  $0,27$  a  $21 \text{ mg.kg}^{-1}$  no fígado. Salmões (*S. salar*) alimentados com dieta contendo  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , por 4 meses, apresentaram níveis médios de mercúrio total de  $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}$  no fígado,  $0,19 \text{ mg.kg}^{-1}$  nas brânquias e de  $0,31 \text{ mg.kg}^{-1}$  no músculo (BERNTSSEN et al., 2004).

O padrão de bioacumulação observado nos diferentes tecidos de traíras alimentadas com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  difere da maioria dos dados literatura, que mostram um acúmulo pronunciado do metal a partir da dieta no músculo de peixes (BARBOSA et al., 2003; AMLUND et al., 2007; VOEGBORLO et al., 2007; HAS-SCHON et al., 2008). Entretanto, esses estudos analisam a bioacumulação do Hg total através da dieta com metilmercúrio ou ainda analisam a bioacumulação em peixes piscívoros e/ou carnívoros coletados de regiões impactadas pelo metal, animais que se encontram mais expostos ao metilmercúrio devido a sua posição na cadeia alimentar e ao fenômeno de biomagnificação. Adicionalmente, no presente estudo, nos matrinxãs utilizados na alimentação das traíras não foram identificados níveis de metilmercúrio quantificáveis após a exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$ , o que pode resultar em tais discrepâncias. Os peixes acumulam as formas inorgânicas do Hg principalmente nos rins, seguido das brânquias e

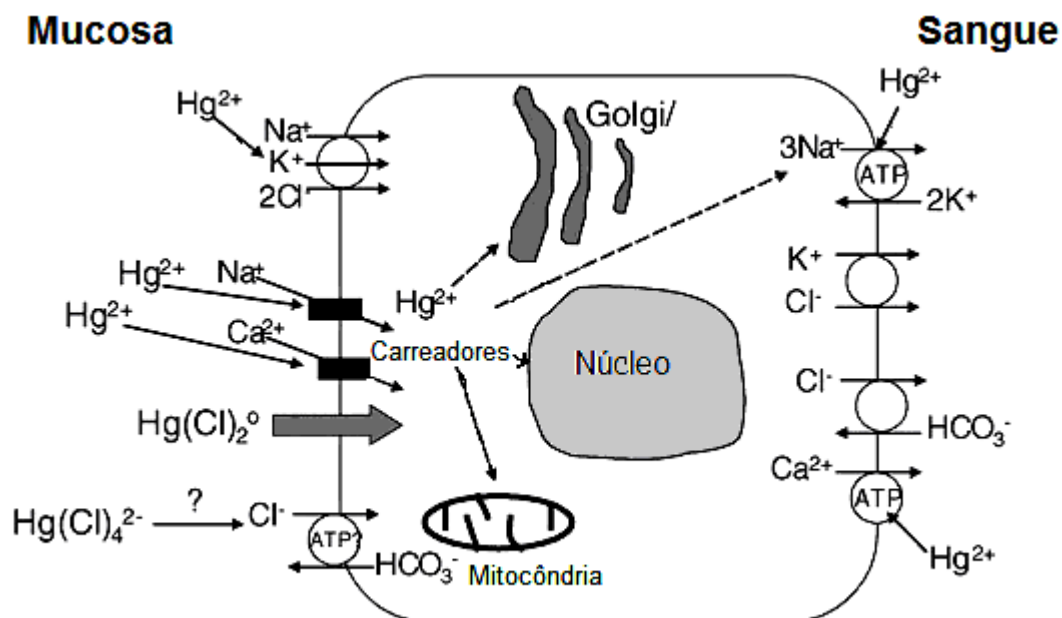
fígado (ELIA et al., 2003; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 1996, 2000), enquanto que as formas orgânicas se acumulam predominantemente no músculo branco (GONUL & KUCUKSEZGIN, 2007; MARSALEK et al., 2007).

Corroborando os resultados do presente estudo, Berntssen et al. (2004), avaliando os efeitos da alimentação durante 4 meses com dietas contendo metilmercúrio ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e cloreto de mercúrio ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) em salmão do Atlântico (*S. salar*), observaram que a forma inorgânica se acumula principalmente em intestino, nos rins e no fígado e apresenta baixa assimilação (4-6%), enquanto a forma orgânica se acumula preferencialmente no sangue, no fígado e no músculo com alta eficiência de assimilação (23-41%). Nenhum dos salmões alimentados com dieta contendo  $\text{HgCl}_2$  excedeu o limite máximo permitido para mercúrio total para o consumo humano. Os autores ainda verificaram que para os peixes alimentados com dieta contendo  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , a fração orgânica de Hg foi de cerca de 6% na dieta e 5% no filé. Já para os peixes alimentados com dieta contendo  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de  $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$ , a fração orgânica de Hg foi de cerca de 98% na dieta e no filé. Dessa forma, o músculo de peixes parece ser um importante sítio de acumulação de metilmercúrio.

A captação do mercúrio pelo intestino envolve várias etapas: i) adsorção do mercúrio pela mucosa; ii) captação do mercúrio através da membrana mucosa para o interior das células; iii) transporte intracelular do mercúrio e iv) exportação do mercúrio para a corrente sanguínea (FOULKES, 1991; FOULKES & BERGMAN, 1993; FOULKES, 2000). O mercúrio pode estar presente no intestino tanto na forma de metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$ ) como de mercúrio inorgânico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e, embora microorganismos no intestino sejam capazes de metilar o  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$  (RUDD et al., 1980), as duas formas são absorvidas pela membrana das células da mucosa (FOULKES, 1991, ANDRES et al., 2002). Os mecanismos de captação do mercúrio através da membrana das células intestinais não são muito conhecidos, principalmente em peixes (HANDY, 1996). Há várias vias hipotéticas para a captação do mercúrio inorgânico incluindo canais de  $\text{Na}^+$  e /ou  $\text{Ca}^{2+}$ , difusão eletroneutra de complexos de mercúrio ( $\text{Hg(OH)}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ , etc ) através da membrana celular e metilação do  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$  e subsequente captação por transportadores de aminoácidos (KARNISKI, 1992; BUSSELBER, 1995; BALLATORI, 2002; LEANER & MASON, 2002). O modelo para a captação do mercúrio inorgânico em intestino de vertebrados está apresentado na Figura 14, conforme proposto em revisão de Hoyle & Handy (2005).

A literatura específica mostra que todas essas vias potenciais são controversas. Hoyle & Handy (2005), estudando a absorção do mercúrio inorgânico em intestino de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram que os intestinos médio e posterior são os principais responsáveis pela absorção do mercúrio e que houve uma acumulação dose-dependente não linear ao longo do intestino, o que sugere um transporte mediado por carreadores para dentro das células intestinais e destas para o sangue. Os autores, ao investigarem os possíveis carreadores,

concluíram que a absorção do mercúrio pelas células intestinais ocorre parcialmente por canais de  $\text{Na}^+$  sensíveis a amilorida como o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , além de vias dependentes de energia. Andres et al. (2002) também observaram um componente dependente de energia na captação de mercúrio através da membrana basolateral no intestino do siri *Callinectes sapidus*, entretanto, esse componente foi responsável por uma pequena fração (~ 10%) da captação de Hg total. De acordo com Leaner & Mason (2002, 2004), o mercúrio da dieta é solubilizado e rapidamente transferido do intestino para o sangue na forma de complexos com grupos tióis através de carreadores de aminoácidos dependentes de energia. Segundo Clarkson & Magos (2006) é altamente provável que os complexos de mercúrio com pequenas moléculas tais como GSH e cisteína estão envolvidos na absorção do metal nas células intestinais.



**Figura 4** - Modelo proposto para a captação de mercúrio inorgânico em intestino de vertebrado. Adaptado de Hoyle & Handy (2005).

Cizdziel et al. (2003) estimaram que a concentração de mercúrio total em fígado de peixes será menor ou similar àquela encontrada no filé quando a concentração no músculo for  $< 0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Inversamente, quando a concentração de mercúrio total no filé for  $> 0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ , a concentração no fígado será maior do que a do músculo. Apesar de as causas exatas dessa relação não serem conhecidas, a especiação do Hg pode ajudar na sua compreensão. O mercúrio inorgânico, assim como todas as substâncias restantes que são digeridas e passam através da parede intestinal, circula primeiramente através do sistema portal hepático. O fígado (rico em

metaloproteínas como a MT) constitui, assim, a primeira via de acumulação do mercúrio inorgânico antes que o metal circule em outros tecidos.

Vários trabalhos já demonstraram que o metilmercúrio é eficientemente acumulado no músculo de peixes em comparação com as formas inorgânicas do metal (BOUDOU & RIBEYRE, 1985; BLOOM, 1992; HANDY & PENRICE, 1993). Esses estudos estão em concordância com o observado para as traíras alimentadas com matrinxãs expostos por 96 h a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , onde houve um menor acúmulo de Hg total no músculo branco. Os níveis de mercúrio nos filés das traíras ficaram abaixo do limite máximo de mercúrio permitido de  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  para ingestão humana de acordo com a OMS. Ainda que o músculo branco das traíras expostas por 30 dias troficamente ao Hg tenha apresentado concentrações médias de mercúrio abaixo do que estabelece a legislação, a frequência de consumo e a quantidade diária ingerida é um componente essencial na avaliação do risco de contaminação por mercúrio. Cabe ressaltar que contaminações crônicas tendem a aumentar a biomagnificação do metal, principalmente em se tratando de espécies carnívoras e/ou piscívoras (HILL et al., 1996, RÉGINE et al., 2006). Desta forma, a exposição contínua ao mercúrio por via alimentar, mesmo considerando as baixas concentrações do metal encontradas nas traíras, permite a hipótese de que, no decorrer do tempo, esta situação se agrave, principalmente em comunidades onde além do pescado, não é comum uma dieta diversificada (BRABO et al., 1999). Essa situação se agrava ao se considerar que a máxima ingestão diária permitida pela Agência de Segurança Alimentar Inglesa é de  $0,1 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$  de massa corporal (COT, 2002). Uma pequena parte do Hg inorgânico ingerido é metilada nos tecidos dos peixes (RUDD et al., 1980).

Assim, como a dieta das traíras foi composta de matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , uma proporção desse mercúrio inorgânico pode ter sido metilada nos tecidos dessas presas. No entanto, de acordo com Southworth et al. (1994), o Hg inorgânico quando é acumulado por contaminação direta (dissolvido na água) não é convertido para metilmercúrio dentro do peixe. No presente trabalho, o Hg encontrava-se dissolvido na água e, portanto, é provável que a concentração deste metal determinada nos peixes esteja na forma inorgânica. A análise de metilmercúrio nos matrinxãs usados na alimentação das traíras comprovou tais hipóteses, pois o conteúdo de Hg metilado nesses peixes ficou abaixo do limite de quantificação do método ( $1 \text{ ppb}$ ). Dessa forma, pode-se dizer que as traíras foram expostas troficamente ao Hg inorgânico. Neste estudo fatores como a baixa taxa de metilação do Hg aliada ao tempo de alimentação de 30 dias e a proporção de alimentação de 4 matrinxãs por traíra a cada 96 horas, podem não ter sido suficientes para levar a uma acumulação de Hg total acentuada no músculo branco das traíras, uma vez que este tecido acumula preferencialmente e mais facilmente o metilmercúrio. Por outro lado, conforme anteriormente discutido, a exposição aguda por 96 horas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  promoveu intensa bioconcentração do metal no músculo branco de matrinxã. Uma hipótese para

explicar esses diferentes padrões de bioacumulação do metal no músculo de tais espécies é a provável diferença no conteúdo de cisteína e/ou GSH muscular, cujo valor seria menor no músculo branco de traíra. Segundo Clarkson & Magos (2006) na prática todo o  $\text{Hg}^{2+}$  encontrado no sangue está ligado a um ligando endógeno, é provável que o transporte do  $\text{Hg}^{2+}$  para as células seja através de co-transporte do  $\text{Hg}^{2+}$  com a glutathiona e/ou cisteína. Conforme será discutido nos capítulos IV e V, os níveis de GSH encontrados no músculo branco de matrinxã e traíra foram de 0,58 e 0,22  $\mu\text{mol.g}$  de tecido<sup>-1</sup>, respectivamente.

O tempo de exposição ao Hg também influencia na sua bioacumulação em tecidos de peixes. Nesse sentido, Amlund et al. (2007) estudaram a acumulação e a eliminação de metilmercúrio no bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) após 3 meses de alimentação com dieta contendo 1 mg/kg de cloreto de metilmercúrio. A média da concentração de Hg total no músculo branco dos peixes expostos foi de  $0,38 \pm 0,04 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tanto o período de alimentação como a média da concentração de Hg foram três vezes superiores aos do presente trabalho. Amlund et al. (2007) ainda verificaram que o tempo de meia vida de eliminação do mercúrio no músculo foi de 377 dias, sugerindo que o metal é vagorosamente eliminado desse tecido. Barbosa et al. (2003), analisando a biomagnificação do mercúrio no Rio Negro na região Amazônica, encontraram valores de mercúrio total de 0,06 até  $0,448 \text{ mg.kg}^{-1}$  em músculo branco de 12 espécies de peixes piscívoros, entre eles a traíra ( $0,120 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Hg total). Belger & Forsberg (2006) encontraram uma média de  $0,35 \text{ mg.kg}^{-1}$  de mercúrio total em músculo de traíras também coletadas no Rio Negro. Assim, os valores de Hg total encontrados nos tecidos das traíras do Grupo Hg são reais e possíveis de ocorrerem em ambientes naturais. Em peixes, o mercúrio inorgânico é excretado 3 vezes mais rápido que o metilmercúrio. No presente estudo, os matrinxãs expostos por 96 horas a concentração nominal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , apresentaram um depuração de cerca de 30% após 4 dias de exposição em água limpa. A literatura aponta para um tempo de meia vida do mercúrio inorgânico de 1,3 a 723 dias em várias espécies de peixes de tamanhos e temperatura de aclimatação diferentes (TRUDEL & RASMUSSEM, 1997).

Como o Hg inorgânico é excretado mais rápido, uma parte do  $\text{HgCl}_2$  ingerido pelas traíras ao longo dos 30 dias de experimento pode ter sido eliminada, impedindo uma bioacumulação acentuada nos tecidos. Gonzalez et al (2005) observaram que, após 63 dias de dieta contendo  $13,5 \mu\text{g.g}^{-1}$  de metilmercúrio, houve um aumento acentuado da proporção de Hg inorgânico em fígado de paulistinhas (*Danio rerio*), mostrando que processos de demetilação ocorrem nesse órgão para promover a desintoxicação, uma vez que o Hg inorgânico é mais facilmente excretado. Comparativamente aos valores de Hg total encontrado nos tecidos de matrinxãs, os valores de Hg nos tecidos das traíras são menores, mostrando que a via de exposição trófica interfere na bioacumulação do metal. Como as formas inorgânicas do mercúrio são pouco absorvidas pelo trato digestivo dos peixes (~ 10%) e sua meia-vida biológica é baixa,

ele tende a não se acumula ao longo da cadeia alimentar (LACERDA & MALM, 2008). De acordo com a literatura, o intestino forma uma barreira para a absorção oral do mercúrio inorgânico, enquanto que o metilmercúrio, por ser lipossolúvel, é muito bem absorvido pelos tratos digestivos (BOUDOU & RIBEYRE, 1985; HANDY & PENRICE, 1993; BERNTSSEN et al., 2004).

Kasper e colaboradores (2009) avaliaram concentrações de Hg orgânico e inorgânico em diferentes tecidos e níveis tróficos de peixes (fígado, músculo, rim, trato digestivo e gônadas) coletados no reservatório do Vigário - RJ impactado pelo metal. Concentrações de mercúrio orgânico no músculo foram notavelmente maiores em carnívoros (*Hoplias malabaricus* e *Oligosarcus hepsetus*). As porcentagens de Hg orgânico em relação ao Hg total no músculo também variaram de acordo com o nível trófico das espécies: 93% para os carnívoros, 84% para os onívoros, 73% para os algívoros/planctívoros e 58% para os peixes detritívoros. Além disso, a % de Hg orgânico encontrada no trato digestivo dos peixes carnívoros (78%) foi substancialmente superior a encontrada nos onívoros (30%), possivelmente refletindo um processo de biomagnificação trófica no reservatório. Por outro lado, as concentrações de Hg inorgânico no músculo diminuíram com o aumento do nível trófico, sugerindo que esta forma do mercúrio não biomagnificou ao longo da cadeia alimentar. As gônadas apresentaram as menores concentrações de Hg total e grande parte deste estava na forma orgânica (83 a 98%). Por outro lado, rins e fígado de todas as espécies de peixes apresentaram menos que 50% de Hg orgânico. Os autores ainda sugerem que a distribuição e a dinâmica das diferentes espécies de Hg nos diferentes tecidos são o reflexo de suas características bioquímicas e fisiológicas, além do padrão de bioacumulação ser influenciado pela posição trófica ocupada por cada espécie.

Os valores dos fatores de transferência trófica (FTT) encontrados para os tecidos das traíras do grupo Hg de 0,02 a 0,193 confirmam a baixa eficiência de assimilação do Hg inorgânico da dieta. Para o metilmercúrio, foram encontrados FTTs > 1,0 e inversamente correlacionados a concentração de mercúrio na dieta dos peixes *P. promelas*, *O. mykiss* e *Phoxinus neogaeus* (DeFOREST et al., 2007). Apesar dos baixos níveis de mercúrio total encontrados no músculo das traíras do Grupo Hg, níveis superiores ao limite máximo permitido pela OMS (1,0 mg.kg<sup>-1</sup> para peixes carnívoros) foram encontrados nas brânquias e no fígado. Assim, um período de 30 dias de uma dieta com matrinxãs de pequeno porte expostos ao mercúrio inorgânico foi capaz de promover uma bioacumulação do metal em traíras. Considerando o baixo período de exposição trófica, não se pode descartar a possibilidade de que o mercúrio inorgânico apresente potencial de biomagnificação ao longo da cadeia trófica. Adicionalmente, o mercúrio inorgânico, conhecido por ter baixo potencial de biomagnificação, acumulou-se principalmente nas brânquias e no fígado das traíras após uma exposição sub-crônica de 30 dias. Isso mostra que a forma inorgânica também é capaz de se biomagnificar através dos níveis tróficos, mesmo com uma menor eficiência em comparação ao metilmercúrio,

acumulado preferencialmente no filé. Assim, mesmo exposições sub-crônicas a baixas concentrações de  $\text{HgCl}_2$ , por via trófica, podem ser potencialmente prejudiciais à saúde, sobrevivência e a qualidade dos peixes carnívoros, fontes potenciais de recurso alimentar. A grande diferenciação entre a acumulação do Hg inorgânico e do metilmercúrio ocorre durante a transferência trófica, devido às diferenças na assimilação das várias formas de mercúrio e à eficiência de transferência das mesmas para os predadores (BECKVAR et al., 1996).


Vale mencionar que no presente estudo a quantificação dos níveis de mercúrio total no plasma de ambas as espécies bem como dos níveis de metilmercúrio nos tecidos das traíras contribuiriam sobramaneira com os dados do aqui descritos. Entretanto, tais análises não puderam ser realizadas em tempo hábil em virtude de perda de todos os animais experimentais em decorrência de um blecaute de aproximadamente 5 horas em dezembro de 2009, que parou o sistema de re-circulação de água e aeração dos tanques de aclimatação. Tal acidente inviabilizou a repetição principalmente dos experimentos de exposição sub-crônica que requeriam não só um período mínimo de 75 dias para aclimatação de um lote de peixes e a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  por 30 dias via alimento, como também de um grande número de matrinxãs entre 5 a 6 g, não disponíveis para compra na ocasião. Adicionalmente, outros experimentos ainda precisavam ser realizados comprometendo as análises adicionais de quantificação Hg total plasmática e de metilmercúrio nos tecidos das traíras após a exposição trófica ao Hg inorgânico.

## 5. CONCLUSÕES


Os resultados do presente estudo permitem concluir que o  $\text{HgCl}_2$ , conhecido por ter baixo potencial de bioacumulação, biconcentrou-se nos tecidos de matrinxã e biomagnificou-se nos tecidos de traíra expostos ao Hg por diferentes vias (água e alimento) mostrando que a forma inorgânica também é capaz de se bioacumular-se através dos níveis tróficos, mesmo com uma menor eficiência quando comparada com as formas orgânicas do mercúrio. A exposição aguda, via água, levou a um maior acúmulo do metal nos tecidos de matrinxã em comparação aos tecidos da traíra após a exposição sub-crônica, via alimentação, de tal forma que a concentração de Hg total nos diferentes tecidos dos matrinxãs, incluindo o filé, excederam o limite máximo permitido pela OMS de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  para peixes não carnívoros. Por outro lado, os níveis de Hg total no filé de traíra não excederam o limite máximo permitido pela OMS de  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  para peixes carnívoros. Considerando o baixo período de exposição trófica (30 dias), não se pode descartar a possibilidade de que o Hg inorgânico apresente potencial de biomagnificação ao longo da cadeia trófica, mesmo que com uma menor capacidade em comparação ao MeHg, prejudicando não só a sobrevivência como a qualidade do filé usado na alimentação.



## CAPÍTULO IV

**Efeitos da exposição aguda ao mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre biomarcadores de estresse oxidativo em matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)** 

---

 Publicado em: Monteiro, D.A.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the neotropical fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*, v. 19, p. 105-123, 2010.

## RESUMO

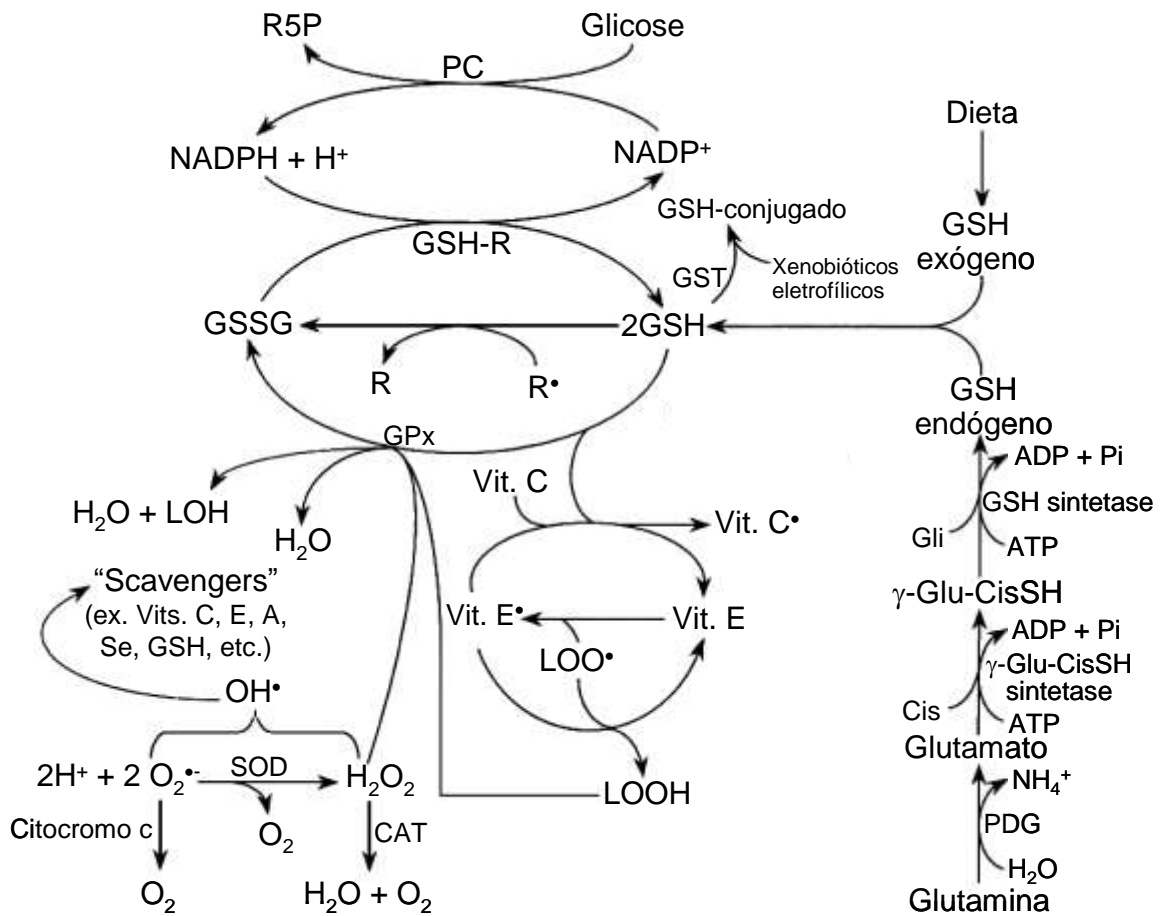
O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição aguda ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) na água sobre biomarcadores do estresse oxidativo em fígado, brânquias, músculo branco e coração de matrinxã, *Brycon amazonicus*. Exemplares juvenis, foram divididos em 2 grupos. Um dos grupos foi utilizado como controle (Ct, n = 40) e o outro foi exposto por 96 horas a uma concentração nominal e sub-letal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (1/5 da  $\text{CL}_{50}$  96h) em sistema estático ( $\text{HgCl}_2$ , n = 40). Nos peixes controles e expostos ao mercúrio inorgânico, foram avaliados os níveis peroxidação lipídica e protéica, as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reductase (GR), bem como os níveis de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e o conteúdo de metalotioneína (MT). Também foram avaliados os parâmetros biométricos e o índice hepático-somático (IHS). Os matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  exibiram IHS significativamente superior em relação ao valor obtido para o grupo Ct. A exposição ao  $\text{HgCl}_2$  também elevou significativamente os níveis de peroxidação lipídica e protéica em todos os tecidos analisados, indicando o estabelecimento de estresse oxidativo que compromete as funções celulares. As atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST também aumentaram significativamente em todos os tecidos após a exposição metal. Esta resposta adaptativa ocorreu na tentativa de neutralizar a sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzida pelo  $\text{HgCl}_2$ . Todos os tecidos exibiram elevada atividade da GPx após a exposição com exceção do fígado, onde nenhuma alteração na atividade dessa enzima foi observada. A atividade da GR e os níveis de GSH também aumentaram significativamente em todos os tecidos, exceto no músculo branco. Neste tecido, nenhuma alteração foi observada na atividade da GR, enquanto o conteúdo de GSH reduziu-se significativamente. Em relação aos níveis de GSSG, houve aumentos significativos no músculo branco e coração dos peixes contaminados e nenhuma alteração foi observada nos outros tecidos, mostrando uma maior sensibilidade do tecido muscular uma vez que o mesmo não foi capaz de manter a homeostase redox celular. Quando a relação GSH:GSSG foi analisada nos músculos esquelético e cardíaco, observou-se uma diminuição desta relação no músculo branco e uma tendência de redução no tecido cardíaco. Provavelmente, essa diferença entre o músculo esquelético e cardíaco foi decorrente da não alteração da atividade da GR no músculo branco, enzima responsável pela conversão da GSSG em GSH. Para o fígado e brânquias, a relação GSH:GSSG aumentou significativamente após a exposição ao metal, porém mesmo com esse aporte maior de GSH os danos oxidativos induzidos pelo mercúrio não foram evitados em tais tecidos. Para os níveis de MT, todos os tecidos, com exceção do músculo branco, apresentaram elevações no conteúdo dessa proteína sequestradora de metais frente a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ . A incapacidade do músculo branco em aumentar o conteúdo de MT pode ter contribuído para a redução significativa da relação GSH:GSSG, uma vez que o metal estaria mais disponível para se ligar irreversivelmente a GSH. Tal situação se agrava ao se levar em conta que o músculo branco depende de um aporte exógeno de GSH para a manutenção do conteúdo deste tripeptídeo. Dessa forma, os resultados do presente estudo permitem concluir que o mercúrio, mesmo na sua forma inorgânica, em uma exposição aguda de 96 horas e numa dose sub-letal é um potente indutor de estresse oxidativo em matrinxã, capaz de comprometer funções da membrana lipídica e de proteínas essenciais na manutenção da homeostasia celular. As adaptações do sistema de defesa antioxidante de *B. amazonicus* frente a exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  não foram suficientes para conter os danos mediados pelas ERO geradas e o músculo branco e coração parecem ser os tecidos mais sensíveis a tais danos, apresentando sinais de perdas na homeostase redox. Assim, mesmo exposições agudas a baixas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  podem ser potencialmente prejudiciais à saúde e sobrevivência da espécie que é nativa de regiões amazônicas amplamente impactadas pela contaminação do Hg proveniente de garimpos.

## 1 INTRODUÇÃO

O mercúrio vem sendo encontrado em quantidades mensuráveis na maioria dos ecossistemas aquáticos devido à combinação de fontes naturais e antropogênicas (POST et al., 1996). Considerável parcela do mercúrio usado nas atividades humanas acaba atingindo os corpos d'água (AZEVEDO, 2003). Na literatura, o nível de mercúrio total em ecossistemas aquáticos varia de 0,002 até 230  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (CETESB, 1998; HYPOLITO et al., 2004; ALINNOR, 2005; BOLLEN et al., 2008). Dessa forma, o mercúrio, do ponto de vista ecotoxicológico, é, de longe, o metal pesado mais importante e preocupante, devido sua capacidade de se acumular nos organismos ao longo da cadeia alimentar, biomagnificando-se.

A contaminação aquática é citada como um dos principais responsáveis pelo estabelecimento do estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem reagir com macromoléculas, resultando em perda das funções celulares. O estresse oxidativo tem sido apontado como um importante mecanismo molecular para a injúria tecidual induzida por Hg e a interação desse metal com moléculas contendo grupos sulfidrílicos parece contribuir para esse processo por alterar a conformação de proteínas e muitas vezes impedindo sua função (STOHS & BAGCHI, 1995; ERCAL et al., 2001; GUZZI & La PORTA, 2008).

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos (superóxido dismutase –SOD; catalase – CAT; glutathione peroxidase – GPx; glutathione S-transferase – GST; glutathione reductase – GR; etc) e não-enzimáticos (glutathione – GSH; metalotioneína – MT; etc) para proteger seus constituintes e manter seu estado redox. Sob condições fisiológicas normais, os efeitos nocivos das ERO são efetivamente neutralizados pelo sistema celular de defesa antioxidante, que geralmente consiste de enzimas e de pequenas moléculas antioxidantes (DANDAPAT, 2000). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e/ou redução das lesões causadas pelas ERO nas células (CERUTTI, 1991; 1994). Como principais mecanismos de lesão oxidativa destacam-se: a) peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) caracterizada pela formação de hidroperóxidos de lipídio (LOOH) cuja decomposição gera radicais lipídicos ( $\text{LOO}^*$ ) que propagam a cadeia de peroxidação lipídica e produtos não-radicalares como o malonaldeído (MDA), cetonas e epóxidos que, por serem mais estáveis que as ERO e  $\text{LOO}^*$ , atuam em pontos distantes do local em que se formam oxidando outras macromoléculas (LIMA et al., 2002); b) a oxidação protéica que conduz a perda de função e que pode ser caracterizada pela formação de proteínas carboniladas (PC). Estes mecanismos de lesão oxidativa e os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático estão exemplificados na figura 1.

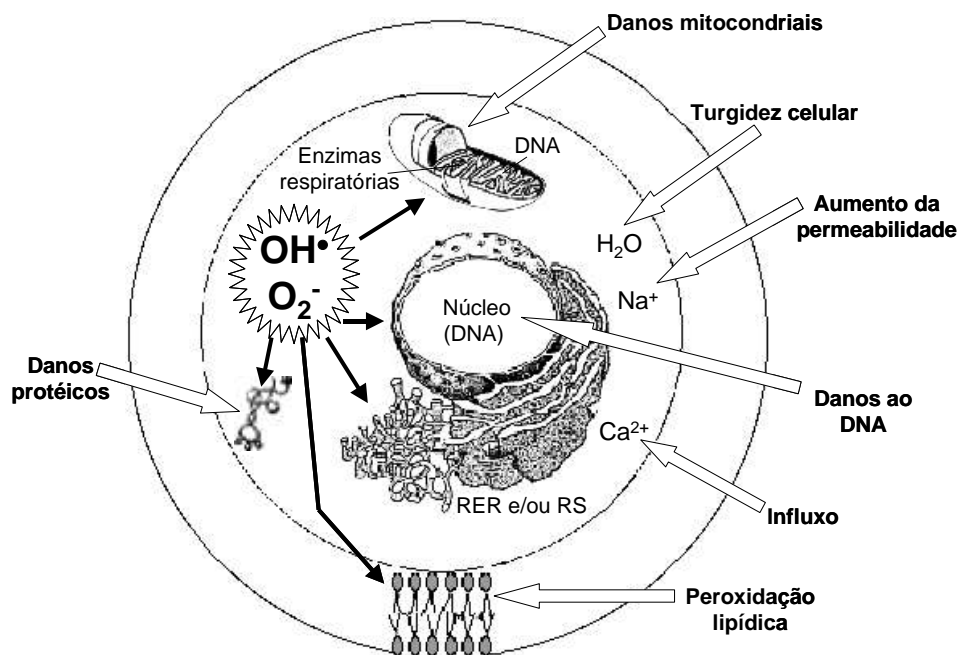


**Figura 1** - Esquema representando os sistemas de defesa antioxidante (enzimático e não-enzimático) e os danos oxidativos (lipoperoxidação e oxidação protéica). Modificado de Fang et al. (2002).

O estresse oxidativo ocorre quando há uma falha no equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, originando danos celulares. Assim, na diminuição desses sistemas antioxidantes, no excesso da produção de ERO ou na conjugação das duas situações, o meio celular fica sujeito ao estresse oxidativo que, por sua vez, pode levar à morte celular (BIESALSKI, 2000). Componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA são alvos do dano oxidativo mediado pelas ERO (NORDBERG & ARNER, 2001). As ERO podem interagir com todas as biomoléculas celulares, a fim de se estabilizar e, conseqüentemente, acabam lesando diferentes estruturas celulares. Ao oxidá-las, podem fazer com que estas biomoléculas percam total ou parcialmente sua função (Figura 2).

Diversos efeitos associados às ERO podem ser desencadeados no organismo, como modificação de aminoácidos, alteração de atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas, modificações em glicoproteínas, perda de metal em metaloproteínas, aumento na suscetibilidade a proteólise, oxidação de grupos tióis para pontes dissulfeto e alterações nos

receptores e no material genético, entre outros (STADTMAN, 1992; KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004). A oxidação do DNA pode provocar quebra da dupla fita e modificações de bases nitrogenadas, o que pode acarretar processos mutagênicos e carcinogênicos (SIES, 1986; LIVINGSTONE, 2001). Já a ação das ERO sobre as membranas biológicas promove alterações em cadeia, gerando radicais lipídicos que desestabilizam a membrana e conduzem a perda de permeabilidade e seletividade (MOSLEN, 1995; STOREY, 1996; LIMA et al., 2002).



**Figura 2** - Danos celulares resultantes das lesões oxidativas induzidas pelas ERO. Adaptado de Marks et al. (1996).

Através dos processos descritos acima, as ERO estão implicadas na etiologia de um grande número de doenças, alterações degenerativas, lesões teciduais e toxicidade decorrente da exposição à xenobióticos (POLLACK & LEEUWENBURG, 1999; BRAY, 2000), sendo continuamente produzidas pelos organismos como resultado de um processo metabólico normal, ou como resultado de estímulos ambientais (FEILLET-COUDRAY et al., 1999). Nesse sentido, Çavas (2008) demonstrou que o  $\text{HgCl}_2$  nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  induz danos citotóxicos e genotóxicos em células branquiais e em eritrócitos do peixe dourado, *Carassius auratus*, após 2, 4 e 6 dias de exposição.

Durante décadas, os efeitos de xenobióticos sobre o ambiente aquático foram avaliados pelo monitoramento de mudanças ambientais, em termos de taxa de sobrevivência, em cada nível de organização do ecossistema como populações e comunidades. Entretanto, estes estudos eram limitados, pois vários efeitos bioquímicos tóxicos podiam ocorrer simultaneamente,

sem considerar a complexidade e as funções do ecossistema. A toxicologia ambiental passou a ser mais complexa, passando a utilizar marcadores para cada nível de organização. Estes marcadores, bioquímicos, fisiológicos e histológicos, devem apresentar habilidade de medir diferentes respostas à presença de estressores distintos (HUGGETT et al., 1992). As alterações nos mecanismos bioquímicos antioxidantes vêm sendo identificadas como biomarcadores de susceptibilidade celular a danos causados pelas ERO. Uma das principais características desses biomarcadores é a indução de sua expressão e/ou atividade sob condições de estresse oxidativo, um mecanismo que pode ser uma adaptação importante ao estresse induzido por poluentes (LIVINGSTONE, 2001; ZHANG et al., 2004). Uma das principais finalidades da ecotoxicologia é avaliar os riscos ecológicos e para isso é fundamental a identificação elementos ou sinais-chaves que traduzam os processos de controle e suas alterações no ecossistema em risco. Outro paradigma é a mudança na abordagem dos problemas ecológicos, que antes visavam reparar danos e/ou restaurar vida e hoje visam, sobretudo, proteger/preservar o ecossistema. Nesta óptica de preservação, e por estarem relacionados às respostas primárias das células aos impactos recebidos do meio, os biomarcadores (bioquímicos e fisiológicos) são vistos como instrumentos eficientes de prevenção de avaliação de riscos ecológicos.

No Brasil, a maior parte dos estudos de contaminação por mercúrio em ambientes de água doce se concentra na quantificação do metal em águas, sedimentos e/ou em tecidos de peixes. Os efeitos do mercúrio sobre os biomarcadores do estresse oxidativo e a função cardíaca em peixes ainda não são bem estudados e na literatura há poucos dados disponíveis sobre os efeitos do mercúrio em peixes, ainda mais se tratando de peixes de ambientes tropicais freqüentemente sujeitos a contaminação por mercúrio, ao que se propõe o presente projeto. Dessa forma, é necessário o investimento em estudos que visam esclarecer e entender os mecanismos de ação do mercúrio em peixes, na tentativa de elucidar lacunas ainda não preenchidas a respeito dos potenciais danos deste metal sobre a ictiofauna e, conseqüentemente, fornecer subsídios para sua preservação.

Dada às características de bioacumulação e biomagnificação desse metal e a posição dos peixes na cadeia trófica de um ecossistema aquático, somada à escassez de informações sobre a ação do Hg em peixes brasileiros, o uso de espécies tropicais e de interesse comercial como modelo de estudo é extremamente interessante em termos de preservação do ambiente e saúde humana. Os altos índices de toxicidade do Hg para os organismos, mesmo em baixas concentrações, associados à sua relativa facilidade de entrar e permanecer na cadeia trófica por longos períodos reforçam a importância de estudos que determinem seus efeitos nos organismos aquáticos, particularmente em peixes, uma vez que a fauna íctica constitui-se num recurso alimentar importante, sendo uma fonte protéica acessível através da exploração direta das populações naturais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Exemplares juvenis e de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram adquiridos do Centro de Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros com recirculação de água de cloração (pH 7,0-7,5; DO<sub>2</sub> 6,5-7,3 mg.L<sup>-1</sup>; dureza 48-56 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade 40-43 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e condutividade 120-128 µS.cm<sup>-1</sup>), aeração constante (P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 45 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante o período de aclimação, os matrinxãs foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes com 40% de proteína (Pira Alevinos - Guabi Nutrição Animal<sup>®</sup>).

### 2.2 Desenho Experimental

Antes do início do experimento, os matrinxãs (W<sub>T</sub> = 18,3 ± 1,1 g; L = 11,1 ± 0,2 cm) foram aleatoriamente divididos em dois grupos: controle (grupo Ct, n = 40), em que os peixes permaneceram em água sem mercúrio e grupo exposto ao mercúrio inorgânico (grupo HgCl<sub>2</sub>, n = 40) na concentração nominal e sub-letal de 0,15 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (~1/5 da CL<sub>50</sub> 96 horas). A exposição foi conduzida de acordo com as normas da OECD 203 para teste de toxicidade em peixes (OECD, 1992) e se encontra minuciosamente descrita no capítulo II. Foram colocados 10 peixes em cada caixa experimental (180 L, 24 ± 2°C e aeração constante), sendo mantida a relação de 1,0 g de peixe por litro de água. Quatro réplicas para cada grupo experimental foram realizadas totalizando 40 animais por grupo experimental e 80 peixes no total. Os animais tiveram a alimentação suspensa 24 horas antes do início dos experimentos para evitar efeitos prandiais e prevenir deposição de fezes ao longo do ensaio. Os peixes permaneceram nas caixas experimentais por 12 horas para adaptação e, após este período, a água foi renovada e o cloreto de mercúrio adicionado a partir de uma solução-estoque de 1.000 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>. Após a adição do cloreto de mercúrio, os peixes permaneceram em sistema estático por 96 horas. O mercúrio é altamente persistente na água, com uma meia-vida de aproximadamente 200 dias (EPA, 1999, 2000). Conforme ressaltado na introdução essa concentração de Hg é encontrada nos ecossistemas aquáticos sendo, portanto, uma concentração ambientalmente relevante (para detalhes ver capítulo III)

### 2.3 Coleta de Amostras

Ao final das 96 horas de exposição os animais foram coletados das caixas experimentais e sacrificados por transecção da coluna espinal para sacrifício imediato. Não foi utilizado qualquer tipo de anestésico durante a coleta de tecidos pelo fato destas drogas causarem alterações na atividade das enzimas antioxidantes, especialmente a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (WDZIECZAK et al., 1982; GODIN & GARNETT, 1994). Após o sacrifício, a biometria dos animais ensaiados foi realizada medindo-se a massa e comprimento total dos peixes bem como a massa dos fígados desses animais. Com os resultados da biometria foi possível calcular o índice hepático-somático obtido através da fórmula  $[IHS = (\text{peso do fígado}/\text{peso do peixe}) \times (100)]$ . Em seguida, o fígado, as brânquias, o coração e uma amostra de músculo branco da parte superior da linha lateral próxima à região cefálica foram coletados e devidamente dissecados em placas de vidro mantidas sob gelo a fim de se obter o fígado sem gordura e vesícula biliar, os filamentos branquiais separados de seus arcos branquiais, o coração sem o bulbo e uma parte de músculo branco livre de pele e vestígios de músculo vermelho. Os tecidos foram lavados em salina 0,9% para retirada de impurezas, secos superficialmente em papel filtro, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise dos parâmetros bioquímicos.

### 2.4 Procedimentos Bioquímicos

Os tecidos congelados foram rapidamente amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas para as determinações enzimáticas. Para todas as determinações bioquímicas, o fígado, as brânquias e o músculo branco foram homogeneizados em tampão de homogeneização na proporção de 1:5 (w/v), enquanto que o coração, na proporção 1:10 (w/v).

Para as análises das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione redutase (GR) e para determinação dos níveis de LPO medidas pelos ensaios de FOX e TBARS, os tecidos foram homogeneizados a 18.000 rpm (Homogeneizador Turrax TE 102, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) em dois "strokes" de 30 segundos, sob banho de gelo, em tampão fosfato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  0,1 M pH 7,0, conforme descrito em MONTEIRO et al. (2006). Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 14 000 g por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para a obtenção do sobrenadante (AHMAD et al., 2000), que foi usado para as determinações bioquímicas descritas acima bem como para a determinação do conteúdo de proteína total.



Para as determinações descritas acima, foram utilizados dez animais de cada grupo experimental, perfazendo um  $n = 10$  por tecido analisado para cada determinação, com exceção do coração, para o qual foi utilizado um  $n = 6$  por cada uma das análises realizadas. Em virtude da pequena massa do coração (~30 mg), o sobrenadante resultante de sua homogeneização não era suficiente para que as análises citadas acima pudessem ser feitas num mesmo homogenado. Assim, utilizou-se um maior número de animais ( $n = 12$ ) de cada grupo experimental, subdividindo os corações em dois grupos de seis para que todas as análises fossem realizadas. Em um grupo de seis corações/grupo experimental foram feitas as análises de peroxidação lipídica (FOX e TBARS) e proteína e no outro grupo, as análises das atividades enzimáticas e a determinação de proteína total. Para as análises dos demais parâmetros no coração, também utilizou-se um  $n = 6$  por grupo experimental para que o número total de animais por grupo ( $n = 40$ ) fosse suficiente para todas as análises.

Para a quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona total ( $GSH_t = GSH + GSSG$ ), os tecidos foram homogeneizados em ácido sulfossalicílico 5% (ANDERSON, 1985) a 14 000 g para a desproteínização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14 000 g por 5 minutos e os sobrenadantes utilizados para a determinação enzimática dos níveis de  $GSH_t$  e GSSG. Para essas determinações, também foram utilizados dez animais de cada grupo experimental, perfazendo um  $n = 10$  por tecido analisado para cada determinação, com exceção do coração, para o qual foi utilizado um  $n = 6$  para cada uma das análises realizadas, por razões previamente esclarecidas.

Para a quantificação da metalotioneína (MT), os tecidos foram homogeneizados a 18.000 rpm em tampão TRIS-HCl 20 mM (pH 8,6) contendo sacarose 0,5 M, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,5 mM e  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) a 0,01% (VIARENGO et al., 1997). As amostras foram centrifugadas a 11.000 g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado para as etapas purificação parcial e quantificação da metaloproteína. Para a quantificação da MT, foram utilizados dez animais de cada grupo experimental perfazendo um  $n = 10$  por tecido analisado para cada determinação, com exceção do coração, para o qual foi utilizado um  $n = 6$ .

Para a análise do conteúdo de proteína carbonilada (PC), os tecidos foram homogeneizados a 13.000 g em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4) contendo 1 mM de EDTA e PMSF 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (REZNICK & PACKER, 1994). Os homogeneizados ficaram por 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, foram centrifugados 8 000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para as dosagens dos grupamentos carbonil das proteínas. Neste caso também foram utilizados dez animais de cada grupo experimental, perfazendo um  $n = 10$  por tecido analisado para cada determinação, com exceção do coração, para o qual foi utilizado um  $n = 6$ .

## 2.5 Parâmetros Bioquímicos

Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 5. (Milton Roy Co., Rochester, NY, USA) a 25 °C. Para cada uma das análises descritas a seguir, as amostras foram realizadas em duplicata.

### 2.5.1 Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes

#### 2.5.1.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD (E.C. 1.15.1.1) foi determinada segundo o método McCORD & FRIDOVICH (1969), descrito por FLOHÉ & ÖTTING (1984), com base na inibição da velocidade de redução do citocromo c pelo radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) gerado no sistema xantina/xantina oxidase. A reação é catalisada pela xantina oxidase que promove a transformação da xantina em ácido úrico e transfere um elétron para o  $O_2$  molecular produzindo  $O_2^{\bullet-}$ . Paralelo a esta reação, ocorre a redução do citocromo c pelo  $O_2^{\bullet-}$ , que é medida pelo aumento de absorbância em 550 nm. A adição da SOD inibe a velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com este citocromo pelo  $O_2^{\bullet-}$ , dismutando-o a  $H_2O_2$ . A reação ocorreu em um meio contendo tampão fosfato de  $Na^+/K^+$  50 mM pH 7,8 com 0,1 mM de EDTA, citocromo c 20 mM, xantina 0,05 mM, extrato enzimático (sobrenadante dos homogenados) contendo a SOD e xantina oxidase ~ 0,2 U.mL<sup>-1</sup>. A quantidade de SOD adicionada foi suficiente para manter a taxa de referência (que contém os itens citados acima, exceto o extrato enzimático) em 0,025 abs./min a 550 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir, em 50%, a redução do citocromo c. Os valores de SOD foram expressos em U.mg proteína<sup>-1</sup>.

#### 2.5.1.2 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT (E.C. 1.11.1.6.) foi determinada pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 240 nm (AEBI, 1974). A diminuição na absorbância foi registrada em cubeta contendo uma solução recém preparada de  $H_2O_2$  15 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e amostra do extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição da solução de  $H_2O_2$ . Os valores da CAT foram expressos em Unidades de Bergmeyer (U.B. - quantidade de catalase que libera a metade do oxigênio de uma solução de peróxido de hidrogênio de qualquer concentração no intervalo de tempo de 100 segundos a 25 °C) por mg de proteína (U.B.mg proteína<sup>-1</sup>).

### **2.5.1.3 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase selênio-dependente (Se-GPx)**

A atividade da Se-GPx (E.C. 1.11.1.9) foi determinada através da oxidação do NADPH em presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), de acordo com o método descrito por NAKAMURA et al. (1974) com algumas modificações. A mistura de reação continha tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 com 2 mM de EDTA, NADPH 0,2 mM, azida sódica ( $NaN_3$ ) 1mM, GSH 1 mM, glutathiona redutase (GR) 1 U.mL<sup>-1</sup> e extrato enzimático contendo GPx (sobrenadante dos homogenados). A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mM de  $H_2O_2$ . A taxa de oxidação do NADPH foi avaliada pelo decaimento da absorbância a 340 nm. A taxa de oxidação não-enzimática foi medida substituindo-se o extrato enzimático por água destilada. Essa taxa de referência foi extraída da taxa das amostras para determinar somente a atividade enzimática. A atividade da GPx foi calculada através do coeficiente de extinção molar do NADPH  $\epsilon_{340nm} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e expressa como nmoles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ).

### **2.5.1.4 Determinação da atividade da glutathiona S-transferase (GST)**

A atividade da GST (E.C. 2.5.1.18) foi medida de acordo com HABIG et al. (1974) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A reação ocorreu em um meio contendo 1 mM de CDNB em etanol, 1mM de GSH, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e extrato enzimático (sobrenadante dos homogenados). A formação do aducto glutathiona-2,4-dinitrobenzeno foi monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm contra um branco. Uma unidade da GST foi expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto por minuto por mg de proteína ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ).

### **2.5.1.5 Determinação da atividade da glutathiona redutase (GR)**

A atividade de GR (E.C. 1.6.4.2) foi determinada de acordo com o método descrito por CARLBERG & MANNERVIK (1975) com algumas modificações. A reação ocorreu em um meio contendo tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 com 1 mM de EDTA, NADPH 0,2 mM, GSSG 1mM e extrato enzimático (sobrenadante dos homogenados). A reação foi iniciada pela adição de quantidade suficiente de extrato enzimático capaz de provocar alteração na absorbância de 0,05 a 0,3/min. A GR foi estimada pela redução do NADPH, que foi monitorada pela alteração da absorbância a 340 nm. Uma unidade de GR foi definida como a oxidação de

1  $\mu\text{mol}$  de NADPH/min sob as condições descritas acima. A atividade da GPx foi calculada através do coeficiente de extinção molar do NADPH  $\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e expressa como nmoles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$ ).

## 2.5.2 Análise de Antioxidantes Não-Enzimáticos

### 2.5.2.1 Glutathiona total ( $\text{GSH}_t$ )

O conteúdo de  $\text{GSH}_t$  foi determinado de acordo com o método de ANDERSON (1985), utilizando-se o sistema de reciclagem DTNB-GSSG redutase. Na presença do NADPH, a GR reduz toda a GSSG a GSH, que então reage com o DTNB (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzóico) formando o TNB (ácido tionitrobenzóico) e GSSG que é novamente reconvertida a GSH. Como a quantidade de GR é constante e os demais substratos (como NADPH e DTNB) são adicionados em quantidade saturantes, a velocidade de formação de TNB é proporcional à quantidade inicial de GSH (e de GSSG) nas amostras. Conforme a reação prossegue, o DTNB vai sendo consumido enquanto que a GSH (e/ou o GSSG) é reciclada. A formação do TNB pode ser monitorada espectrofotometricamente a 412 nm.

A mistura de reação continha tampão fosfato de sódio 143 mM pH 7,5 com 6,3 mM de EDTA, NADPH 0,2 mM, DTNB 0,6 mM, GR  $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  e extrato ácido desproteínizado (sobrenadante dos tecidos homogeneizados em ácido sulfossalicílico 5%). A reação foi iniciada pela adição da GR e a alteração da absorbância ( $\Delta \text{ abs/min}$ ) foi registrada em 412 nm. Para a determinação dos níveis de glutathiona total das amostras, os resultados foram comparados com uma curva-padrão de GSH. Brancos contendo todos os itens com exceção da GSH (amostra) foram ensaiados simultaneamente para a determinação da taxa de referência que foi descontada das variações de cada amostra. Os valores de  $\text{GSH}_t$  foram expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{g} \text{ tecido}^{-1}$  como equivalentes de GSH, ou seja,  $\text{GSH}_{\text{eq}} = \text{GSH} + 2 \cdot \text{GSSG}$ .

### 2.5.2.2 Glutathiona oxidada (GSSG)

Os níveis de GSSG foram medidos da mesma forma que o conteúdo de  $\text{GSH}_t$  foi determinado, ou seja, de acordo com o método de ANDERSON (1985), utilizando o sistema de reciclagem DTNB-GSSG redutase. Entretanto, os extratos ácidos dos tecidos (sobrenadante dos

tecidos homogeneizados em ácido sulfossalicílico 5%) foram derivatizados com 2-vinilpiridina (2-VP). Cerca de 100  $\mu$ L dos homogenados foram incubados com 5  $\mu$ L de 2-VP e 5  $\mu$ L de KOH 2 M durante 1 hora a temperatura ambiente (CUNHA BASTOS et al., 2007). A 2-VP reage rapidamente com a GSH formando um conjugado sem oxidá-la e sem inibir a atividade da GR (ANDERSON, 1985). Entretanto, a derivatização só acontece eficientemente em pH neutro sendo por isso adicionado o KOH a fim de manter o pH  $\sim$  7.

Após a incubação, a reação procedeu conforme descrito no item anterior utilizando as amostras derivatizadas. Para a determinação dos níveis de glutatona oxidada das amostras, os resultados foram comparados com uma curva-padrão de GSSG. Brancos contendo todos os itens acima citados com exceção da GSSG (amostra) foram ensaiados simultaneamente para a determinação da taxa de referência que foi descontada das taxas de variação de absorbância de cada amostra.

### **2.5.2.3 Determinação da glutatona reduzida (GSH)**

A concentração de glutatona (GSH) reduzida foi obtida pela subtração do conteúdo de GSSG (ver item 3.5.2.2) do conteúdo de GSht (ver item 3.5.2.1). Os valores de GSH foram expressos em  $\mu$ mol.g tecido<sup>-1</sup>.

### **2.5.2.4 Determinação dos níveis de metalotioneína (MT)**

Os níveis de metalotioneína foram medidos indiretamente pela determinação da concentração de grupamentos sulfidrila (-SH), segundo a metodologia descrita por VIARENGO et al. (1997), utilizando-se como padrão a glutatona reduzida (GSH). A concentração de MT foi avaliada no sobrenadante dos homogenados dos tecidos utilizando-se uma fração parcialmente purificada de metaloproteína obtida em várias etapas de uma solução de etanol/clorofórmio. As amostras foram secadas em um *speed vac* por aproximadamente 4 a 6 horas e ressuspensas em uma solução de NaCl 0,25 M e HCl 1 N contendo EDTA 4 mM. A concentração de metalotionina dos extratos, desnaturada em pH ácido e elevado comprimento iônico, foi quantificada espectrofotometricamente utilizando-se o Reagente de Ellman contendo NaCl 2 M, DTNB 0,43 M em tampão fosfato 0,2 M (pH 8,0). As leituras foram feitas em espectrofotômetro em 412 nm. Os valores da MT foram expressos em  $\mu$ g de grupamentos -SH. mg proteína<sup>-1</sup>.

### 2.5.3 Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica

#### 2.5.3.1 Ensaio FOX

A peroxidação lipídica dada em hidroperóxido de lipídio foi quantificada pelo método FOX (“ferrous oxidation-xylenol orange”) como descrito por JIANG et al. (1992). O método FOX é baseado na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjado de xilenol que tem pico de absorção a 560 nm. As amostras (previamente tratadas com TCA 10%) foram incubadas durante 40 minutos, à temperatura ambiente, com mistura reativa contendo 100 mM de alaranjado de xilenol, 250 mM de  $\text{FeSO}_4$  (sulfato ferroso amoniacal), 25 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 4 mM de butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol 90% (v/v). Os resultados foram expressos em equivalentes de cumeno hidroperóxido ( $\text{nmol.mg de proteína}^{-1}$ ).

#### 2.5.3.2 Ensaio TBARS

A peroxidação lipídica dada em equivalentes de malondialdeído (MDA) foi quantificada pelo ensaio TBARS (“thiobarbituric acid-reactive substances”) realizado de acordo com a metodologia de SATOH (1978) com algumas modificações descritas em WILHELM FILHO et al. (2005), utilizando-se como padrão o malondialdeído (MDA). Os sobrenadantes dos homogenados dos tecidos foram tratados com TCA 20% na proporção de até 1:6 (v/v) e centrifugadas a 2 000 g por 10 minutos a 4 °C. Aos sobrenadantes foram adicionados ácido sulfúrico 0,05 M e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Esta solução permaneceu em banho-maria fervente durante 60 minutos sendo resfriada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado álcool n-butílico e as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para leitura em espectrofotômetro a 530 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de MDA ( $\text{nmol.mg de proteína}^{-1}$ ).

### 2.5.4 Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação do conteúdo de proteína carbonilada (PC) baseada na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) (REZNICK & PACKER, 1994). Os sobrenadantes dos homogenados dos tecidos foram incubados em 10mM DNPH preparada em HCl 2,5M, no escuro e sob agitação a cada 10 minutos. Em

seguida, essas amostras foram tratadas com TCA 50%, colocadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 8 000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado 3 vezes com solução etanol:acetato de etila 1: 1 (v/v). Após a última lavagem, 1 mL de guanidina 6 M foi adicionado a cada uma das amostras, que foram vigorosamente agitadas e colocadas em banho-maria por 30 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 8 000 g por 10 minutos para retirada de partículas insolúveis e os sobrenadantes lidos em 370 nm. Para cada amostra foram feitos controles simultâneos contendo o mesmo volume de amostra e somente HCl 2,5 M sem DNPH. Cada um desses controles foi utilizado como próprio branco da respectiva amostra. O conteúdo de grupamentos carbonil nas proteínas foi calculado usando o coeficiente de extinção molar da DNPH  $\epsilon_{370\text{nm}} = 22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Os valores de PC foram expressos em nmol.mg de proteína<sup>-1</sup>.

### 2.5.5 Determinação de Proteína Total

O teor de proteína total nos tecidos foi determinado segundo o método clássico de BRADFORD com Coomassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976) adaptado para leitura em microplate conforme descrito por KRUGER (1994), utilizando-se albumina bovina como padrão. A absorbância das amostras foi medida a 595 nm.

### 2.6 Tratamento estatístico dos dados

Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. O teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade foi aplicado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes de diferentes grupos experimentais (Ct e HgCl<sub>2</sub>) (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Alterações Comportamentais e Biometria

Quando comparados com o grupo Ct, os peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub> mostraram intensa agitação e agressividade, permanecendo mais na superfície da água com perda de equilíbrio e postura e pulando da caixa experimental com frequência.

Adicionalmente, no grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, a massa dos fígados e o índice hepático-somático (IHS) foram significativamente maiores àqueles apresentados pelos peixes do grupo Ct (47% e 46%, respectivamente). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na massa corporal e no comprimento total dos peixes entre os grupos experimentais (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos parâmetros biométricos e índice hepático-somático (IHS) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 40) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 40). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Parâmetros biométricos	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
Comprimento total (cm)	11,06 $\pm$ 0,16	11,17 $\pm$ 0,15
Massa corporal (g)	18,23 $\pm$ 1,10	18,30 $\pm$ 1,11
Massa hepática (g)	0,19 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01 *
IHS (%)	1,12 $\pm$ 0,02	1,64 $\pm$ 0,04 *

#### 3.2 Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes

No fígado, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> por 96 horas induziu aumentos significativos nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST e GR (77%, 42%, 43% e 23%, respectivamente). Entretanto, a atividade da GPx permaneceu a níveis semelhantes aos do



controle após a exposição ao cloreto de mercúrio, não se observando alteração significativa entre os grupos experimentais. Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes no fígado dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

Enzimas antioxidantes no fígado	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
SOD (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	29,58 $\pm$ 1,83	52,40 $\pm$ 1,48 *
CAT (U.B.mg proteína <sup>-1</sup> )	4,80 $\pm$ 0,13	6,82 $\pm$ 0,30 *
GPx (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	242,28 $\pm$ 26,86	251,36 $\pm$ 27,65
GST (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	84,26 $\pm$ 6,30	122,28 $\pm$ 5,16 *
GR (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	9,93 $\pm$ 0,32	12,21 $\pm$ 0,65 *

As atividades da SOD, CAT, GST e GR também aumentaram significativamente nas brânquias (19%, 45%, 198% e 29%, respectivamente) dos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Entretanto, houve um aumento significativo da atividade da enzima GPx (33%) nas brânquias dos peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub> quando comparados aos valores apresentados pelos peixes do grupo Ct (Tabela 3).

Em relação ao grupo controle, no músculo branco, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> resultou em aumentos significativos nas atividades da SOD, CAT, GPx e GST (14%, 37%, 35% e 145%, respectivamente). Nenhuma diferença significativa foi observada na atividade da GR, cujos valores se mantiveram similares entre os grupos experimentais. Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 3:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes nas brânquias dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

Enzimas antioxidantes nas brânquias	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
SOD (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	6,70 $\pm$ 0,37	7,95 $\pm$ 0,32 *
CAT (U.B.mg proteína <sup>-1</sup> )	0,50 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,06 *
GPx (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	25,67 $\pm$ 2,32	34,29 $\pm$ 3,18 *
GST (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	118,64 $\pm$ 10,05	353,42 $\pm$ 17,32 *
GR (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	8,63 $\pm$ 0,60	11,11 $\pm$ 0,85 *

**Tabela 4:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes no músculo branco dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

Enzimas antioxidantes no músculo branco	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
SOD (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	5,94 $\pm$ 0,12	6,80 $\pm$ 0,24 *
CAT (U.B.mg proteína <sup>-1</sup> )	0,42 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,03 *
GPx (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	2,23 $\pm$ 0,15	3,00 $\pm$ 0,19 *
GST (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	26,73 $\pm$ 3,15	65,66 $\pm$ 5,48 *
GR (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	1,87 $\pm$ 0,22	2,03 $\pm$ 0,17

No coração, foram observados aumentos significativos nas atividades de todas as enzimas antioxidantes avaliadas. Em relação ao grupo controle, nos peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub>, as atividades da SOD, CAT, GPx, GST e GR aumentaram em 113%, 77%, 150%, 332% e 205%, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes no coração dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 6) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 6). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Enzimas antioxidantes no coração	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
SOD (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	5,21 $\pm$ 0,52	11,12 $\pm$ 1,25 *
CAT (U.B.mg proteína <sup>-1</sup> )	2,34 $\pm$ 0,51	4,15 $\pm$ 0,62 *
GPx (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	23,76 $\pm$ 3,74	59,46 $\pm$ 7,3 *
GST (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	128,91 $\pm$ 26,12	557,56 $\pm$ 157,93 *
GR (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	12,2 $\pm$ 0,79	37,26 $\pm$ 4,01 *

### 3.3 Análise de Antioxidantes Não-Enzimáticos

Em relação ao sistema da glutathiona, os matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram aumentos significativos nos níveis hepáticos de GSH<sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG) e GSH (cerca de 40% e 42%, respectivamente). Em comparação com o controle, não houve alteração significativa no conteúdo de GSSG hepático e a relação GSH:GSSH aumentou significativamente no fígado dos peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Esses resultados estão apresentados na Tabela 6.

Nas brânquias, de forma semelhante ao observado no fígado, os peixes expostos ao cloreto de mercúrio exibiram aumentos significativos nos níveis de GSH<sub>eq</sub> e GSH (89% e 121%, respectivamente) e na razão GSH:GSSG (196%) e nenhuma alteração no conteúdo de GSSG, quando comparados com os peixes do grupo controle (Tabela 7).

**Tabela 6:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no fígado dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Sistema da glutathiona no fígado	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
GSH <sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG)	4,27 $\pm$ 0,24	5,98 $\pm$ 0,50 *
GSH ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	4,09 $\pm$ 0,25	5,81 $\pm$ 0,49 *
GSSG ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,090 $\pm$ 0,009	0,086 $\pm$ 0,005
GSH:GSSG [(GSH <sub>eq</sub> - 2.GSSG)/GSSG]	48,35 $\pm$ 5,94	65,75 $\pm$ 3,85 *

**Tabela 7:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada nas brânquias dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Sistema da glutathiona nas brânquias	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
GSH <sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG)	2,19 $\pm$ 0,07	4,14 $\pm$ 0,12 *
GSH ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	1,69 $\pm$ 0,08	3,74 $\pm$ 0,11 *
GSSG ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,25 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,03
GSH:GSSG [(GSH <sub>eq</sub> - 2.GSSG)/GSSG]	5,45 $\pm$ 1,03	16,16 $\pm$ 1,96 *

No músculo branco, o sistema da glutathiona apresentou um comportamento diferente daquele exibido pelo fígado e pelas brânquias frente a exposição ao HgCl<sub>2</sub>. No tecido muscular, houve uma redução significativa do conteúdo de GSH (15%) que foi acompanhada por um aumento também significativo nos níveis de GSSG (20%). Já a razão GSH:GSSG sofreu redução significativa no grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> (31 %) em relação ao grupo controle. Os dados estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no músculo branco dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

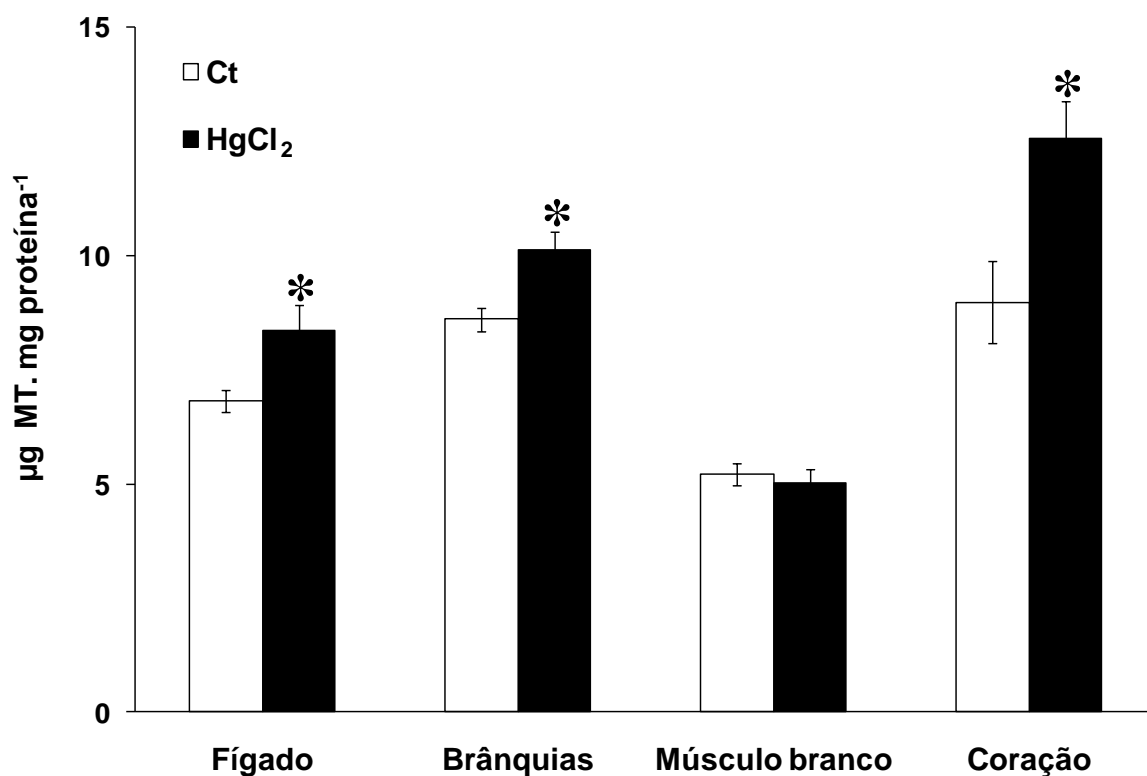
Sistema da glutathiona no músculo branco	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
GSH <sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG)	0,70 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,02
GSH ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,58 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,02 *
GSSG ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,055 $\pm$ 0,002	0,065 $\pm$ 0,004 *
GSH:GSSG [(GSH <sub>eq</sub> - 2.GSSG)/GSSG]	8,73 $\pm$ 0,63	5,99 $\pm$ 0,73 *

No coração dos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>, houve aumentos significativos nos níveis de GSH<sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG), GSH e GSSG (26%, 24% e 38%, respectivamente). Entretanto, não houve alteração significativa na razão GSH:GSSG entre os grupos experimentais, apesar de ter sido observada uma tendência de redução nesta relação. Esses resultados estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Valores médios  $\pm$  E.P.M. dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no coração dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 6) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 6). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Sistema da glutathiona no coração	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
GSH <sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG)	3,26 $\pm$ 0,15	4,11 $\pm$ 0,10 *
GSH ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	2,72 $\pm$ 0,14	3,38 $\pm$ 0,09 *
GSSG ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,27 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,02 *
GSH:GSSG [(GSH <sub>eq</sub> - 2.GSSG)/GSSG]	8,27 $\pm$ 0,72	7,27 $\pm$ 0,58

Em relação aos níveis de metalotioneína, avaliados pela quantificação de grupamentos sulfidril (-SH), foram observados aumentos significativos no fígado, nas brânquias, no coração (22%, 17% e 40%, respectivamente) dos peixes expostos ao  $\text{HgCl}_2$  em comparação aos níveis encontrados nos peixes do grupo controle. No músculo branco, não houve alteração significativa nos níveis de metalotioneína após a exposição ao cloreto de mercúrio. Esses resultados estão apresentados na Figura 3.

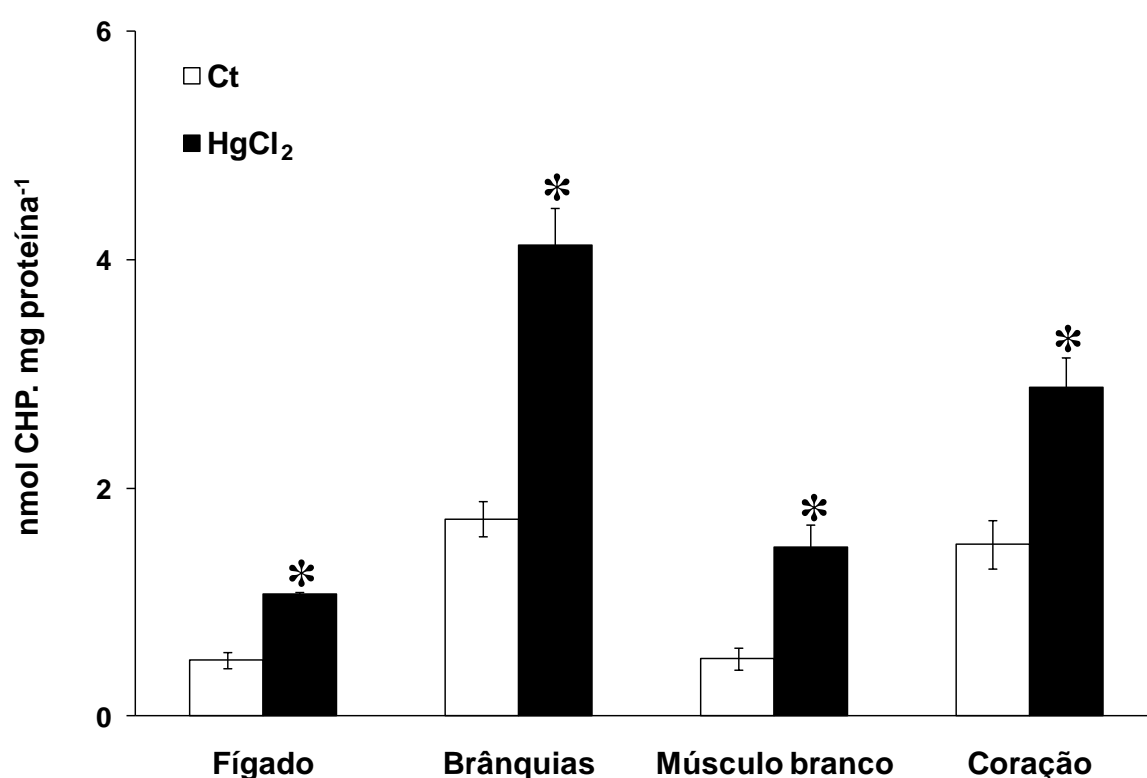


**Figura 3** - Níveis de metalotioneína (MT –  $\mu\text{g. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado ( $n = 10$ ), nas brânquias ( $n = 10$ ), no músculo branco ( $n = 10$ ) e no coração ( $n = 6$ ) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 10$ ) e exposto a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ ,  $n = 10$ ). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

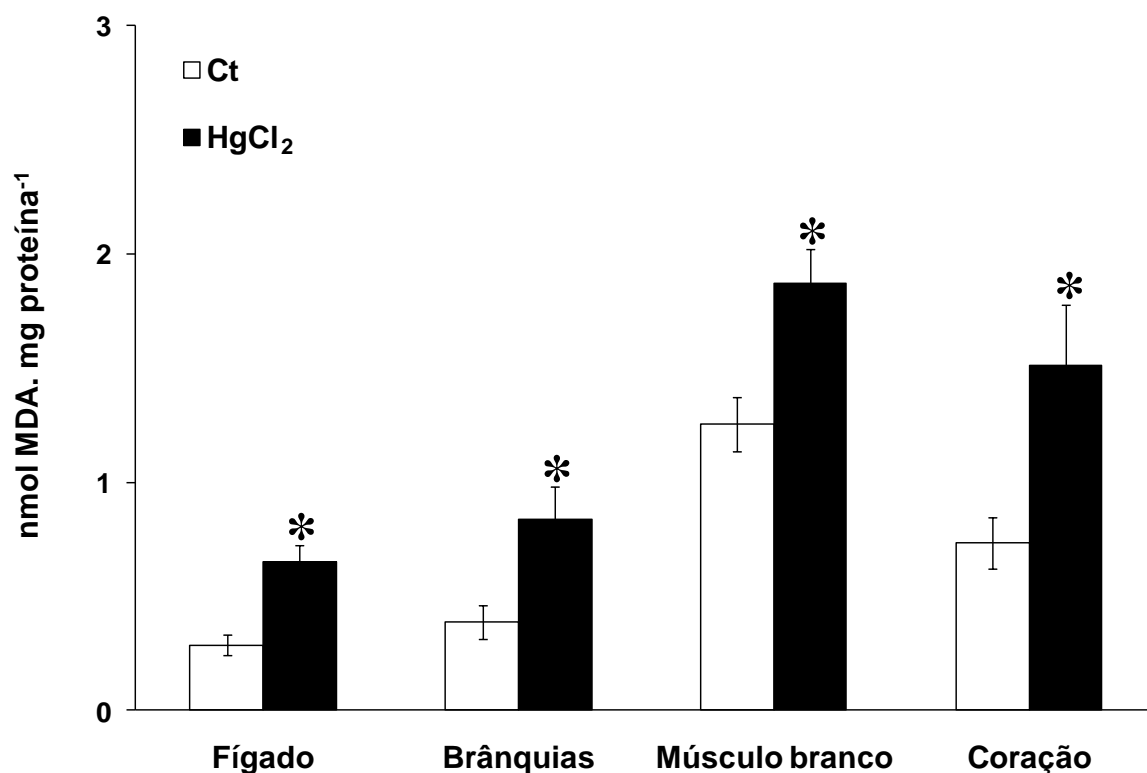
### 3.4 Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica

Os níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP) e de malondialdeído (MDA) nos tecidos dos peixes do grupo controle e do exposto ao  $\text{HgCl}_2$  se encontram nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Quando comparados com o controle, todos os tecidos dos matrinxãs expostos ao cloreto de mercúrio apresentaram aumentos significativos no conteúdo de CHP (117%, 138%, 193% e 91% para fígado, brânquias, músculo branco e coração, respectivamente) e de MDA (127%, 116%, 50% e 106% para fígado, brânquias, músculo branco e coração, respectivamente).



**Figura 4** - Níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ , n = 10). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

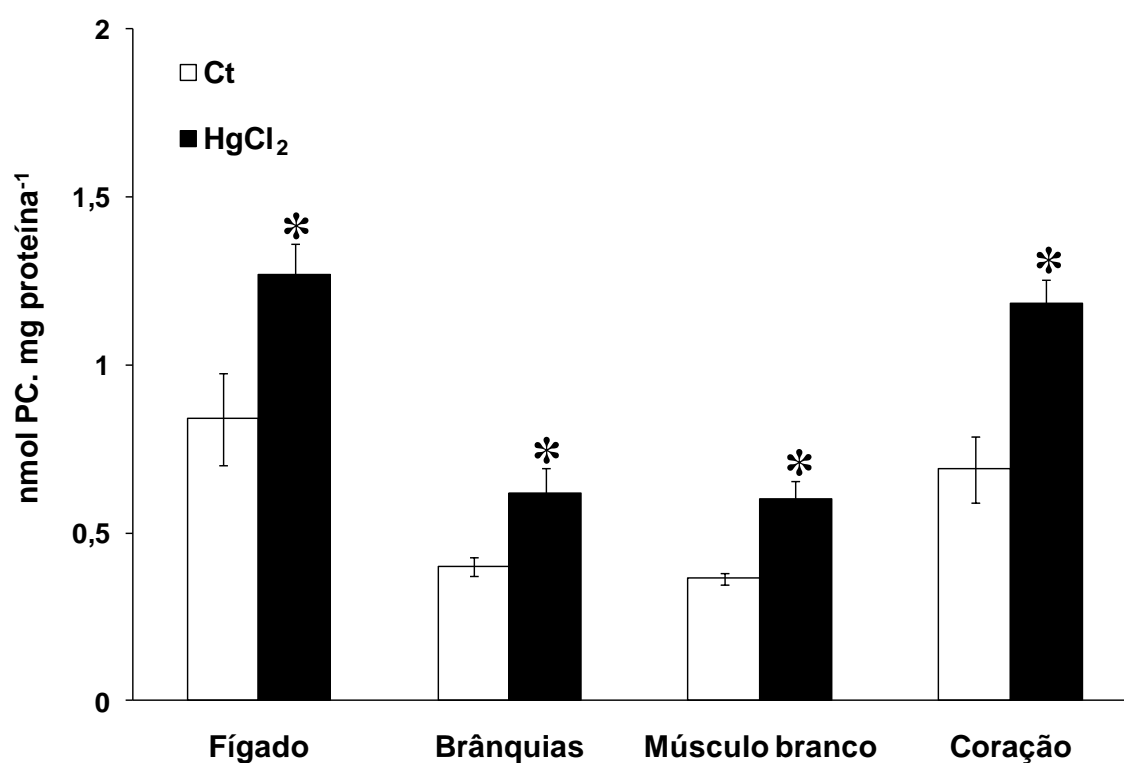


**Figura 5** - Níveis de equivalentes de malondialdeído (MDA – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

### 3.5 Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas

Danos oxidativos em proteínas também foram induzidos pela exposição ao HgCl<sub>2</sub>, de maneira semelhante aos danos oxidativos em lipídios detectados nos tecidos de matrinxãs. Aumentos significativos no conteúdo de proteína carbonilada (PC) no fígado, brânquias, músculo branco e coração (51%, 55%, 65% e 72%, respectivamente) foram observados nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>, em comparação com os conteúdos de PC observados nos peixes do controle. Tais resultados podem ser observados na Figura 6.





**Figura 6:** Níveis de proteína carbonilada (PC – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

### 3.6 Análise dos Níveis de Proteína Total

Conforme observado na Tabela 10, não foram observadas alterações significativas entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> na concentração de proteína total para todos os tecidos analisados.

**Tabela 10:** Valores médios ± E.P.M. dos níveis proteína total nos tecidos dos matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 10) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 10). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Níveis de proteína total (mg. g tecido <sup>-1</sup> ) nos tecidos	Grupos experimentais	
	Ct	HgCl <sub>2</sub>
Fígado	113,88 ± 3,54	107,14 ± 3,81
Brânquias	44,82 ± 2,55	47,23 ± 2,04
Músculo branco	38,70 ± 0,85	37,60 ± 0,57
Coração	60,73 ± 8,50	57,00 ± 5,90

#### 4. DISCUSSÃO

Os efeitos sub-letais de intoxicação mais comumente observados em peixes são alterações comportamentais, principalmente as que estão relacionadas ao padrão de natação. Os matrinxãs expostos ao mercúrio inorgânico mostraram intensa agitação e agressividade, com perda de equilíbrio e postura, permanecendo mais na superfície da água. Substâncias que atuam no sistema nervoso central, como os compostos mercuriais, podem ter um marcado efeito não somente na atividade espontânea, mas também na velocidade de natação dos peixes. Tanto o mercúrio orgânico quanto as formas inorgânicas causam danos no sistema nervoso central (SNC) de peixes teleósteos (BERNTSSEN et al., 2003).

Em peixes, o mercúrio é capaz de induzir disfunções bioquímicas no SNC como a inibição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, monoamino oxidase (MAO) e acetilcolinesterase (RAM & SATHYANESAN, 1985; GILL et al., 1990). Berntssen et al. (2003) avaliaram efeitos neurotóxicos do mercúrio em salmão do Atlântico, *Salmo salar*, após o tratamento crônico por quatro meses com cloreto de mercúrio, via dieta, na concentração de  $100 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$ . Os resultados observados foram a redução significativa da atividade da MAO e alterações patológicas no cérebro tais como proliferação de astrócitos, necrose e vacuolização. A redução na atividade da MAO, resultando em maior quantidade de catecolaminas circulantes, explicaria parcialmente a agitação e agressividade dos peixes expostos ao  $\text{HgCl}_2$  no presente estudo. Tanan et al. (2006) demonstraram que o metilmercúrio é altamente neurotóxico para a traíra, *Hoplias malabaricus*, prejudicando as funções visuais além de afetar outras funções do SNC. Assim, tanto as possíveis alterações bioquímicas no SNC como as histológicas podem ter sido responsáveis pelos comportamentos de perda de equilíbrio e postura anormal, além de intensa agitação e agressividade observadas nos matrinxãs durante a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ .

Adicionalmente, em relação ao grupo Ct, os matrinxãs do grupo  $\text{HgCl}_2$  apresentaram valor de IHS significativamente superior. Esses resultados podem refletir uma hipertrofia e/ou hiperplasia dos hepatócitos ou até mesmo a própria bioconcentração do metal no fígado, contribuindo para o aumento da massa hepática. O fígado é um órgão chave quando se considera a ação dos poluentes químicos sobre o peixe. É o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e provavelmente também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros xenobióticos se acumulam no fígado, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes no meio ambiente ou em outros órgãos do peixe (HEATH, 1995). Durante a exposição à xenobióticos, ocorre um aumento da massa hepática na tentativa de maximizar os processos de desintoxicação (PORTER & JANZ, 2003; FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006). Dessa forma, elevações do IHS como resultado de hiperplasia e/ou hipertrofia podem aumentar a capacidade de biotransformação de xenobióticos

(MARTIN & BLACK, 1998; FERNANDES et al., 2007). No presente estudo, essa hipótese foi corroborada por aumentos significativos na atividade da GST hepática nos matrinxãs expostos ao cloreto de mercúrio. Essa enzima é a principal responsável pela desintoxicação de xenobióticos, conforme discutido posteriormente.

Alguns estudos demonstraram que peixes coletados em rios impactados apresentam um aumento no tamanho do fígado quando comparados com peixes de ambientes não impactados (FABACHER & BAUMANN, 1985; McFARLAND et al., 1999). Isso indica uma maior atividade de desintoxicação do que a normal devido aos altos níveis absolutos de enzimas protetoras e desintoxicadoras como uma resposta adaptativa à exposições a poluentes. De acordo com Weis et al. (1986), em *Fundulus heteroclitus*, a exposição a 0,10 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> induziu aumentos no conteúdo lipídico do fígado. Os autores explicam que o aumento dos lipídios hepáticos ocorre na tentativa de seqüestrar as formas químicas solúveis em lipídios como o metilmercúrio, uma vez que os peixes são capazes de metilar o mercúrio inorgânico por meio de bactérias intestinais. Dessa forma, o aumento do conteúdo hepático de lipídios é um reflexo da bioacumulação do metal neste tecido.

Outra hipótese que não pode ser descartada para explicar o aumento do IHS observado nos matrinxãs é um possível edema resultante de um processo inflamatório hepático iniciado em resposta à exposição ao HgCl<sub>2</sub>. Gül et al. (2004a) examinando microscopicamente fígados de carpas coletadas de áreas poluídas encontraram infiltração de células inflamatórias, edema, degeneração gordurosa e congestão. Malbrouk et al. (2003) evidenciaram que peixes juvenis da espécie *Carassius auratus*, ao serem expostos à concentração de 125 µg.kg<sup>-1</sup> de microcistina, apresentaram desorganização de estrutura celular com algumas regiões de inflamação no citoplasma em apenas oito horas de exposição.

As alterações nos mecanismos bioquímicos antioxidantes catalisados pelas enzimas vêm sendo identificadas como biomarcadores da susceptibilidade celular a danos causados pelas ERO. Uma das principais características dessas enzimas é a indução de sua expressão e/ou atividade sob condições de estresse oxidativo, um mecanismo que pode ser uma adaptação importante ao estresse induzido por poluentes (LIVINGSTONE, 2001; ZHANG et al., 2004). O presente estudo demonstrou que a exposição do matrinxã por 96 horas a 0,15 ppm do HgCl<sub>2</sub>, em sistema estático, foi capaz de induzir um quadro de estresse oxidativo em todos os tecidos analisados, ou seja, em fígado, brânquias, músculo branco e coração. O HgCl<sub>2</sub> provocou alterações significativas nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST, GPx e GR, assim como no conteúdo de GSH e GSSG e nos níveis de peroxidação lipídica e protéica, além de alterar o conteúdo de metalotioneína.

Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de garantir a manutenção do estado redox celular, isto é, promover de maneira eficiente a eliminação das

EROs produzidas pelo metabolismo basal e, conseqüentemente, proteger contra as lesões oxidativas desencadeadas pelas EROs e outros radicais livres (OLIVEIRA et al., 2004). Entretanto, a exposição ao mercúrio levou a um desequilíbrio entre a produção de ERO e a atividade ineficiente dos mecanismos de defesa antioxidante e, conseqüentemente, lesões oxidativas foram estabelecidas. Os metais pesados podem aumentar a produção de EROs através do desacoplamento das reações de Haber-Weiss e reações do tipo Fenton, as quais produzem espécies reativas como o radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a partir da interação dos metais na sua forma iônica com o oxigênio molecular (LEONARD et al., 2004). O Hg, em especial, devido a grande afinidade pela GSH, pode levar a acumulação de EROs que normalmente são eliminadas por esse tripeptídeo (SARAFIAN, 1999; ERCAL et al., 2001). Um único íon Hg é capaz de se ligar irreversivelmente à GSH e causar a excreção de duas moléculas da mesma (QUIG, 1998). O Hg também aumenta a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por prejudicar a eficiência da fosforilação oxidativa e o transporte de elétrons entre ubiquinona-citocromo b5 (CHAVEZ & HOLGUIN, 1988; LUND et al., 1991; NATH et al., 1996), resultando em um escoamento prematuro de elétrons e geração de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Por fim, o Hg altera a homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando o influxo intracelular ao induzir a peroxidação lipídica que altera a permeabilidade da membrana (TAN et al., 1993). O  $\text{Ca}^{2+}$  é responsável pela ativação de várias enzimas hidrolíticas tais como proteases, endonucleases e fosfolipases. O excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  pode aumentar a produção das EROs por acelerar as diferentes vias regidas por tais enzimas. Em condições normais, estas enzimas produzem pequenas quantidades de espécies reativas que, por sua vez, são rapidamente degradadas pelo sistema de defesa antioxidante (ERCAL et al., 2001). Além disso, muitas das isoenzimas da superfamília dos citocromos P-450 são capazes de gerar radicais livres de diversas maneiras. Até mesmo na ausência de indutores, como substratos xenobióticos, algumas isoenzimas P-450 são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio, incluindo  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BONDY & NADERI, 1994). Essa taxa basal de produção de ERO pode aumentar significativamente pela ação de vários xenobióticos que atuam favorecendo esse “desacoplamento” ou induzindo a expressão dessas isoenzimas.

As atividades da SOD e da CAT aumentaram após a exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  em todos os tecidos analisado. As enzimas SOD e CAT estão relacionadas quanto às suas funções, uma vez que a SOD dismuta o radical ânion superóxido em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e este último, por sua vez, é decomposto pela ação da CAT. Devido ao efeito inibitório sobre a formação das ERO, o sistema SOD-CAT proporciona a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio (PANDEY et al., 2003) e é comumente usado como biomarcador indicativo da produção desses radicais livres (REGOLI et al., 2003; VAN der OOST et al., 2003). Atividades elevadas destas enzimas provavelmente constituem uma resposta ao aumento de geração das ERO, iniciado pela

toxicidade do metal (JOHN et al., 2001). Dessa maneira, o aumento das atividades da SOD e da CAT nos tecidos do matrinxã, promovido pela exposição ao mercúrio inorgânico, pode ser interpretado como uma adaptação deste sistema no sentido de compensar o aumento da produção de radical superóxido e, conseqüentemente, do peróxido de hidrogênio nos sítios de formação. A indução desse sistema de proteção, após a exposição a agentes indutores da produção das ERO, pode ser uma resposta adaptativa importante em agressões não-letais destas ERO na tentativa de neutralizar os seus impactos. A SOD e/ou a CAT podem intervir antes da reação lesiva inicial das primeiras espécies reativas de oxigênio (MOSLEN, 1995). Entretanto, no presente estudo, essa resposta adaptativa não foi suficiente para evitar danos oxidativos a lipídios e proteínas e neutralizar as ERO geradas após a exposição ao mercúrio inorgânico.

A indução do sistema SOD-CAT em peixes também foi relatado após a exposição a outros metais pesados. Aumentos da atividade da SOD foram observados no fígado e nos rins de tilápia mossambica, *Oreochromis mossambicus*, após 7 dias de exposição a  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cádmio (BASHA & RANI, 2003). No peixe paulistinha, *Brachydanio rerio*, a exposição por 14 dias a concentração sub-letal de  $140 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de sulfato de cobre, induziu elevações significativas na atividade da catalase hepática, que permaneceu com alta atividade mesmo após 14 dias de recuperação (PARIS-PALACIOS et al., 2000). Para o mercúrio, não há muitos dados na literatura que demonstrem os efeitos do metal sobre a atividade da SOD e da CAT em peixes.

Berntssen et al. (2003) estudaram a atividade da SOD no cérebro e no fígado de salmão do Atlântico, *Salmo salar*, após quatro meses de alimentação com dietas contendo  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de metilmercúrio ou  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ . Os autores verificaram aumentos significativos da SOD cerebral quando os salmões receberam metilmercúrio na dieta, provavelmente devido a grande facilidade deste composto orgânico em atravessar a barreira hemato-encefálica. Aumentos da atividade da SOD hepática foram observados somente nos salmões que receberam dieta contendo  $\text{HgCl}_2$ . Aumentos mais pronunciados da SOD foram observados no fígado e no coração (77% e 113%, respectivamente) dos matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  em comparação com outros tecidos como brânquias e músculo branco (19% e 14%, respectivamente). Isso provavelmente reflete o alto metabolismo oxidativo destes tecidos, que apresentam elevado número de mitocôndrias para obtenção de quantidades de energia suficientes para garantir a homeostasia do metabolismo intermediário ou garantir o funcionamento da bomba cardíaca.

Com exceção do fígado, aumentos significativos na atividade da GPx foram observados em todos os tecidos dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ . A GPx é uma enzima antioxidante endógena que catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de hidroperóxidos de ácidos graxos (LOOH, onde L é um lipídio), convertendo-os em água ou a seus correspondentes alcoóis não-tóxicos, respectivamente (NORDBERG & ARNER, 2001), às custas da oxidação da glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG) (SHAN et al., 1990).

A GPx é extremamente específica para a GSH e é capaz de desintoxicar rapidamente o  $H_2O_2$  e certos hidroperóxidos (LIEBLER & REED, 1997). A ação enzimática da GPx é um dos meios de controle do organismo dos níveis de  $H_2O_2$  e de hidroperóxidos lipídicos oriundos do ataque de espécies radicalares (COHEN & HOCHSTEIN, 1963; MEISTER & ANDERSON, 1983). As células animais contêm dois tipos de GPx, sendo que um deles é Se-dependente enquanto o outro não. O primeiro tipo é capaz de reduzir  $H_2O_2$  e qualquer hidroperóxido orgânico, possui peso molecular de 88-kDa, é uma proteína tetramérica e possui um átomo de selênio em cada subunidade em forma de selenocisteína (LIEBLER & REED, 1997). O segundo tipo, que não depende de selênio, chamado GPx5, tem peso molecular de 35-kDa, é uma proteína dimérica e é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, menos o  $H_2O_2$  (WILLIAMS et al., 1998). No presente trabalho, avaliamos a atividade da GPx Se-dependente.

A GPx apresenta alta atividade no fígado, moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos esqueléticos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Na maioria dos animais, a enzima dependente de selênio é responsável pela maior parte da atividade da GPx, mas a proporção entre as duas formas varia muito entre as diferentes espécies, bem como entre os tecidos de uma mesma espécie. De acordo com ZHANG et al. (2004), a GPx exerce um efeito importante contra a peroxidação lipídica, uma vez que está envolvida preferencialmente na remoção de peróxidos orgânicos, e, em pequena extensão, na remoção de  $H_2O_2$ . Dessa forma, a GPx tem um papel especialmente importante na proteção de membranas contra danos decorrentes da peroxidação lipídica. Essa observação sugere que a principal função da GPx está na terminação da propagação da cadeia de radicais (VAN der OOST et al., 2003). Entretanto, os aumentos na atividade da GPx nas brânquias, no músculo branco e coração dos matrinxãs expostos ao  $HgCl_2$ , não foram suficientes para evitar aumentos no processo de lipoperoxidação em tais tecidos, conforme discutido posteriormente.

Aumentos na atividade da GPx foram observados em peixes expostos a diferentes xenobióticos (ALMEIDA et al., 2002; SAYEED et al., 2003; ZHANG et al., 2004). O cloreto de mercúrio aumentou a atividade da GPx em fígado de salmão-do-Atlântico, *S. salar*, após a exposição, via dieta, a 100 mg de  $HgCl_2$  por kg de dieta (BERNTSSEN et al., 2003). No bagre, *Ictalurus melas*, a exposição a 35  $\mu g.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  também induziu aumentos significativos na atividade da Se-GPx hepática. Entretanto, no presente estudo, a atividade da GPx hepática não se alterou após a exposição ao  $HgCl_2$ , contribuindo para o aumento da peroxidação lipídica. Como a GPx utiliza GSH na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídio e do  $H_2O_2$ , o aumento de 42% do conteúdo de GSH hepático frente a exposição ao mercúrio inorgânico foi, provavelmente, insuficiente para suportar aumentos na atividade da GPx no tecido hepático.

Diferentemente da maioria das espécies de peixes da bacia amazônica, um alto conteúdo de vitamina E foi encontrado no fígado de *Brycon cephalus* (WILHELM-FILHO &

MARCON, 1996). A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel que desempenha uma função essencial na proteção contra a peroxidação lipídica (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991), eliminando tanto o oxigênio "singlet" como os radicais hidroxil e peroxil. A vitamina E constitui-se, provavelmente, no inibidor mais importante da reação em cadeia da peroxidação lipídica em peixes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Esse alto nível de vitamina E presente no fígado de matrinxã possivelmente constitui uma proteção adicional contra o processo de peroxidação lipídica. Dessa forma, a não alteração da GPx hepática nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> pode ter sido decisiva para elevações significativas da lipoperoxidação.

Existe uma polêmica em relação ao papel da CAT e da GPx no processo de desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se consideradas as características cinéticas, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia ser metabolizado preferencialmente pela GPx, que apresenta baixo K<sub>m</sub> para este substrato comparativamente à CAT. Esta, por sua vez, seria mais importante na desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando este composto estivesse presente em altas concentrações, como por exemplo, na exposição a poluentes. Contudo, a afirmação da maior participação de uma enzima em relação à outra, baseada apenas em suas afinidades pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode induzir erros na interpretação do papel fisiológico de cada tipo enzimático. Os resultados obtidos no presente estudo suportam a idéia de que estas enzimas são igualmente importantes na manutenção dos níveis basais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentando uma interdependência funcional, uma vez que aumentos das atividades tanto da GPx como da CAT ocorreram no músculo branco, nas brânquias e no coração dos peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub>, não havendo mecanismos de compensação entre as enzimas. No fígado, onde a atividade da GPx permaneceu inalterada após a exposição ao HgCl<sub>2</sub>, o aumento da atividade da CAT não foi superior àqueles observados para os demais tecidos.

A GST faz parte de uma família de isoenzimas que desempenha um papel importante na resposta ao estresse oxidativo. É considerada uma enzima de desintoxicação por metabolizar uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, como os xenobióticos, por meio da conjugação destes com a GSH, formando conjugados solúveis em água, reduzindo sua toxicidade e facilitando sua excreção (WILCE & PARKER, 1994; VAN der OOST et al., 2003). A GST também promove a conjugação da GSH a produtos endógenos causadores de danos oxidativos como radicais hidroxil citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (DUDLER et al., 1991; BARLING et al., 1993). A susceptibilidade de diferentes espécies de peixes a químicos carcinogênicos pode ser modulada pela atividade da GST (VARANASI et al., 1987). A GST está envolvida nos processos de desintoxicação de xenobióticos, incluindo os metais pesados. Esta enzima exerce um importante papel na proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo (FOURNIER et al., 1992; BANERJEE, 1999). O aumento da atividade da GST nos tecidos pode indicar o desenvolvimento

de um mecanismo de defesa para tentar combater os efeitos do cloreto de mercúrio, o que pode se refletir em uma proteção mais eficiente à toxicidade do metal.

Corroborando as idéias acima citadas, aumentos pronunciados na atividade da GST foram observados no fígado, brânquias, músculo branco e coração de matrinxã após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , sugerindo um aumento nos processos de desintoxicação. Esta enzima tem sido apontada como um biomarcador útil na avaliação do impacto ambiental causado por xenobióticos orgânicos geradores de estresse oxidativo (RODRIGUEZ-ARIZA et al., 1991; LIVINGSTONE, 1998). A atividade da GST foi mais elevada no fígado em comparação com as atividades em brânquias, músculo branco e coração, o que indica uma função hepática efetiva no processo de desintoxicação (BASHA & RANI, 2003). Algumas isoformas da GST também apresentam atividade de GPx selênio-independente, por atuarem diretamente sobre qualquer hidroperóxido orgânico, menos o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BARLING et al., 1993). Dessa forma, aumentos pronunciados na atividade da GST no fígado (43%), brânquias (198%), músculo branco (145%) e coração (332%) dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , refletem a atuação desta enzima na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídios resultantes do processo de peroxidação lipídica, uma vez que o método utilizado para medida da atividade da GST utiliza o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, que é substrato comum para a maioria das isoformas da GST (HABIG et al., 1974).

O aumento da atividade da GST no fígado, nas brânquias e no coração após 96 horas de exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  foi acompanhado por um concomitante aumento nos níveis de GSH. Já no músculo branco, o aumento da atividade da GST foi acompanhado por uma redução concomitante no conteúdo de GSH. Assim como a atividade da GPx depende da concentração de GSH, de maneira semelhante, a atividade da GST também depende da concentração de GSH, uma vez que esta enzima utiliza a GSH na conjugação a compostos eletrofílicos no processo de desintoxicação de xenobióticos, permitindo a excreção dessas substâncias potencialmente nocivas (LIEBLER & REED, 1997; SIES, 1999).

Quando em contato com alguns poluentes as células dos peixes usualmente tentam removê-los por conjugação direta com a GSH ou pela ação da GST, o que diminui os níveis de GSH. A GST utiliza a GSH no processo de desintoxicação de xenobióticos. A redução do conteúdo de GSH no músculo branco de *B. amazonicus*, observada no presente trabalho após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  é, provavelmente, uma indicação de sua exaustão no processo de biotransformação de fase II, confirmada pelo aumento da atividade da GST em cerca de 145% em relação ao controle. Nesta circunstância, parece que a depleção da GSH aumenta o risco de estresse oxidativo devido à redução da capacidade de proteção, desde que a sobrecarga oxidativa comprovada pelos aumentos na atividade da SOD e da CAT nesse tecido sobrepôs os mecanismos antioxidantes de defesa que não foram suficientes para evitar danos lipídicos e protéicos.



No presente trabalho, os aumentos dos níveis de GSH no fígado e nas brônquias dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  foram acompanhados por aumentos na atividade da GR e nenhuma alteração no conteúdo de GSSG, de maneira a se ter elevações na razão GSH:GSSG nesses tecidos. Entretanto, no músculo branco houve redução do conteúdo de GSH, nenhuma alteração na atividade da GR e aumentos significativos dos níveis de GSSG, resultando em uma diminuição da razão GSH:GSSG. No coração, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  induziu aumentos nas concentrações de GSH e GSSG e na atividade da GR, enquanto que a razão GSH:GSSG, mesmo permanecendo inalterada em relação ao controle, mostrou uma tendência a diminuição.

A GSH tem papel central na desintoxicação de compostos eletrofílicos e na prevenção do estresse oxidativo celular (HASSPIELER et al., 1994; SIES, 1999). A redução significativa no conteúdo de GSH no músculo branco de *B. amazonicus* após a exposição ao cloreto de mercúrio poderia ter sido causada tanto por um aumento na utilização da GSH, que estaria sendo conjugada com o  $\text{HgCl}_2$ , quanto pela inibição de sua síntese no fígado, ou ainda por uma ineficiência na regeneração desta molécula pela GR, que manteve sua atividade constante em comparação ao controle. A diminuição do conteúdo de GSH resulta num aumento da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que, em presença de metais, pode ser um dos fatores geradores de  $\text{OH}^\bullet$  (SALVADOR et al., 2004), aumentando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica. A GR não age diretamente na remoção de ERO, porém é responsável pela regeneração de GSSG à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (ROVER et al., 2001).

Durante um processo moderado de estresse oxidativo, os níveis de GSH poderiam aumentar como uma resposta adaptativa por meio do aumento de sua síntese e/ou regeneração pela GR, conforme observado no fígado, nas brônquias e no coração dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , embora esta resposta adaptativa não tenha sido eficaz na remoção das ERO, levando a danos oxidativos. Por outro lado, o estresse oxidativo severo pode reduzir os níveis de GSH por prejudicar os mecanismos adaptativos (ZHANG et al., 2004).

De acordo com ELIA et al. (2003), a depleção da GSH pode limitar a capacidade da célula em seqüestrar radicais livres, aumentando o potencial oxidativo de maneira geral. A GSH pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (UHLIG & WENDEL, 1992). Essa resposta parece ter ocorrido no músculo branco e, em menor grau, no coração dos animais expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloreto de mercúrio.

Um dos papéis do ciclo redox da GSH e das enzimas que compõem seu metabolismo é o de manter os níveis de hidroperóxidos lipídicos controlados, para evitar danos celulares provenientes do ataque das ERO (ROVER et al., 2001). A depleção de 20 a 30% dos

níveis normais de GSH prejudica o sistema de defesa celular contra ações tóxicas tanto de espécies reativas de oxigênio como de intermediários biológicos reativos, o que pode levar à injúria e morte celular (LIEBLER & REED, 1997). Esta diminuição dos níveis de GSH reflete um aumento na produção de oxidantes, num grau que excederia a capacidade de desintoxicação pela GSH (BRAY & TAYLOR, 1993; MEISTER, 1995).

O estresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox da glutatona, aumentando a liberação de glutatona oxidada no organismo (ROVER et al., 2001). Pertencente ao primeiro grupo de antioxidantes solicitados como resposta a um desbalanço oxidativo, a GSH ou o dissulfeto (GSSG) aparecem como moléculas chave no estudo do metabolismo de xenobióticos. Podem reagir diretamente com espécies radicalares impedindo reações de propagações em membranas biológicas. São imprescindíveis em processos de biotransformação de poluentes, conjugando uma variedade de metabólitos eletrofílicos através da glutatona S-transferase. Além disso, participam na desintoxicação de peróxidos junto com a glutatona peroxidase (TORRES & NETO, 2007). Assim, o índice redox GSH:GSSG torna-se uma avaliação importante, figurando como um imprescindível marcador bioquímico em células sob exposição a agentes tóxicos (REED, 1990).

Se, de fato, grande parte da ação da GSH é obtida pela indução das enzimas que a usam como substrato, o controle do nível de GSH é necessário para manter a ação funcional destas enzimas (JONES, 1995). Além disso, variações nos níveis de glutatona afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA (MEISTER & ANDERSON, 1983; DENEKE & FANBURG, 1989), uma vez que a regulação redox de sinais dependentes de receptores de membrana e vários sinais de transcrição são influenciados pelo nível intracelular de GSH (DROGE, 2002). No presente estudo, a diminuição dos níveis de GSH no músculo branco dos matrinxãs após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  foi acompanhada pelo aumento da atividade da GPx. Usando GSH como agente redutor, a enzima GPx catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou de peróxidos orgânicos em água ou em compostos alcoólicos estáveis, respectivamente. A atividade da GPx depende da presença da GSH, que é oxidada nesse processo, e, assim, a atividade da GPx pode ser influenciada pelos níveis de GSH. A diminuição na disponibilidade de GSH pode limitar o papel da GPx na desintoxicação eficiente de hidroperóxidos de lipídios (CHEUNG et al., 2004), permitindo aumentos significativos no processo de peroxidação lipídica, como observado no presente estudo.

O mercúrio inorgânico possui grande afinidade por grupos sulfidrilas (-SH) de biomoléculas endógenas (CLARKSON, 1997). Deste modo, ele pode se complexar com estruturas que contêm estes grupos sulfidrilas, como a cisteína e a glutatona (ZALUPS, 2000) e também com as metalotioneínas (YOSHIDA et al., 1999), que são proteínas de baixo peso molecular que podem se complexar tanto com metais essenciais (zinco e cobre) como com metais pesados

(mercúrio, arsênico e cádmio) (FOULKES, 1982). Dessa forma, a GSH pode ser reduzida em função da exposição ao mercúrio (ERCAL et al., 2001). No bagre, *Ictalurus melas*, a exposição a  $35 \mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  também induziu redução significativa no conteúdo de glutatona total. Em ratos, a administração intravenosa de cloreto de mercúrio na dose de  $0,5 \mu\text{mol.Kg}^{-1}$  também resultou em depleção da GSH no fígado e nos rins (ZALUPS et al. 1997).

O fígado é a principal fonte de GSH plasmática (KAPLOWITZ et al., 1985). Portanto, com a redução do conteúdo hepático de GSH, uma menor quantidade deste tripeptídeo seria exportada para o plasma, o que poderia diminuir a disponibilidade da glutatona para tecidos extra-hepáticos como músculo, brânquias e coração, levando à exaustão de GSH nestes tecidos. Assim, como o restabelecimento do conteúdo de GSH no músculo é mais difícil que no fígado, as reduções do conteúdo de GSH neste tecido seriam melhores biomarcadores de exposição (PEÑALLOPIS et al., 2003). Essa idéia é corroborada pelos resultados do presente trabalho, em que o conteúdo de GSH hepático sofreu aumento significativo e o músculo branco sofreu redução significativa no conteúdo desse tripeptídeo. Assim, simultaneamente com a utilização da GSH por sistemas enzimáticos de desintoxicação, a hipótese de redução de sua síntese no fígado com a diminuição na exportação de GSH para o plasma e o conseqüente aporte insuficiente para os tecidos não pode ser descartada, mesmo que os mecanismos de síntese da GSH não tenham sido investigados no presente estudo.

A peroxidação lipídica vem sendo apontada como o maior contribuinte para a perda das funções celulares sob condições de estresse oxidativo (STOREY, 1996). A LPO implica em alterações na estrutura das membranas celulares resultando em transtornos de permeabilidade, alteração do fluxo iônico e de outras substâncias, perda de seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alteração do DNA e oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, além do comprometimento dos componentes da matriz extracelular como proteoglicanos, colágeno e elastina (BABER & HARRIS, 1994). A perda da seletividade iônica, a liberação do conteúdo de organelas e a formação de produtos citotóxicos podem culminar em morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). A oxidação de lipídios de membranas por radicais de  $\text{O}_2$  altera a fluidez da membrana e pode levar ao seu rompimento (HALLIWELL, 1992). O rompimento de membranas de determinadas organelas pode provocar a liberação de proteases e íons  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo induzir mutações no DNA e a degradação celular. Além disso, os lipídios oxidados podem ser quebrados em moléculas menores, como determinados aldeídos como o malondialdeído (MDA), que por si só são tóxicas às células (FULLER, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989)

Vários estudos mostram que a peroxidação lipídica nos organismos aquáticos é induzida por uma variedade de poluentes ambientais (PLOCH et al., 1999; AHMAD et al., 2000; WILHELM-FILHO et al., 2001; OAKES & VAN der KRAAK, 2003; OAKES et al., 2004).

Considerando que a reação típica durante o dano oxidativo causado pelas ERO envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados, nossos resultados claramente mostraram que a exposição por 96 horas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  provocou estresse oxidativo em *B. amazonicus*, com aumentos significativos dos valores de CHP e MDA em todos os tecidos analisados. Esse aumento da peroxidação lipídica sugere que o dano oxidativo induzido pelas ERO pode ser um dos principais efeitos tóxicos do  $\text{HgCl}_2$ . Uma vez que a lipoperoxidação é considerada um indicador útil do dano oxidante de componentes celulares, nossos resultados sugerem que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  aumentou a síntese das ERO no fígado, brânquias, músculo branco e no coração de matrinxãs e que as defesas antioxidantes não foram totalmente eficazes na neutralização efetiva desses radicais, desencadeando assim, o processo de LPO.

Embora os processos de desintoxicação ocorram principalmente no fígado, o músculo esquelético também está envolvido nesse processo. As células musculares expressam diferentes tipos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, incluindo a citocromo P450 (OTTO & MOON, 1995; BAINY et al., 1999; SMITH et al. 2000) e a glutathione S-transferase (HUSSEY et al. 1991; VAN der WEIDEN et al., 1992; NAM et al., 2005). Ainda que haja uma quantidade relativamente menor de enzimas no músculo esquelético em relação ao fígado, os processos de desintoxicação que ocorrem no músculo devem ser considerados importantes porque este tecido representa uma alta porcentagem da massa corpórea.

As brânquias, por apresentarem uma larga área superficial e grande permeabilidade, são os sítios primários de absorção e de ação de xenobióticos (SANCHO et al., 1997). Dessa maneira, é condizente encontrar um alto nível de hidroperóxidos de lipídios nas mesmas. Estudos sobre os efeitos do endosulfan e de efluentes de fábrica de papel em peixes vêm mostrando que as brânquias são os órgãos mais sensíveis a LPO induzida por esses xenobióticos (FATIMA et al., 2000; PANDEY et al., 2001; SAYEED et al., 2003).

Oliveira-Ribeiro et al. (2000) avaliaram danos branquiais induzidos pelo  $\text{HgCl}_2$  no peixe-gato tropical, *T. zonatus*, e na espécie nórdica de salmão *Salvelinus alpinus*. Foram observadas alterações patológicas branquiais como hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais das lamelas secundárias, epitélio escamoso, formação de pontes interlamelares reduzindo o espaço da água e, em alguns casos, chegando à fusão completa de lamelas secundárias adjacentes. Os autores ainda ressaltam que essas alterações no epitélio branquial foram mais evidentes na espécie tropical. Os resultados encontrados no presente estudo, como sinais de hemorragia branquial e aumentos na peroxidação lipídica e protéica nas brânquias dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  estão em concordância com os achados histológicos encontrados no estudo de Oliveira-Ribeiro et al. (2000).

No presente estudo, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  induziu um maior nível de MDA nos tecidos musculares dos matrinxãs e um maior nível de CHP nas brânquias. Os métodos utilizados

para a avaliação da peroxidação lipídica quantificam diferentes produtos da cadeia de lipoperoxidação. Enquanto o ensaio TBARS avalia os níveis de malondialdeído, um dos produtos finais do processo de lipoperoxidação, o ensaio FOX avalia os níveis de hidroperóxido de lipídios medidos em equivalente de CHP, produto das etapas iniciais da lipoperoxidação (MAIDANA et al., 2006). Esse padrão observado para os tecidos de matrinxã exposto ao mercúrio inorgânico pode ser o reflexo de diferentes dinâmicas tecido-específicas na reação em cadeia de propagação da peroxidação lipídica. Weis et al. (1986) avaliaram a distribuição do mercúrio nas diferentes frações sub-celulares dos hepatócitos do peixe mummichog, *F. heteroclitus*, expostos a  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ . A distribuição do Hg ficou em 6% no núcleo, 60,8% nas frações citoplasmáticas não-lipídicas, 28% nos lipídios e 5,3% nos lisossomas. Além disso, estes autores verificaram que o  $\text{HgCl}_2$  pode interagir com as membranas lipídicas de maneira muito mais pronunciada do que o cobre, outro metal analisado pelos mesmos, induzindo diretamente a LPO.

Além dos danos oxidativos aos lipídios, o presente trabalho também demonstrou que a exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  induziu aumentos no conteúdo de proteína carbonilada em todos os tecidos analisados. Um aumento no número de grupamentos carbonil está correlacionado com o dano protéico causado pelo estresse oxidativo (SHAETER et al., 1994). Conseqüentemente, a determinação do conteúdo de PC pode ser usada como avaliação do dano oxidativo protéico (FAGAN et al., 1999). O grupamento carbonil pode ser adicionado a proteínas por várias vias diferentes, entre elas a oxidação catalisada por metais, a adição de lipídios e açúcares carbonilados ou ainda por ação das EROs (GRUNE, 2000; REQUENA et al., 2003).

De acordo com Donne et al. (2003), os grupos carbonil são produzidos pela oxidação da cadeia lateral de aminoácidos suscetíveis, especialmente: prolina, arginina, lisina e treonina. Eles também podem ser gerados através da clivagem oxidativa das proteínas, tanto por  $\alpha$ -amidação quanto por oxidação das cadeias laterais de glutamato, levando a formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado por um derivado  $\alpha$ -cetoacil. Os grupos carbonil também podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas de cisteína, histidina e lisina com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (como o malondialdeído entre outros).

Além disso, derivados carbonil reativos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como uma conseqüência da reação de açúcares redutores, ou seus produtos de oxidação com resíduos de lisina das proteínas (reações de glicação ou glicooxidação) com a eventual formação de produtos finais de glicação-lipoxidação avançados, podem levar a formação de grupos carbonil. A formação de derivados carbonilados é irreversível, levando a alterações conformacionais nas proteínas, diminuindo a atividade catalítica das enzimas e/ou aumentando a susceptibilidade das proteínas à ação de proteases, resultando em quebra de cadeias polipeptídicas (ALMROTH et al., 2005). Os danos oxidativos às proteínas podem afetar a função de receptores, enzimas,

anticorpos, proteínas de transporte, etc., causando alterações funcionais na célula (GARCEZ et al., 2004, NYSTRÖM, 2005).

As metalotioneínas (MTs) são proteínas com massa molecular de aproximadamente 6-15 kDa, contêm cerca de 30% de resíduos de cisteína e apresentam afinidade pelo mercúrio, cádmio, cobre e zinco (MONSERRAT et al., 2006). De forma geral, a MT tem um importante papel na homeostase de metais essenciais como  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  e na desintoxicação de metais pesados como  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , diminuindo a concentração desses metais livres nos tecidos. As MTs também são importantes no mecanismo de defesa para neutralizar o impacto de EROs, atuando como seqüestradoras (“scavengers”) de radicais livres e/ou de espécies reativas de oxigênio (SCHLENK et al., 1999; VIARENGO et al., 1997; AHMAD et al., 2000; BRAGIGAND & BERTHET, 2003; MAYER et al., 2003; RYU et al., 2003), processos estes que são tempo-, idade-, sexo- e espécie-dependentes (OLSSON, 1996). A MT, normalmente presente em condições fisiológicas, pode ser induzida pela exposição ao zinco, cádmio, mercúrio e a altas doses de cobre (DUTTON et al., 1993; HEATH, 1995; DAVIS & COUSINS, 2000; LINDE et al., 2001; BRAGIGAND & BERTHET, 2003; CARVALHO, 2003; CARVALHO et al., 2004; WU et al., 2006), por hormônios e em resposta ao estresse físico ou químico (KAGI & SCHAFFER, 1988; AHMAD et al., 2000; HIDALGO et al., 2001).

Recentemente, as atenções têm sido voltadas para o papel da MT como biomarcador na prevenção da contaminação com metais pesados (OLSSON, 1996; CROTEAU et al., 2002). Embora as MTs estejam naturalmente presentes em todas as células animais, como uma forma de armazenamento de metais essenciais e com um papel conspícuo no controle e regulação intra e extra-celular destes metais (EROGLU et al., 2005), a indução das MTs tem sido relatada após exposição a metais pesados, sendo os indutores mais importantes o cádmio, o zinco, o cobre e o mercúrio (ROESIJADI & ROBINSON, 1994; CHEUNG et al., 2004). Devido ao papel da MT na desintoxicação de metais e no estresse oxidativo, a expressão elevada desta proteína pode ser utilizada como um sinal de alteração na função celular, servindo também como indicador bioquímico na exposição a metais e no estresse celular em peixes.

Em diversas funções orgânicas, a MT participa ativamente dos processos reguladores da homeostase de cobre e zinco intracelular (PEDROSA & COZZOLINO, 1999). O grau de indução da MT varia entre as espécies e tecidos. O envolvimento da MT no seqüestro de metais é mais evidente nas brânquias, fígado e rim, refletindo a importância destes tecidos na tomada, estoque e excreção dos metais pesados (CAJARAVILLE et al., 2000). Essas evidências foram corroboradas pelos resultados do presente trabalho, onde a exposição ao cloreto de mercúrio provocou a indução significativa da MT no fígado, brânquias e coração dos matrinxãs, mas nenhuma alteração foi observada no músculo branco. A incapacidade do músculo branco em aumentar o conteúdo de MT pode ter contribuído para a redução significativa da relação

GSH:GSSG, uma vez que o metal estaria mais disponível para se ligar irreversivelmente a GSH. Tal situação se agrava ao se levar em conta que o músculo branco depende de um aporte exógeno de GSH para a manutenção do conteúdo deste tripeptídeo. Existem três possíveis mecanismos pelos quais a GSH pode proteger a célula contra a toxicidade induzida pelo Hg: 1) a GSH pode unir-se ao Hg, facilitando assim a saída do metal das células e do organismo; 2) essa conjugação do Hg com a GSH pode evitar a união do Hg a alvos sensíveis na célula e; 3) a GSH pode eliminar as EROs formadas por efeito do Hg (HOFFMAN & HEINZ, 1998).

Diferentes espécies de peixes mostram diferentes taxas de acúmulo de metais e concentrações de MT. Da mesma forma, diferentes órgãos acumulam metais em diferentes níveis devido às diferenças na fisiologia e bioquímica dos mesmos. Os dados referentes à bioacumulação do mercúrio nos tecidos de matrinxã após a exposição ao HgCl<sub>2</sub> discutidos no capítulo III, mostraram uma acumulação significativa do mercúrio seguindo a ordem brânquias >> fígado >> coração > músculo branco. Com exceção do músculo branco onde o tipo de metabolismo e o tempo de exposição pode não ter sido suficiente para promover uma acumulação significativa do metal, a ordem de acumulação do metal foi inversa aos níveis de indução da MT. Dessa forma, no coração houve a maior indução da MT (40%) e foi o tecido que menos acumulou Hg, enquanto que no fígado e nas brânquias as induções foram de 22 e 17%, respectivamente e a acumulação maior foi nas brânquias. Em carpas (*Cyprinus carpio*) há uma forte correlação entre os níveis de cobre e o conteúdo de MT no fígado e uma baixa correlação no músculo branco (De BOECK et al., 2003).

Sahib et al. (1984) e Fernández-Veja et al. (2002) sugerem que peixes expostos a contaminantes podem alterar o conteúdo de proteína (hepática e muscular) indicando uma resposta adaptativa fisiológica para compensar a condição de estresse ao tóxico. Entretanto, no presente estudo, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> não alterou os níveis de proteína total nos tecidos dos matrinxãs, o que sugere que nesse período de exposição (96 horas), as proteínas não foram utilizadas como o combustível preferido para fornecer a demanda de energia durante uma situação de estresse. Além disso, as elevações nas atividades dos antioxidantes observadas nos diferentes tecidos dos matrinxãs frente à exposição ao HgCl<sub>2</sub> são decorrentes somente da indução de suas atividade e/ou expressão, uma vez que os valores são expressos em unidades específicas normalizadas pelo conteúdo de proteína total.

No presente trabalho, respostas tecido-específicas relacionadas às defesas antioxidantes e aos danos oxidativos foram observadas sendo que o HgCl<sub>2</sub> induziu o estresse oxidativo em todos os tecidos analisados.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, sobre os efeitos do  $\text{HgCl}_2$  nos biomarcadores de estresse oxidativo em fígado, brânquias, músculo branco e coração de matrinxãs, *B. amazonicus*, são sumarizados nos esquemas propostos nas figuras 7 a 10.

Os resultados apresentados aqui permitem concluir que o mercúrio, mesmo na sua forma inorgânica, em uma exposição aguda de 96 horas e numa dose sub-letal é um potente indutor de estresse oxidativo em matrinxã, capaz de comprometer funções das membranas lipídicas e de proteínas essenciais na manutenção da homeostasia celular pois elevou significativamente os níveis de peroxidação lipídica e protéica em todos os tecidos analisados. As atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST aumentaram de maneira significativa em todos os tecidos como uma resposta adaptativa na tentativa de neutralizar a sobrecarga de ERO induzida pelo metal. A exposição ao  $\text{HgCl}_2$  também elevou significativamente atividade da GPx nas brânquias, músculo branco e coração além de promover aumentos nos níveis de MT no fígado, brânquias e coração. No fígado e nas brânquias aumentos na relação GSH:GSSG também foram observados indicando um maior aporte de GSH nesses tecidos. Tais adaptações do sistema de defesa antioxidante do *B. amazonicus* frente à exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  não foram suficientes para evitar os danos oxidativos em tais tecidos.

O músculo branco e o coração parecem ser os tecidos mais sensíveis a tais danos, apresentando sinais de perdas na homeostase redox, com diminuição na relação GSH:GSSG ou tendência a diminuição, com aumentos significativos no conteúdo de GSSG. O  $\text{HgCl}_2$  induziu aumentos significativos na atividade da GR e nos níveis de GSH em todos os tecidos exceto no músculo branco, onde nenhuma alteração foi observada no conteúdo de MT e na na atividade da GR com concomitante redução significativa no conteúdo de GSH. Por outro lado, no tecido cardíaco houve uma indução da atividade da GR, o que pode ser responsável apenas pela tendência de redução da razão GSH:GSSG. As principais causas dessas diferenças poderiam ser atribuídas a diferentes taxas de geração das ERO e a diferentes potenciais antioxidantes dos tecidos (WINSTON, 1991; FATIMA et al., 2000).

Os resultados do presente estudo demonstram que mesmo exposições agudas a baixas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  podem ser potencialmente prejudiciais à saúde e à sobrevivência da espécie que é nativa de regiões amazônicas amplamente impactadas pela contaminação do Hg proveniente de garimpos.



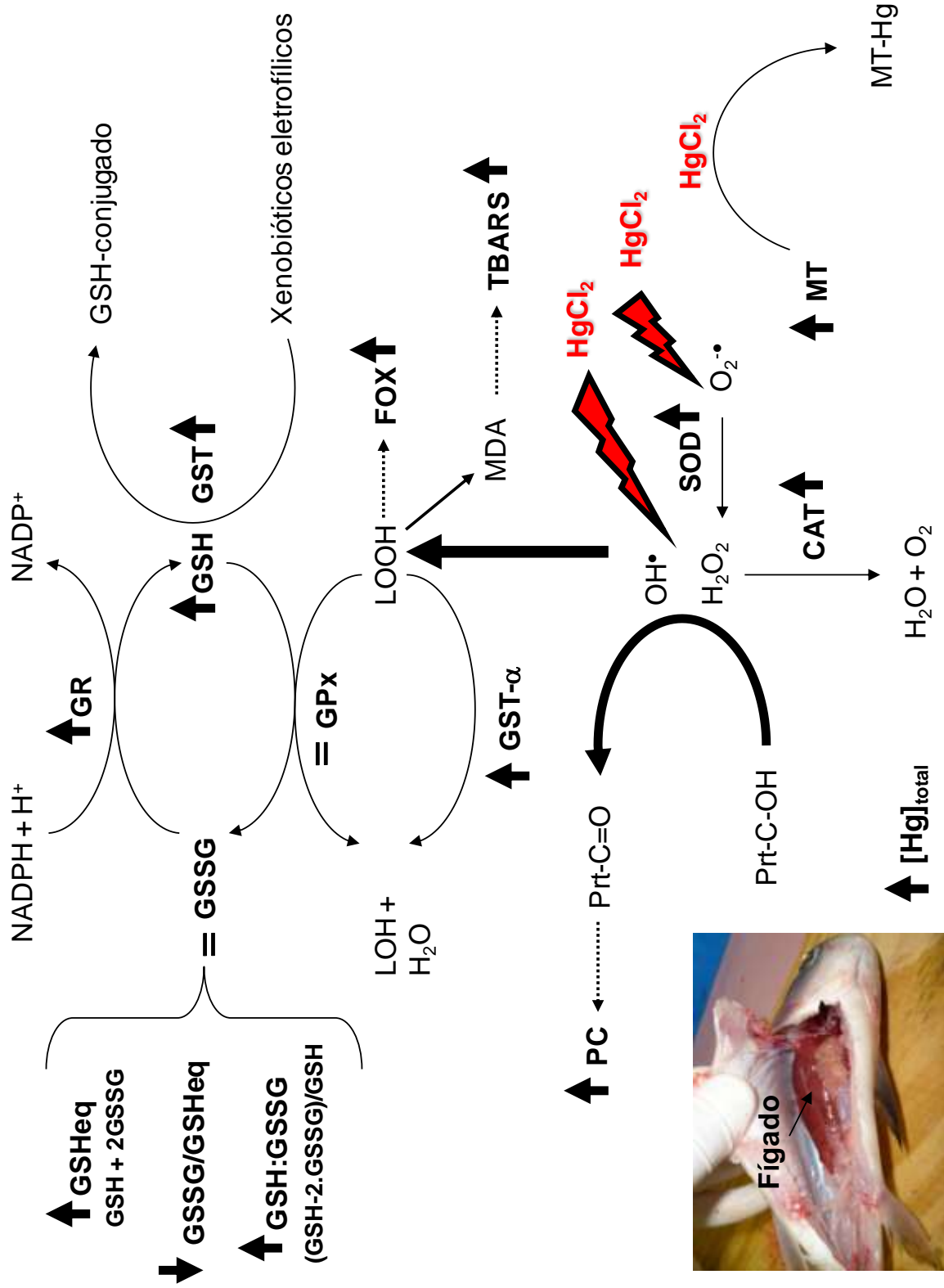


Figura 7 - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no fígado de matrinxã após 96 horas de exposição ao HgCl<sub>2</sub>.

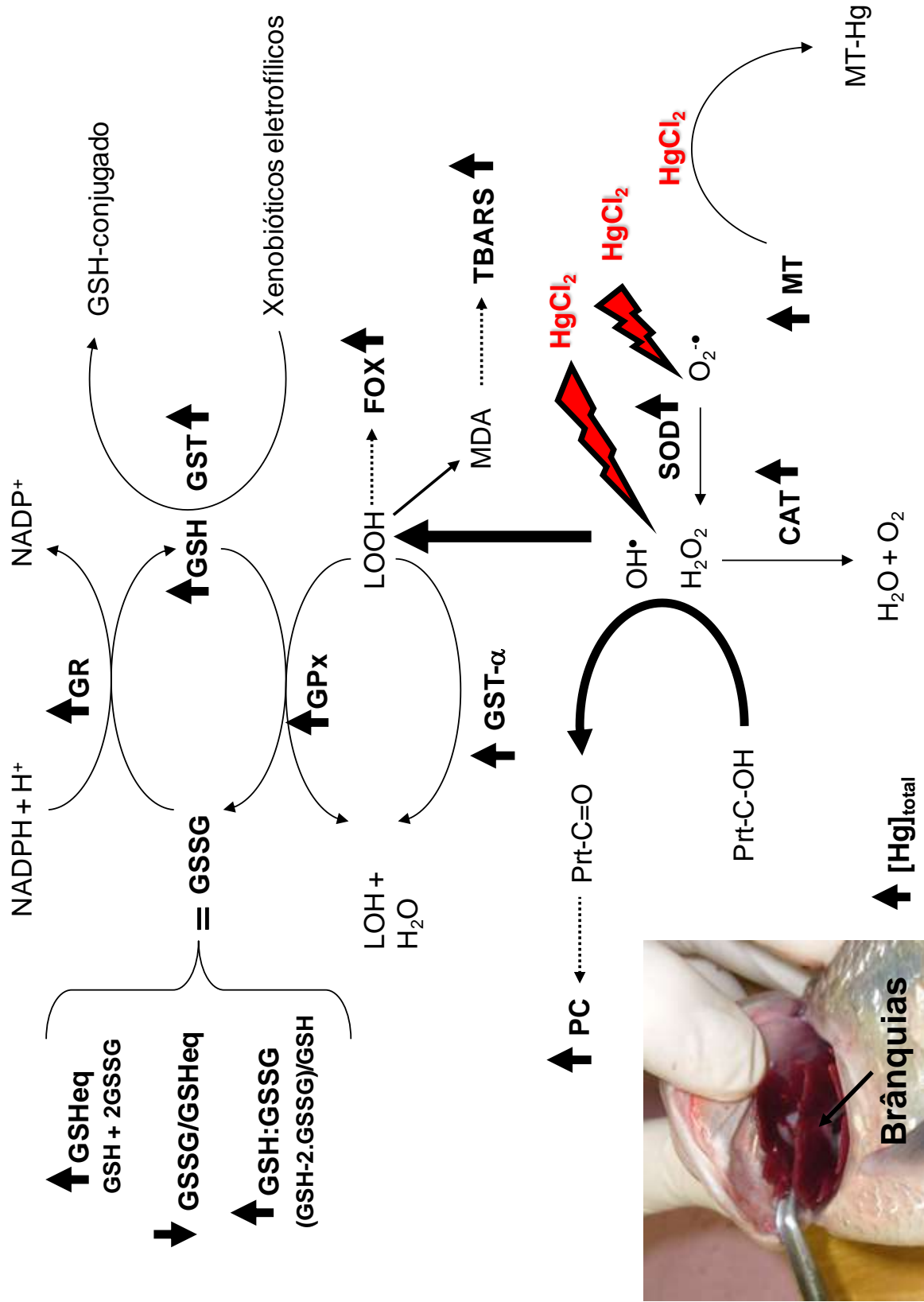


Figura 8 - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas nas brânquias de matrinxã após 96 horas de exposição ao HgCl<sub>2</sub>.

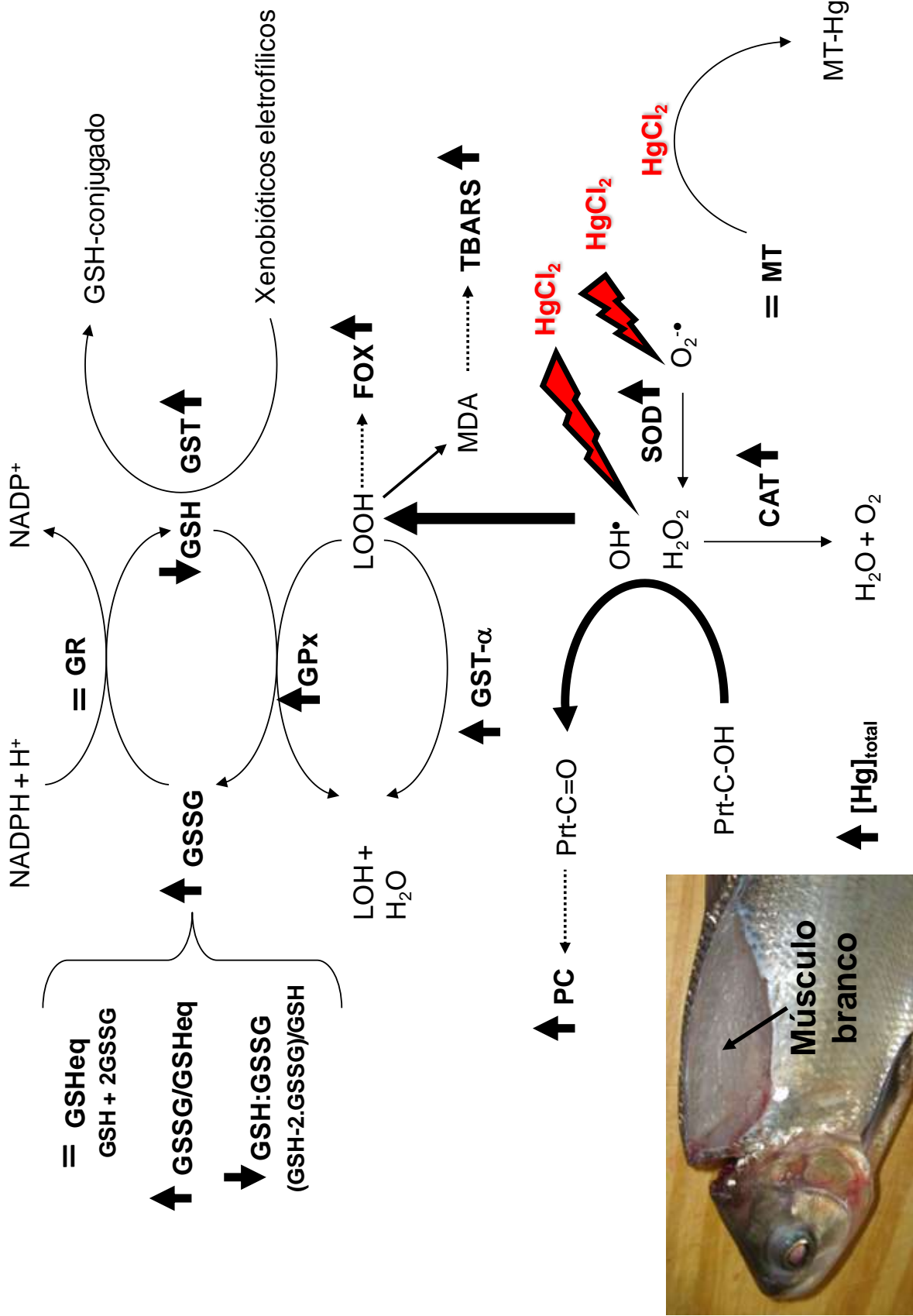


Figura 9 - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no músculo branco de matrinxã após 96 horas de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ .

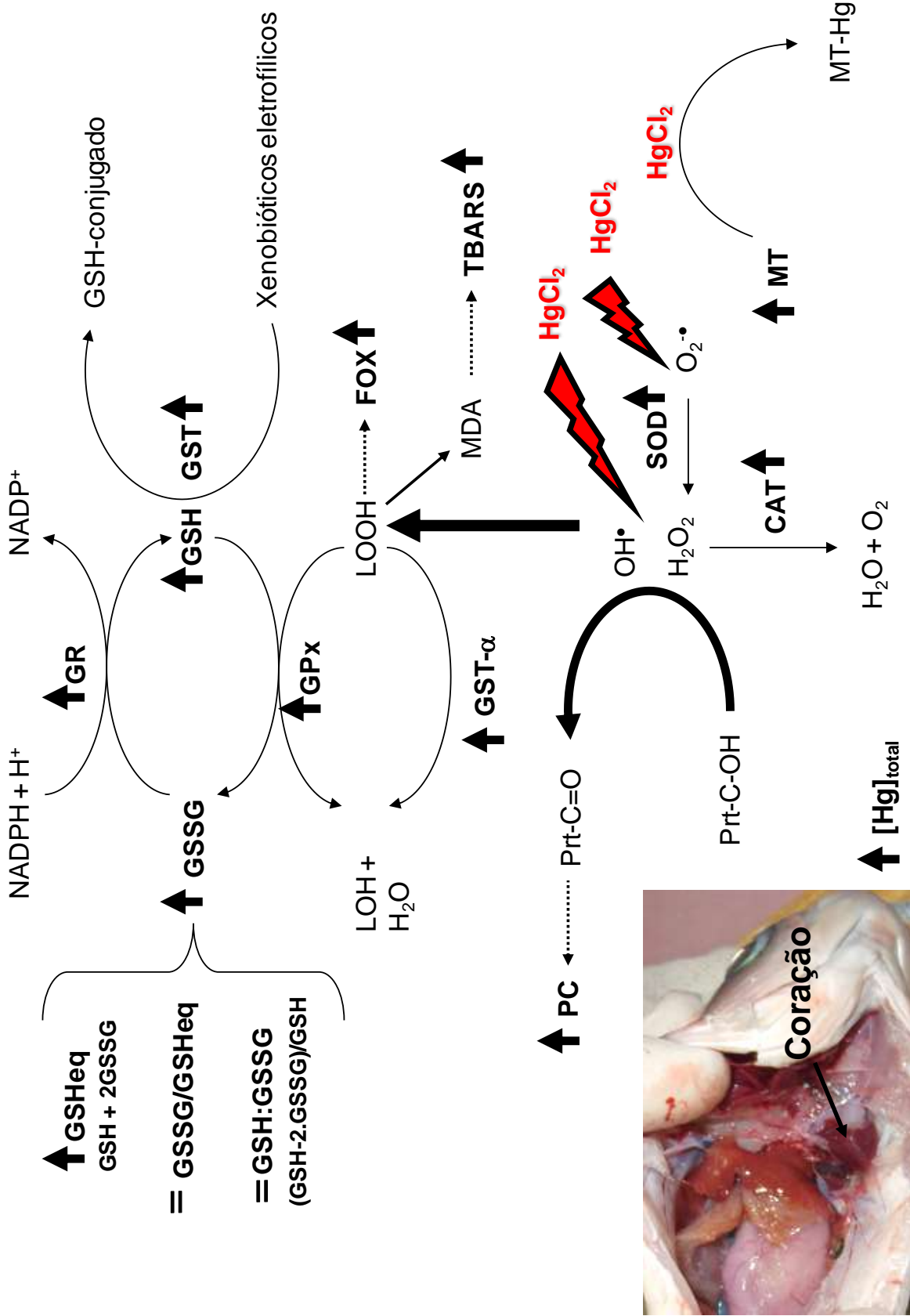
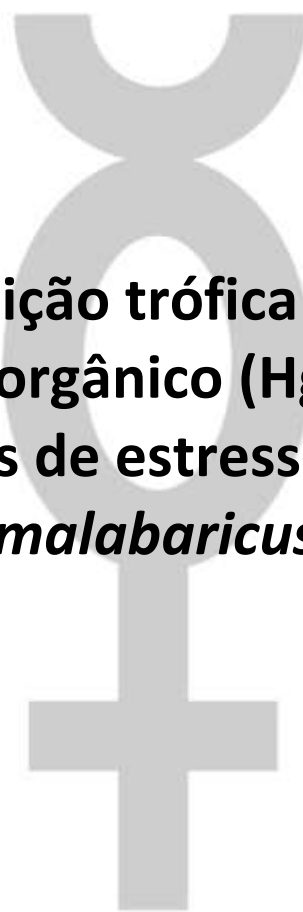


Figura 10 - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no coração de matrinxã após 96 horas de exposição ao HgCl<sub>2</sub>.

## CAPÍTULO V

**Efeitos da exposição trófica e sub-crônica ao mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre a biomarcadores de estresse oxidativo em traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**



## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao mercúrio (Hg), por via trófica, sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração (E-C) do miocárdio isolado de traíra, *Hoplias malabaricus*. Exemplos adultos de ambos os sexos, foram divididos em 2 grupos. Um dos grupos foi utilizado como controle (Ct, n = 24) e o outro foi exposto ao Hg via alimento (Hg, n = 24). A exposição sub-crônica das traíras ao Hg foi realizada durante um período de 30 dias, via dieta consistindo de matrinxãs vivos expostos por 96 horas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> (10 doses de 4 matrinxãs/traíra a cada 96 horas, correspondendo a 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup>). Os animais controle foram alimentados na mesma proporção com alevinos de matrinxãs não expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Avaliou-se os níveis de peroxidação lipídica e protéica, as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona S-transferase (GST) e glutaciona redutase (GR), bem como os níveis de glutaciona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e o conteúdo de metalotioneína (MT). Também foram avaliados os parâmetros biométricos, o índice hepático-somático (IHS) e o fator de condição (FC). As traíras expostas trofocamente ao Hg exibiram IHS significativamente superior em relação ao valor obtido para o grupo Ct enquanto que o FC sofreu um decréscimo significativo. A exposição ao Hg elevou significativamente os níveis de peroxidação lipídica e protéica em fígado, brânquias e coração das traíras, indicando o estabelecimento de estresse oxidativo que compromete as funções celulares. No fígado, no coração e no músculo branco, as atividades de todas as enzimas antioxidantes aumentaram de maneira significativa após a exposição ao Hg. Esta resposta adaptativa ocorreu na tentativa de neutralizar a sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzida pelo metal, embora não tenham sido suficientes em conter os danos oxidativos no fígado e coração mas somente no músculo branco. Nas brânquias das traíras expostas trofocamente ao Hg, houve aumentos nas atividades da SOD e GST, porém, diferentemente do observado para os demais tecidos, houve inibição das atividades da GPx e GR e nenhuma alteração na atividade da CAT. O Hg ainda promoveu elevações no conteúdo de MT no fígado, nas brânquias e no coração mas a indução da MT não foi observada no músculo branco. Aumentos nos níveis de GSH e GSSG e diminuições na razão GSH:GSSG foram observadas no fígado e nas brânquias das traíras após 30 dias de exposição ao Hg por via trófica, caracterizando estresse oxidativo intenso com perda da homeostase redox celular. Nas brânquias, um acúmulo mais acentuado de GSSG ocorreu, em comparação ao fígado, devido a inibição da atividade da GR. Por outro lado, apesar da exposição trófica ao Hg ter induzido estresse oxidativo no tecido cardíaco, a intensidade desse estresse foi moderado. Uma vez que, houve aumentos no conteúdo de GSH e na razão GSH:GSSG, mantendo a homeostase redox dos miócitos. Por outro lado, a exposição trófica ao Hg não induziu estresse oxidativo no músculo branco das traíras. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de oxidação lipídica e protéica e nem no conteúdo de GSH e GSSG. Assim, as defesas antioxidantes foram suficientes em conter as ERO geradas pela exposição trófica ao Hg e lesões oxidativas não se estabeleceram neste tecido que se mostrou mais resistente. Dessa forma, os resultados permitem concluir que o mercúrio, mesmo na sua forma inorgânica, em uma exposição trófica e sub-crônica de 30 dias e numa dose sub-letal é um potente indutor de estresse oxidativo em fígado, brânquias e coração de traíra. Foram observadas respostas tecido-específicas relacionadas às defesas antioxidantes e aos danos oxidativos sendo que o músculo branco foi o tecido mais resistente, não apresentando sinais de perdas na homeostase redox e oxidação lipídica e protéica. Assim, mesmo exposições sub-crônicas a baixas concentrações de Hg, por via trófica, podem ser potencialmente prejudiciais à saúde, sobrevivência e a qualidade dos peixes carnívoros, fontes potenciais de recurso alimentar.

## 1 INTRODUÇÃO

Conforme ressaltado no capítulo anterior, os peixes estão sujeitos aos danos mediados pelas ERO assim como qualquer outro organismo que respira oxigênio (FRAGA et al., 1996). Os peixes estão freqüentemente expostos ao impacto das ERO porque, diferentemente dos vertebrados terrestres, os animais aquáticos são expostos diariamente a mudanças sazonais de temperatura e oxigênio ou a mudanças nas condições ambientais no seu habitat natural, tais como poluição, disponibilidade de oxigênio, pH, incidência da radiação solar, entre outros (CHOW, 1991; WINSTON & DI GIULIO, 1991; HENRIQUE et al., 1998). Esta situação é facilmente exemplificada pelos peixes de água doce, que vivem em ambientes instáveis como as águas tropicais (KRAMER, 1987; GRAHAM, 1990).

Como os outros vertebrados, os peixes possuem sistemas de defesas antioxidantes que utilizam mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para combater os impactos das ERO (FRAGA et al., 1996). Os peixes, assim como outros organismos aquáticos, exibem uma variedade de alterações nesses sistemas de defesa antioxidante, após a exposição a poluentes (REGOLI et al., 2002). Vários estudos em organismos aquáticos vêm demonstrando a importância destes mecanismos de defesa antioxidantes na proteção celular contra o estresse oxidativo induzido por xenobióticos (MONTEIRO et al., 2006; 2009; MONSERRAT et al. 2007). Essas alterações podem ser usadas como biomarcadores de estresse oxidativo de diferentes poluentes nos organismos aquáticos (VALAVANIDIS et al., 2005). Além disso, o desenvolvimento de várias patologias em peixes e camarões de importância econômica está associado à manipulação ambiental e à poluição do meio aquático (LE MOULLAC & HAFFNER, 2000).

Nos ecossistemas aquáticos, os peixes representam um dos maiores níveis tróficos e os carnívoros apresentam maiores concentrações de Hg. De acordo com Régine et al. (2006), os peixes exercem um papel chave na distribuição do Hg entre os diferentes compartimentos bióticos, pois representam uma ampla variedade de níveis tróficos, desde espécies estritamente herbívoras até carnívoras de terceira ou quarta ordem e piscívoros, além de ocuparem praticamente todos os nichos ecológicos com espécies bentônicas, bento-pelágicas e pelágicas. Dessa forma, o Hg pode afetar a saúde do homem pelo consumo de pescado contaminado nas cadeias alimentares, mesmo a grandes distâncias. Devido ao fato da traíra ocupar níveis tróficos superiores da cadeia alimentar e de que vários trabalhos com esta espécie mostram uma intensa bioacumulação de metais pesados, esta tem se mostrado um excelente bioindicador de poluição ambiental nesses ecossistemas. Adicionalmente, os organismos predadores são os mais expostos aos efeitos tóxicos deste metal.

O estresse oxidativo é bastante observado em intoxicações pelo mercúrio (HUANG et al., 1996; HOFFMAN & HEINZ, 1998; EL-DEMERDASH, 2001). Segundo relatos, o Hg estimula

a lipoperoxidação por aumentar a formação de hidroperóxido na mitocôndria (LUND et al., 1991). Esta geração de ERO também pode ser responsável por danos ao DNA e pela depleção dos grupos -SH de moléculas endógenas (LUND et al., 1991; 1993). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a geração de ERO pelo Hg pode comprometer a função renal, diminuindo a taxa de filtração glomerular (YOSHIOKA & ICHIKAWA, 1989). Além da geração de ERO, tem sido demonstrado que o Hg inibe a atividade de diversas enzimas antioxidantes como a CAT, SOD e GPx (BENOV et al., 1990), que protegem contra danos celulares e injúria tecidual (HUSSAIN et al., 1999). Os prejuízos causados no organismo devido à ação das ERO podem se acumular ao longo do tempo e implicar não somente em processos biológicos, como o envelhecimento, mas também em processos patológicos, como inflamação, carcinogênese e até mesmo resultar em desenvolvimento embrionário anormal (WELLS et al., 2005). As EROs podem induzir morte celular por necrose ou apoptose, dependendo das concentrações. Níveis baixos de EROs podem induzir apoptose, enquanto que o acúmulo de altos níveis dessas moléculas gera necrose ou pode levar as células comprometidas por apoptose a uma morte celular semelhante à necrose (MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998).

Os biomarcadores do estresse oxidativo podem ser estudados para auxiliar na avaliação das conseqüências da exposição de organismos aquáticos ao Hg. O conhecimento dos mecanismos de toxicidade dos poluentes, em particular em nível celular, pode ser determinante na estimativa dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica como indivíduo e até mesmo de uma população ou comunidade (BAINY et al., 1996). Segundo Walker et al. (1996), os biomarcadores podem ser usados para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e sugerir relações de causa e efeito entre a exposição aos contaminantes e os efeitos observados no organismo, e documentar os efeitos integrados do estresse químico nos peixes permitindo uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos. Estima-se que a ativação e a inibição de certas enzimas são os principais mediadores da ação destes poluentes, cujos mecanismos tóxicos estão igualmente implicados em transdução de sinais (CRUMPTON et al., 2000), na organização do citoesqueleto (PROZIALKC et al., 2002), entre outros. Cabe ressaltar que o nível de metais dissolvidos na água é extremamente variável, sendo que a avaliação deste parâmetro isolado fornece pouca informação sobre a contaminação do ambiente.

Poucos estudos sobre a atividade de enzimas e as respostas celulares associadas têm sido realizados em peixes de água doce brasileiros, principalmente em relação ao efeito da exposição trófica a contaminantes. Dessa forma, a análise de biomarcadores de estresse oxidativo pode fornecer importantes informações sobre os mecanismos de toxicidade do Hg durante a contaminação trófica que é a mais comum de acontecer nos ecossistemas brasileiros dada à elevada capacidade de biomagnificação do metal.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Exemplares adultos e de ambos os sexos de traíra, *Hoplias malabaricus*, foram obtidos da piscicultura Parque do Lago, Dourado, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 500 L com recirculação de água de clorada (pH 7,0-7,5; DO<sub>2</sub> 6,5-7,3 mg.L<sup>-1</sup>; dureza 48-56 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade 40-43 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e condutividade 120-128 µS.cm<sup>-1</sup>), aeração constante (P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 45 dias para aclimatação às condições laboratoriais. Durante esse período, as traíras foram alimentadas com juvenis de matrinxãs (4-6 cm), *Brycon amazonicus*, uma vez por semana, na proporção de 2% da biomassa, totalizando o uso de aproximadamente 250 matrinxãs.

### 2.2 Desenho Experimental

Antes do início do experimento, as traíras foram pesadas ( $W_T = 246,2 \pm 19,2$  g;  $L = 27,3 \pm 1,0$  cm) e aleatoriamente divididas em quatro grupos de doze animais cada um. Dois grupos foram utilizados como controle (Ct, n = 24) e os outros dois foram expostos ao Hg via alimento (Hg, n = 24). A exposição sub-crônica das traíras ao Hg foi realizada durante um período de 30 dias, via dieta consistindo de matrinxãs vivos expostos por 96 h a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> (10 doses de 4 matrinxãs/traíra a cada 96 h, correspondendo a 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup>). Os peixes do grupo Ct foram alimentados com a mesma espécie e sob tais condições, porém com exemplares não expostos ao HgCl<sub>2</sub>, totalizando o uso de cerca de 1920 exemplares vivos de pequenos matrinxãs para ambos os grupos experimentais ao longo dos 30 dias. Os detalhes da exposição foram descritos no Capítulo III.

### 2.3 Coleta de Amostras, Procedimentos e Parâmetros Bioquímicos e Tratamento Estatístico dos dados

Todos os procedimentos e parâmetros analisados bem como a análise dos dados encontram-se detalhadamente descritos no capítulo anterior (Capítulo IV). Vale ressaltar que para todas as análises bioquímicas utilizou-se um n = 10 animais, com exceção das análises feitas no coração, onde um n = 6 foi utilizado. A quantificação da atividade das enzimas antioxidantes e dos conteúdos de GSH/GSSG, MT e PC requerem diferentes homogenados. Como a massa do coração das traíras tinha aproximadamente 135 mg, quatro grupos de seis corações foram separados para a realização dessas análises.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Alterações Comportamentais e Biometria

Após 30 dias de exposição trófica ao Hg as traíras sobreviveram porém, apresentaram um comportamento agitado e intensa agressividade, pulando da caixa experimental durante a alimentação para comer as presas oferecidas, que eram imediatamente devoradas, não sobrando nenhuma presa nos tanques experimentais.

No grupo Hg, a massa dos fígados e o índice hepático-somático (IHS) foram significativamente maiores do que os valores exibidos pelo grupo Ct (114% e 66%, respectivamente). Concomitantemente, houve um decréscimo significativo, na ordem de 10%, no fator de condição (FC) calculado para as traíras expostas troficamente ao Hg. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na massa corporal e no comprimento total das traíras de ambos os grupos experimentais. Esses resultados estão apresentados na Tabela 1.

Adicionalmente, o fígado das traíras expostas ao Hg, via alimento, apresentou sinais macroscópicos de lesão, como áreas hemorrágicas e coloração mais escura em relação às características exibidas pelos fígados dos peixes do grupo Ct.

**Tabela 1:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos parâmetros biométricos, índice hepático-somático (IHS) e fator de condição (FC) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 24) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 24) durante 30 dias ( $\sim$  2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Parâmetros biométricos	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
Comprimento total (cm)	26,17 $\pm$ 1,19	28,35 $\pm$ 0,82
Massa corporal (g)	242,42 $\pm$ 26,16	249,97 $\pm$ 12,23
Massa hepática (g)	3,48 $\pm$ 0,36	7,46 $\pm$ 0,51 *
IHS (%)	1,62 $\pm$ 0,12	2,69 $\pm$ 0,13 *
FC (g/cm <sup>3</sup> )	1,23 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,02 *

### 3.2 Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes

No fígado das traíras alimentadas por 30 dias com matrinxãs expostos por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ , houve aumentos significativos nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GST e GR (211%, 285%, 30%, 33% e 31% respectivamente). Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes no fígado das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias ( $\sim 2\% \text{ biomassa.dia}^{-1}$ ). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

Enzimas antioxidantes no fígado	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
SOD ( $\text{U.mg proteína}^{-1}$ )	$5,92 \pm 0,28$	$18,42 \pm 1,73$ *
CAT ( $\text{U.B.mg proteína}^{-1}$ )	$4,28 \pm 0,51$	$16,52 \pm 0,86$ *
GPx ( $\text{mU.mg proteína}^{-1}$ )	$483,49 \pm 45,62$	$626,12 \pm 48,19$ *
GST ( $\text{mU.mg proteína}^{-1}$ )	$526,33 \pm 25,71$	$701,15 \pm 38,58$ *
GR ( $\text{mU.mg proteína}^{-1}$ )	$4,54 \pm 0,34$	$5,96 \pm 0,53$ *

As atividades da SOD e GST também aumentaram significativamente nas brânquias (38% e 42%, respectivamente) das traíras do grupo Hg. Entretanto, em relação ao grupo Ct, houve diminuições significativas nas atividades das enzimas GPx (18%) e GR (13%), sem nenhuma alteração na atividade da CAT após a exposição trófica ao Hg (Tabela 3).

No músculo branco das traíras, a alimentação com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  induziu aumentos significativos nas atividades da SOD, CAT, GPx, GST e GR (119%, 51%, 180%, 28% e 640%, respectivamente). Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 3:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes nas brânquias das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

Enzimas antioxidantes nas brânquias	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
SOD (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	1,44 $\pm$ 0,13	2,00 $\pm$ 0,11 *
CAT (U.B.mg proteína <sup>-1</sup> )	1,34 $\pm$ 0,07	1,30 $\pm$ 0,09
GPx (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	35,61 $\pm$ 1,90	29,11 $\pm$ 1,72 *
GST (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	253,04 $\pm$ 8,96	360,95 $\pm$ 14,28 *
GR (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	14,78 $\pm$ 0,36	12,82 $\pm$ 0,64 *

**Tabela 4:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes no músculo branco das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

Enzimas antioxidantes no músculo branco	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
SOD (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	0,96 $\pm$ 0,15	2,10 $\pm$ 0,16 *
CAT (U.B.mg proteína <sup>-1</sup> )	1,39 $\pm$ 0,13	2,12 $\pm$ 0,13 *
GPx (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	2,65 $\pm$ 0,62	7,40 $\pm$ 1,48 *
GST (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	38,96 $\pm$ 1,47	49,95 $\pm$ 2,03 *
GR (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	1,60 $\pm$ 0,21	11,90 $\pm$ 2,08 *

No coração, a exposição ao Hg induziu aumentos significativos nas atividades de todas as enzimas antioxidantes avaliadas. As elevações das atividades da SOD, CAT, GPx, GST e GR foram da ordem de 47%, 48%, 35%, 71% e 30%, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5:** Valores médios  $\pm$  E.P.M das atividades das enzimas antioxidantes no coração das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 6) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 6) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Enzimas antioxidantes no coração	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
SOD (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	5,62 $\pm$ 0,61	8,31 $\pm$ 0,93 *
CAT (U.B.mg proteína <sup>-1</sup> )	3,84 $\pm$ 0,18	5,72 $\pm$ 0,44 *
GPx (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	26,16 $\pm$ 1,94	35,47 $\pm$ 3,01 *
GST (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	82,36 $\pm$ 9,06	141,35 $\pm$ 11,00 *
GR (mU.mg proteína <sup>-1</sup> )	5,39 $\pm$ 0,36	7,05 $\pm$ 0,50 *

### 3.3 Análise de Antioxidantes Não-Enzimáticos

Em relação ao sistema da glutathiona, as traíras do grupo Hg apresentaram aumentos significativos nos níveis hepáticos de GSH<sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG) e GSH (cerca de 31% e 28%, respectivamente). Em comparação com o controle, também houve um aumento significativo no conteúdo de GSSG hepático (44%) enquanto que a relação GSH:GSSH diminuiu significativamente (21%). Esses resultados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no fígado das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Sistema da glutathiona no fígado	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
GSH <sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG)	2,10 $\pm$ 0,19	2,74 $\pm$ 0,16 *
GSH ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	1,74 $\pm$ 0,16	2,23 $\pm$ 0,14 *
GSSG ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,17 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02 *
GSH:GSSG [(GSH - 2.GSSG)/GSSG]	8,33 $\pm$ 0,55	6,52 $\pm$ 0,58 *

Nas brânquias, de forma semelhante ao observado no fígado, as traíras do grupo Hg exibiram aumentos significativos nos níveis de  $GSH_{eq}$ , GSH e GSSG (128%, 111% e 152%, respectivamente) com concomitante diminuição na razão GSH:GSSG (26%), quando comparados com os peixes do grupo Ct (Tabela 7).

**Tabela 7:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada nas brânquias das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa.dia $^{-1}$ ). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct ( $p < 0,05$ ).

Sistema da glutathiona nas brânquias	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
$GSH_{eq}$ (GSH + 2.GSSG)	$0,25 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$ *
GSH ( $\mu\text{mol. g tecido}^{-1}$ )	$0,16 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,03$ *
GSSG ( $\mu\text{mol. g tecido}^{-1}$ )	$0,045 \pm 0,004$	$0,114 \pm 0,005$ *
GSH:GSSG [(GSH - 2.GSSG)/GSSG]	$2,03 \pm 0,12$	$1,51 \pm 0,11$ *

No músculo branco, o sistema da glutathiona apresentou um comportamento diferente daquele exibido pelo fígado e pelas brânquias frente a exposição trófica ao Hg. Não houve alterações significativas nos conteúdos de GSH e GSSG e, portanto, alterações na razão GSH:GSSG e o conteúdo de  $GSH_{eq}$  não foram observadas. Mesmo após 30 dias de exposição trófica ao  $HgCl_2$ , os níveis de GSH e GSSG do músculo branco permaneceram semelhantes àqueles apresentados pelas traíras do grupo controle. Os dados estão apresentados na Tabela 8.

No coração das traíras expostas troficamente ao Hg, houve aumentos significativos nos níveis de  $GSH_{eq}$  (GSH + 2.GSSG) e GSH (40% e 43%, respectivamente). Entretanto, não houve alteração no conteúdo de GSSG entre os grupos experimentais, de maneira que a razão GSH:GSSG apresentou um aumento significativo de aproximadamente 50%. Esses resultados estão apresentados na Tabela 9.

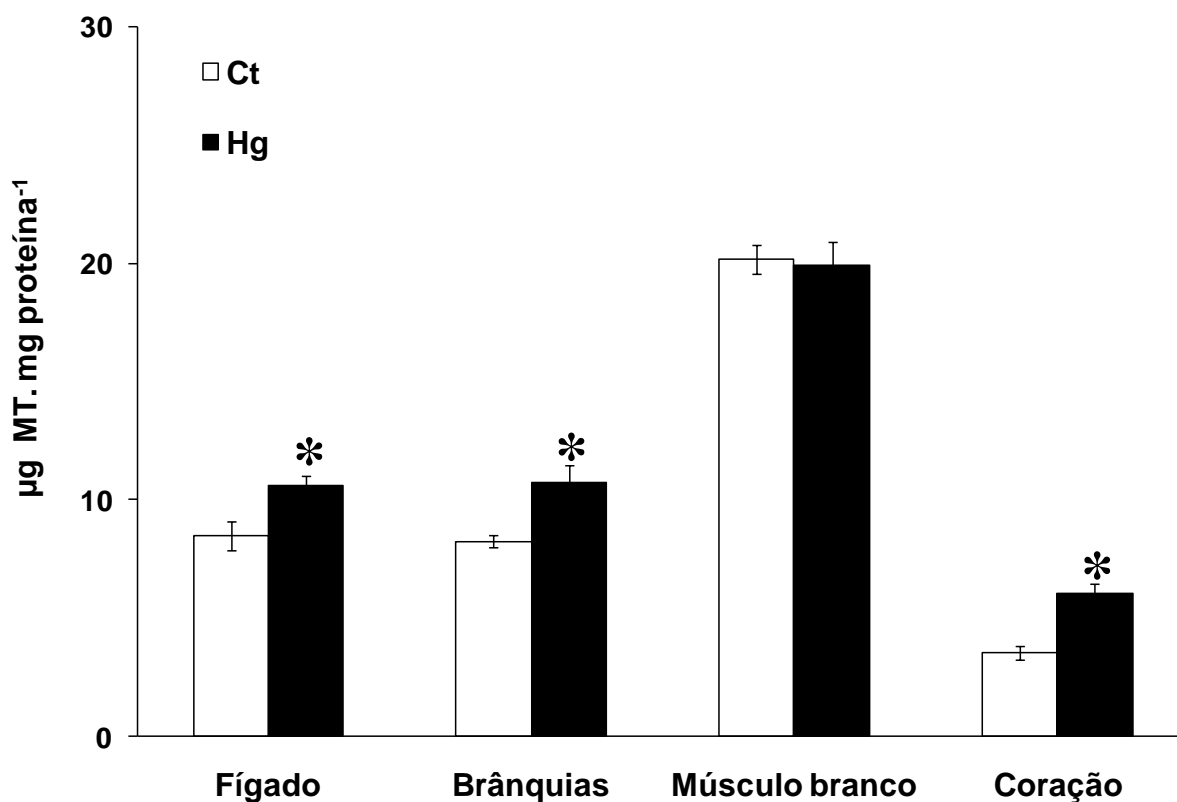
**Tabela 8:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no músculo branco das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Sistema da glutathiona no músculo branco	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
GSH <sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG)	0,32 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,02
GSH ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,22 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,02
GSSG ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,049 $\pm$ 0,003	0,054 $\pm$ 0,002
GSH:GSSG [(GSH - 2.GSSG)/GSSG]	2,27 $\pm$ 0,25	2,41 $\pm$ 0,28

**Tabela 9:** Valores médios  $\pm$  E.P.M dos níveis de glutathiona total, reduzida e oxidada no coração das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 6) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 6) durante 30 dias (~ 2% biomassa . dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Sistema da glutathiona no coração	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
GSH <sub>eq</sub> (GSH + 2.GSSG)	1,88 $\pm$ 0,13	2,64 $\pm$ 0,19 *
GSH ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	1,55 $\pm$ 0,14	2,22 $\pm$ 0,20 *
GSSG ( $\mu$ mol. g tecido <sup>-1</sup> )	0,164 $\pm$ 0,010	0,170 $\pm$ 0,007
GSH:GSSG [(GSH - 2.GSSG)/GSSG]	8,24 $\pm$ 1,15	12,36 $\pm$ 1,10 *

Em relação aos níveis de metalotioneína, avaliados pela quantificação de grupamentos sulfidríla (-SH), foram observados aumentos significativos no fígado, nas brânquias e no coração (25%, 30% e 70%, respectivamente) das traíras do grupo Hg. No músculo branco, não houve alteração significativa nos níveis de MT após a exposição trófica, ao Hg. Esses resultados estão apresentados na Figura 1.



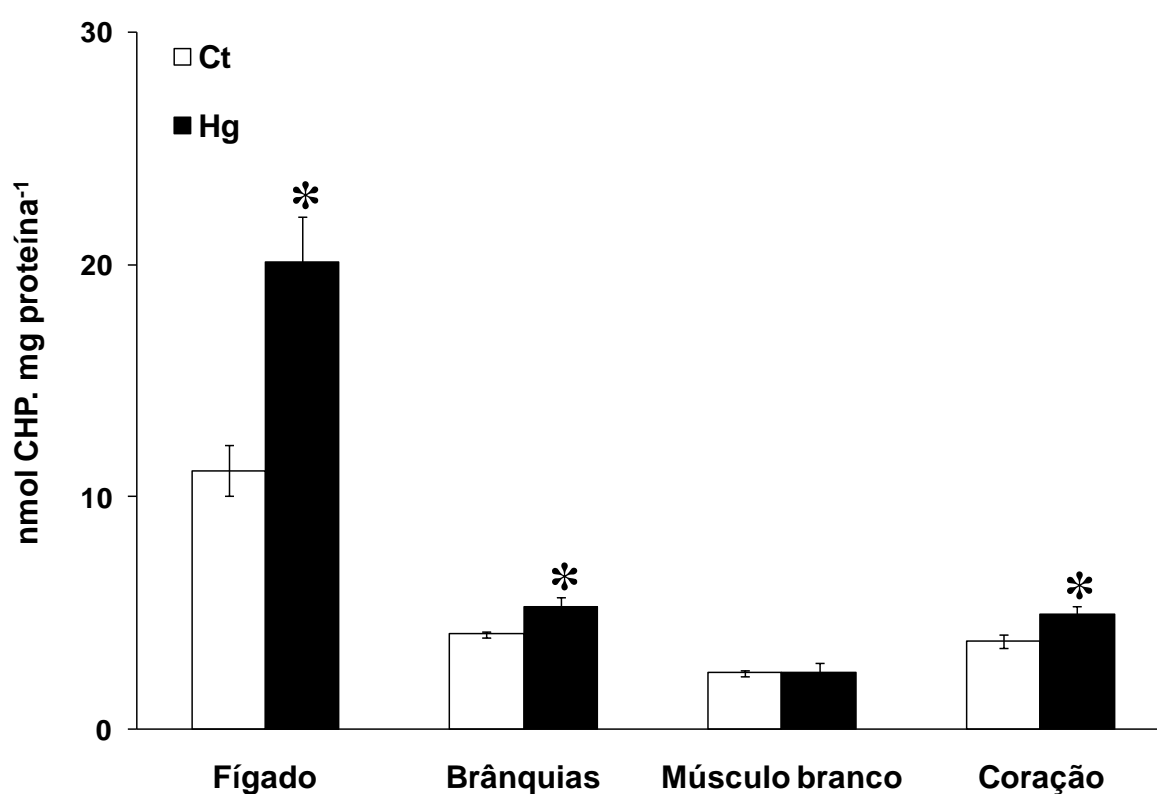
**Figura 1:** Níveis de metalotioneína (MT – µg.proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).



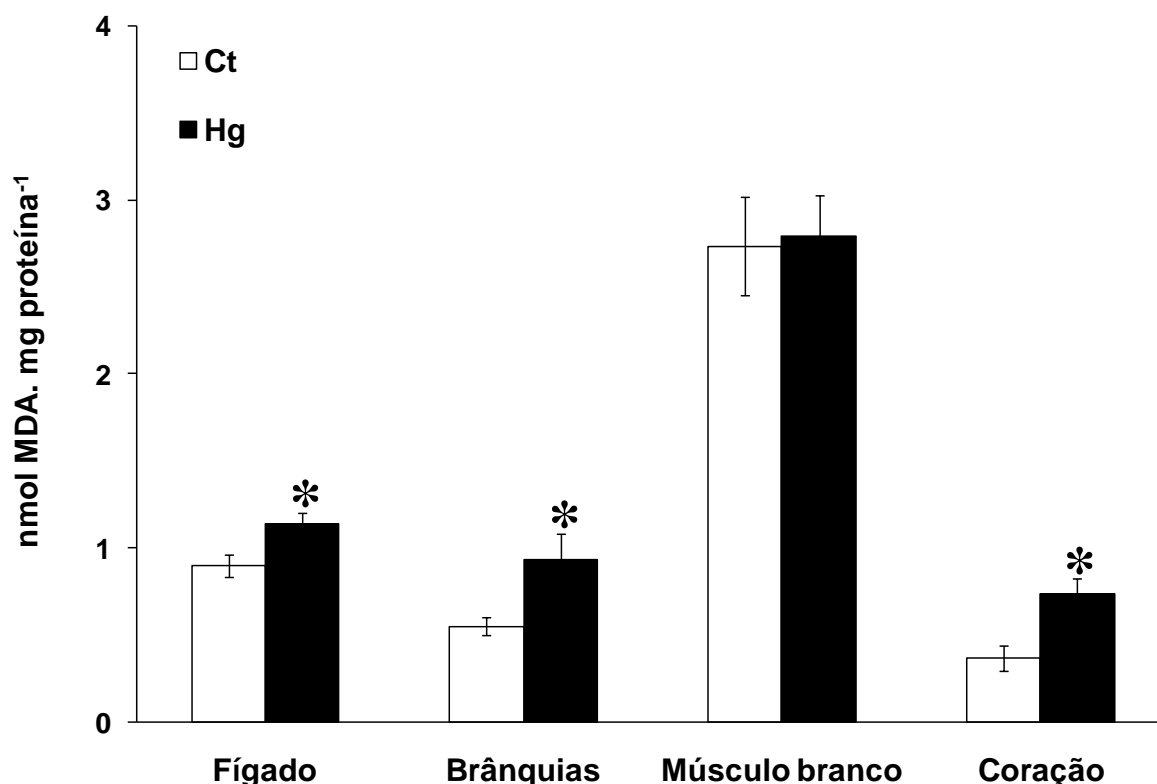
### 3.4 Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica

Os níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP) e de malondialdeído (MDA) nos tecidos das traíras dos grupos experimentais Ct e Hg se encontram nas figuras 2 e 3, respectivamente.

No fígado, nas brânquias e no coração das traíras expostas troficamente ao Hg houve aumentos significativos no conteúdo de CHP (80%, 28%, 31%, respectivamente) e de MDA (27%, 70%, 98%, respectivamente) quando comparados aos peixes do grupo Ct. Entretanto, no músculo branco, nenhuma alteração foi observada nos níveis de CHP e MDA após a exposição ao metal.



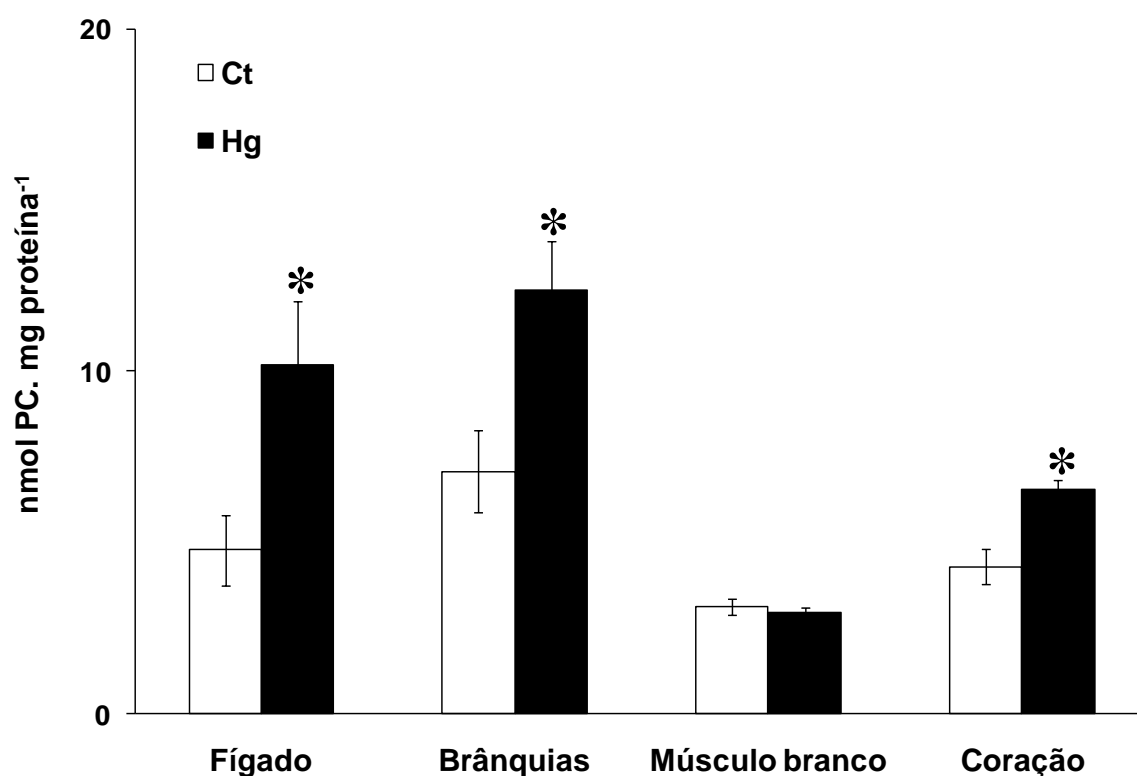
**Figura 2:** Níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP - nmol.proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).



**Figura 3:** Níveis de equivalentes de malondialdeído (MDA - nmol.proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.5 Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas

Danos oxidativos em proteínas também foram induzidos pela exposição ao Hg, por via trófica, no fígado, nas brânquias e no coração das traíras, de maneira semelhante aos danos oxidativos em lipídios detectados nestes mesmos tecidos. Os aumentos significativos no conteúdo de proteína carbonilada (PC) no fígado, nas brânquias e no coração foram da ordem de 113%, 40% e 47%, respectivamente. No músculo branco, nenhuma alteração foi observada no conteúdo de PC após 30 dias de alimentação com matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>, permanecendo os valores de PC semelhantes àqueles apresentados pelos controles. Tais resultados podem ser observados na Figura 4.



**Figura 4:** Níveis de proteína carbonilada (PC - nmol.proteína<sup>-1</sup>) no fígado (n = 10), nas brânquias (n = 10), no músculo branco (n = 10) e no coração (n = 6) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.6 Análise dos Níveis de Proteína Total

Conforme observado na Tabela 10, não foram observadas alterações significativas entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> na concentração de proteína total para todos os tecidos analisados.

**Tabela 10:** Valores médios ± E.P.M. dos níveis proteína total nos tecidos das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 10) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 10) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). \* indica diferença significativa em relação ao grupo Ct (p < 0,05).

Níveis de proteína total (mg. g tecido <sup>-1</sup> ) nos tecidos	Grupos experimentais	
	Ct	Hg
Fígado	74,40 ± 3,31	67,83 ± 2,99
Brânquias	23,14 ± 1,03	22,96 ± 0,77
Músculo branco	37,96 ± 2,70	43,46 ± 2,20
Coração	65,78 ± 4,30	64,90 ± 3,45

#### 4. DISCUSSÃO

Os efeitos sub-letais de intoxicação mais comumente observados em peixes são alterações comportamentais. As concentrações sub-letais de mercúrio podem afetar o crescimento, o comportamento e o sucesso reprodutivo dos peixes (ZHOU & WEIS, 1998; BERNTSSEN et al., 2003; WEINER et al., 2003, SANDHEINRICH & MILLER, 2006). No presente estudo, as traíras alimentadas com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  mostraram intensa agressividade, pulando das caixas experimentais para comer as presas oferecidas, que eram imediatamente devoradas. Diferentemente, as traíras alimentadas com matrinxãs controles não apresentaram essas alterações comportamentais. A traíra é um predador voraz acostumado a esperar pela presa, comportamento este não evidenciado nos peixes alimentados com matrinxãs contaminados com mercúrio. Diferentemente, as traíras do grupo Ct apresentaram o padrão de alimentação característico da espécie, a predação de emboscada ou de tocaia do tipo “senta e espera”. Dessa forma, nem todas as presas oferecidas (matrinxãs controles) eram imediatamente devoradas e algumas permaneciam no tanque ao longo das 96 h de intervalo entre as alimentações, sendo utilizadas como alimento ao longo desse período.

Vários trabalhos demonstraram que tanto o mercúrio orgânico quanto as formas inorgânicas atuam no sistema nervoso de teleósteos causando alterações bioquímicas e patológicas tais como a inibição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, monoamino oxidase (MAO) e acetilcolinesterase (AChE), proliferação de astrócitos, necrose e vacuolização (RAM & SATHYANESAN, 1985; GILL et al., 1990). Berntssen et al., 2003 comprovaram que o  $\text{HgCl}_2$  quando administrado na dieta na concentração de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , durante 4 meses, inibe a atividade da MAO no cérebro de salmão do atlântico, *Salmo salar*.

Os níveis de neurotransmissores estão correlacionados com o estado comportamental de peixes (ALANARA et al. 1998; ELOFSSON et al., 2000; HOGLUND et al., 2001). Assim, a redução na atividade da MAO e da AChE provocada pelo mercúrio, pode levar a alterações nos níveis dos neurotransmissores acetilcolina e catecolaminas, o que poderia explicar a agressividade e a agitação das traíras que foram alimentadas com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ . Segundo Tanan et al. (2006), o Hg é altamente neurotóxico e capaz de prejudicar as funções visuais da traíra, *H. malabaricus*. Nesse sentido, conforme será discutido no capítulo IX há evidências de que a exposição trófica ao Hg levou a inibição da AChE por induzir bradicardia. Corroborando nossos resultados, uma hiperatividade foi observada em cardumes de “largemouth bass”, *Micropterus salmoides*, após a exposição a  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  de mercúrio (MORGAN, 1979) e em cardumes de “golden shiner”, *Notemigonus crysoleucas*, após receberem por 90 dias uma dieta contendo  $0,95 \mu\text{g}$  de Hg por grama de ração (WEBBER & HAINES, 2003).

As traíras expostas troficamente ao Hg apresentaram elevações no IHS e diminuição no FC. Esses resultados podem refletir uma hipertrofia e/ou hiperplasia dos hepatócitos ou até mesmo a própria bioacumulação do metal no fígado, contribuindo para o aumento da massa hepática. Segundo Porter & Janz (2003), Figueiredo-Fernandes et al. (2006) e Fernandes et al. (2007), um aumento na massa hepática pode ocorrer frente à exposição a xenobióticos na tentativa de maximizar os processos de desintoxicação. Assim, uma hiperplasia e/ou hipertrofia podem aumentar a capacidade de biotransformação de xenobióticos. No presente estudo, as traíras do grupo Hg apresentaram aumentos na ordem de 33% da GST hepática, enzima responsável pela desintoxicação de xenobióticos. Simultaneamente, o fígado desses animais bioacumulou mercúrio na ordem de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ , o que pode ter contribuído para o aumento da massa hepática (para detalhes ver capítulo III).

O IHS é um biomarcador fisiológico não específico que reflete o estado metabólico dos peixes e suas reservas energéticas, além do estado de higidez dos organismos (HUUSKONEN & LINDSTROM SEPPA, 1995; VAN der OOST et al., 2003; TELES & SANTOS, 2006). Alterações no IHS geralmente indicam danos irreversíveis (HINTON et al., 1992). Vários estudos demonstraram que peixes coletados em áreas contaminadas frequentemente apresentam aumento no IHS e decréscimo no FC (ADAMS & RYON, 1994; KARELS et al., 1998; VAN der OOST et al., 1996). Em “mummichog”, *Fundulus heteroclitus*, a exposição a  $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  induziu aumentos no conteúdo lipídico do fígado (WEIS et al., 1986). Os autores explicam que o aumento dos lipídios hepáticos ocorre na tentativa de seqüestrar formas químicas solúveis em lipídios como o metilmercúrio, uma vez que os peixes são capazes de metilar o mercúrio inorgânico por meio de bactérias intestinais. Assim, o aumento do conteúdo hepático de lipídios é um reflexo da bioacumulação do metal nesse tecido. A acumulação de lipídios tem um efeito de diluição sobre o mercúrio associado com os tecidos de peixes (BALSHAW et al., 2008). No presente estudo, não se pode excluir a possibilidade de que o Hg tenha induzido um aumento do conteúdo de lipídio hepático na tentativa de seqüestrar o metal o que, por sua vez, contribuiria para o aumento da massa hepática e, conseqüentemente, do IHS.

O FC é um índice bastante utilizado no estudo da biologia de peixes, pois fornece importantes informações sobre o estado fisiológico desses animais, a partir do pressuposto de que indivíduos com maior massa em um dado comprimento estão em melhor condição (LIMA-JUNIOR & GOITEIN, 2006). A diminuição do FC observada nas traíras do grupo Hg pode indicar que o crescimento foi interrompido e que as reservas energéticas foram mobilizadas com o intuito de gerar energia metabólica para a manutenção e para os processos de desintoxicação. Drevnick et al. (2008) também observaram um menor fator de condição em peixes coletados em regiões contaminadas com Hg e que apresentavam uma alta concentração de Hg total no fígado. Esses mesmos autores mostraram uma correlação positiva entre a concentração de mercúrio no fígado e

a coloração escura do órgão, corroborando com o presente estudo, onde o fígado das traíras troficamente expostas ao  $\text{HgCl}_2$  apresentaram áreas hemorrágicas e coloração mais escura em relação às características exibidas pelos fígados dos animais controles. Levesque (2002) também encontrou menor fator de condição em exemplares de *Perca flavescens* coletados em lagos contaminados com metais pesados (Cd, Cu e Zn). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Bervoets & Blust (2003), que sugerem que o FC do ciprinídeo *Gobio gobio* é reduzido após exposição a Cd, Cu, Zn, Ni, Pb e Cr.

Adicionalmente, os resultados do presente estudo demonstraram que a exposição sub-crônica (30 dias) de traíras, por via trófica, com matrinxãs expostos por 96 h a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  em sistema estático foi capaz de induzir um quadro de estresse oxidativo em fígado, brânquias e coração. A traíra, *H. malabaricus*, é um modelo biológico interessante para estudos experimentais de exposição de contaminantes via dieta devido ao seu comportamento voraz, sua habilidade de se adaptar as condições experimentais e a sua posição na cadeia alimentar (ALVES COSTA et al., 2007). Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de garantir a manutenção do estado redox celular, isto é, promover de maneira eficiente a eliminação das ERO produzidas pelo metabolismo basal e, conseqüentemente, proteger contra as lesões oxidativas (OLIVEIRA et al., 2004). Entretanto, a exposição de traíras ao mercúrio levou a um desequilíbrio entre a produção de ERO e a atividade ineficiente dos mecanismos de defesa antioxidante e, conseqüentemente, lesões oxidativas foram estabelecidas.

O Hg presente na alimentação provocou alterações significativas nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST, GPx e GR, assim como no conteúdo de GSH e GSSG e nos níveis de peroxidação lipídica e protéica, além de alterar o conteúdo de MT. As alterações nos mecanismos bioquímicos antioxidantes vêm sendo identificadas como biomarcadores de susceptibilidade celular a danos causados pelas ERO. Uma das principais características desses biomarcadores é a indução de sua expressão e/ou atividade sob condições de estresse oxidativo, um mecanismo que pode ser uma adaptação importante ao estresse induzido por poluentes (LIVINGSTONE, 2001; ZHANG et al., 2004). Vale lembrar que assim como o observado para os matrinxãs expostos por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ , as traíras expostas troficamente ao Hg por 30 dias também não apresentaram alteração no conteúdo de proteína total em nenhum dos tecidos analisados. Tal fato sugere que as alterações nos sistemas antioxidantes se devem basicamente a indução de suas atividades e/ou expressões.

No presente estudo, o mercúrio na dieta induziu um estresse oxidativo intenso no fígado das traíras, demonstrado pelos aumentos na peroxidação lipídica e protéica e na diminuição da razão GSH/GSSG, o que reflete perda da homeostase redox celular. Mesmo com aumentos significativos das atividades de todas as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GST e GR), a produção de ERO frente a exposição ao Hg superou a capacidade de defesa

antioxidante hepática. Células sob estresse oxidativo desenvolvem várias disfunções, em razão das lesões causadas pelas ERO aos lipídios, proteínas e DNA (ERCAL et al., 2001).

Corroborando nossos resultados, traíras alimentadas durante 70 dias com lambaris (*Astyanax* sp) contaminados com 75  $\eta\text{g}$  de  $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$  por grama de massa úmida, totalizando 14 doses de aproximadamente 10% da biomassa, apresentaram severos danos nos hepatócitos como desorganização do citoplasma, dispersão do retículo endoplasmático e presença de grânulos apicais atípicos e vacúolos lipídicos (ALVES COSTA et al., 2007). Os autores sugerem que tais alterações morfológicas estão relacionadas ao estresse oxidativo induzido pelo Hg, que provocaria alterações funcionais na dinâmica do citoesqueleto e, conseqüentemente, na localização de organelas e vacúolos. Em robalo, *Dicentrarchus labrax*, a exposição por 48 horas a 251, 355 e 501  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Hg promoveu alterações morfológicas no fígado como hepatócitos ricos em vacúolos lipídicos e corpos mielóides, retículo endoplasmático dilatado, intumescimento da mitocôndria e acúmulo de heterocromatina (GIARI et al., 2008).

De acordo com Pacheco & Santos (2002), o fígado é considerado um importante órgão alvo na avaliação dos efeitos da exposição a poluentes via dieta. Além disso, alterações morfológicas relacionadas à captação de metais pesados em fígado de peixes são descritas como uma importante ferramenta em estudos ecotoxicológicos (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1996; STENTIFORD et al., 2003; RABITTO et al., 2005). As principais funções do fígado são a biotransformação de xenobióticos, a excreção de metais, a emulsificação de gorduras, a metabolização de substâncias presentes na corrente sanguínea e produção de vários compostos, como por exemplo, proteínas. Adicionalmente, os hepatócitos estão entre as células mais ricamente perfundidas do organismo, o que facilita suas inúmeras funções (LIVINGSTONE, 1998; VAN der OOST et al., 2003; GIARI et al., 2008).

Conforme discutido no capítulo anterior (capítulo IV), um dos principais mecanismos de lesão provocada pelas ERO é a peroxidação LPO, ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. É uma reação em cadeia, pois se propaga continuamente, levando a formação de lipoperóxidos e à destruição e morte celular (HOGG & KALYANARAMAN, 1998). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação das ERO sobre os lipídios das membranas celulares, gerando principalmente radicais alcoxil e peroxil, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca metabólica e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). É o evento citotóxico primário que desencadeia as injúrias mediadas por diferentes agentes que culmina com lesões na membrana que resultam em mudança na fluidez, aumento de sua permeabilidade, alterando as trocas iônicas, acarretando o influxo excessivo de cálcio, o qual ativa enzimas autolíticas causando proteólise e morte celular (LIMA et al., 2002). De acordo com a revisão de Milaeva (2006), um dos principais mecanismos de toxicidade dos compostos mercuriais é a indução da LPO.

A exposição a  $0,045 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 5 e 10 dias induziu aumento da LPO em glândula digestiva do mexilhão *Perna viridis*, indicando que o animal está sob estresse oxidativo (VERLECAR et al., 2008). Tanto o metilmercúrio como o cloreto de mercúrio na concentração de 4 mg por kg de dieta aumentam a LPO (aumento de até 720 % dos níveis controles) em fígado do esturjão russo, *Acipenser gueldenstaedti*, após 30 dias de alimentação (MILAEVA, 2006). Weis et al. (1986) avaliaram a distribuição do mercúrio nas diferentes frações sub-celulares dos hepatócitos de *F. heteroclitus* expostos a  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ . A distribuição do Hg ficou em 6% no núcleo, 60,8% nas frações citoplasmáticas não-lipídicas, 28% nos lipídios e 5,3% nos lisossomas. Além disso, estes autores verificaram que o  $\text{HgCl}_2$  pode interagir com as membranas lipídicas de maneira muito mais pronunciada do que o cobre, outro metal analisado pelos mesmos, induzindo diretamente a peroxidação lipídica. No presente trabalho, no fígado das traíras que foram alimentadas com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  houve aumentos significativos na LPO medida tanto em equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP) como em equivalentes de malondialdeído (MDA), sendo os níveis de CHP muito superiores aos de MDA.

Os hidroperóxidos de lipídio (LOOH) são os produtos iniciais da LPO enquanto que o MDA é um produto final. A decomposição dos LOOH é o principal passo metabólico da LPO, gerando radicais que propagam a peroxidação lipídica e produtos não-radicalares. Estes produtos secundários como aldeídos (MDA), cetonas e epóxidos, entre outros, são mais estáveis do que os radicais livres que iniciam a LPO ou que os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação. Conseqüentemente, eles podem atingir pontos distantes do local em que se formam (LIMA et al., 2002). A utilização de MDA como indicador de peroxidação lipídica vem sendo alvo de muitas críticas, visto que esse composto também pode ser produzido em outras reações e que nem todos os produtos de peroxidação lipídica geram MDA. Por isso, atualmente, recomenda-se o emprego de mais do que um biomarcador de peroxidação lipídica concomitantemente, como a análise de hidroperóxidos, que possui sensibilidade suficiente para detectar amplo espectro de hidroperóxidos. A LPO pode ser resumidamente definida como a “deteriorização oxidativa de lipídios poli-insaturados”. As membranas que rodeiam as células e as organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados. Por isso, tais membranas constituem um dos componentes celulares mais atingidos pelas ERO. Ácidos graxos com uma ou nenhuma dupla ligação são mais resistentes ao ataque das ERO que os ácidos graxos poli-insaturados. Os principais ácidos graxos que sofrem peroxidação lipídica na célula são o linoléico e o araquidônico, entre outros (YU, 1994).

A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol e, conseqüentemente, danos nesta camada lipídica tendem a diminuir esta fluidez. O ataque das ERO, que seqüestram um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, inicia o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL



& GUTTERIDGE, 2000). Os radicais de carbono formados desta maneira podem reagir espontaneamente com o oxigênio formando radicais peroxil, que propagam a cadeia de peroxidação lipídica seqüestrando átomos de hidrogênio de outros lipídios para formar hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas moléculas de ácidos graxos (JIALAL & GRUNDY, 1992).

A exposição por 30 dias a  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  aumentou a concentração de lipídios, principalmente de fosfolipídios e colesterol, no fígado do “catfish” *Heteropneustes fossilis* (BANO & HASAN, 1989). Os autores ainda descrevem que esse acúmulo de lipídios foi acompanhado por um aumento da LPO hepática. Outros estudos analisando os efeitos do  $\text{HgCl}_2$  na morfologia do fígado de peixes também relataram um acúmulo de vesículas lipídicas no citoplasma dos hepatócitos (ALVES COSTA et al., 2007, GIARI et al., 2008). De acordo com esses resultados, se o  $\text{HgCl}_2$  promove um acúmulo de lipídios poli-insaturados no fígado, um maior nível de CHP seria esperado do que MDA (conforme observado no presente estudo), devido a maior quantidade de substrato para as etapas iniciais da reação em cadeia da LPO. Adicionalmente, ácidos graxos poli-insaturados apresentam taxas de oxidação de 20 a 40 vezes mais rápidas que os ácidos graxos mono-insaturados (CROCKETT, 2008).

O MDA é gerado em menor quantidade durante a peroxidação lipídica em relação aos hidroperóxidos de lipídios (HABERLAND & SMITH, 1995). Enquanto o ensaio TBARS avalia os níveis de MDA, um dos produtos finais do processo da LPO, o ensaio FOX avalia os níveis de hidroperóxido de lipídios medidos em equivalente de CHP, produto das etapas iniciais da lipoperoxidação (MAIDANA et al., 2006). No fígado das traíras do grupo Hg, houve aumentos tanto no conteúdo de CHP como de MDA, entretanto o aumento nos níveis de CHP foi muito mais pronunciado (80% para CHP e 27% para MDA). O padrão inverso de acumulação de produtos da peroxidação lipídica ocorreu nas brânquias (28% para CHP e 70% para MDA) e no coração (31% para CHP e 98% para MDA), tecidos que também apresentaram um aumento significativo da LPO em resposta a exposição trófica ao Hg em relação aos controles, conforme discutido posteriormente. Esse padrão de acumulação de diferentes produtos do processo de LPO em diferentes tecidos das traíras expostas troficamente ao Hg pode ser o reflexo de diferentes dinâmicas tecido-específicas na reação em cadeia de propagação da peroxidação lipídica.

Além do aumento da LPO hepática, as traíras alimentadas com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  apresentaram aumento da oxidação protéica no fígado, medida pelo conteúdo de proteína carbonilada (PC). A oxidação induz alterações conformacionais nas proteínas e subsequente desnaturação, agregação e precipitação. Esses processos, por sua vez, podem contribuir para a inflamação dos tecidos e a morte celular (GOETZ & LUCH, 2008). Na literatura não há ainda estudos que avaliem os efeitos dos compostos mercuriais sobre a oxidação protéica, *in vivo*, em tecidos de peixes. É conhecido que a exposição à xenobióticos orgânicos e a alguns

metais induz a oxidação de proteínas em mexilhões e em peixes (LABIENIEC & GABRYELAK, 2004; TOKUR & KORKMAZ, 2007; VERLECAR et al., 2008). Parveza & Raisuddin (2005) mostraram que 48 horas de exposição a  $0,75 \mu\text{g.L}^{-1}$  de deltrametrina ou a  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  endosulfan ou a  $5 \text{mg.L}^{-1}$  de paraquat aumenta o conteúdo de proteína carbonilada em brânquias, rins e fígado do peixe de água doce “spotted snakehead”, *Channa punctata*. Os autores concluíram que a medida do conteúdo de PC pode ser um importante biomarcador de exposição aos poluentes indutores de estresse oxidativo em peixes. Em mexilhões (*Perna viridis*), a exposição a  $0,045 \text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 5, 10 e 15 dias aumenta o conteúdo de proteína carbonilada na glândula digestiva (VERLECAR et al., 2007). Filipak Neto et al. (2008), mostraram que a exposição a  $0,25 \mu\text{M}$  de metilmercúrio por 96 horas, *in vitro*, aumenta a oxidação protéica e lipídica em culturas de hepatócitos de traíra, *Hoplias malabaricus*, corroborando os achados do presente trabalho.

Danos a proteínas geralmente não pode ser reparados e na maioria das vezes proteínas danificadas são destruídas através de diversas enzimas. Em membranas, as proteínas podem ser oxidadas principalmente através de radicais peróxil, hidroxil e ânion superóxido, enquanto que no citoplasma danos a proteínas podem ocorrer de diversas outras maneiras como a oxidação por meio de aldeídos (MDA), ERO ou derivados de óxido nítrico entre outros (SHOAL, 2002). A oxidação de proteínas causa também agregação e fragmentação de aminoácidos. Como a estrutura primária de uma proteína pode ser muito variável, esta pode sofrer inúmeros tipos de processos oxidativos, gerando diferentes produtos finais. Além disso, as próprias ligações peptídicas podem ser atacadas, como por exemplo, na abstração de hidrogênio pelo radical hidroxil. No geral, este radical exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e óxido nítrico ficam mais restritos aos ataques de grupos facilmente oxidáveis, como os grupos tiólicos (-SH). Assim como os peróxidos lipídicos, os peróxidos aminoácidos são estáveis, mas na presença de íons metálicos podem formar novos radicais orgânicos, gerando reações cíclicas. Eles também podem atacar grupos tiólicos de outras proteínas, assim como os peróxidos lipídicos, e sua degradação é extremamente difícil por não serem substratos para as enzimas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

De acordo com revisão feita por Rosein et al. (2006), a via proteossomo ubiquitina-26S é o principal mecanismo pelo qual células eucarióticas marcam proteínas para a degradação. Uma oxidação moderada das proteínas aumenta a susceptibilidade à proteólise e as torna substrato para o proteossomo. Contudo, proteínas severamente oxidadas parecem ser substratos de difícil ubiquitinação, primeiro agregando-se e então formando ligações cruzadas que as tornam altamente resistentes à proteólise. A incapacidade de degradar proteínas extensivamente oxidadas pode contribuir para o acúmulo de agregados protéicos que ocorre em algumas doenças e durante o processo de envelhecimento.

Considerando todos os tecidos analisados, os níveis de CHP, MDA e de PC foram muito superiores em traíra em comparação com os matrinxãs (capítulo IV), o que reflete ainda que as lesões oxidativas e os mecanismos antioxidantes são espécie-específicos. Um grande obstáculo na tentativa de correlacionar a atividade das enzimas antioxidantes com os aspectos fisiológicos dos peixes, é a diferença quantitativa existente entre as diferentes espécies analisadas (WINSTON, 1991).

No presente estudo o efeito hepatotóxico do mercúrio em traíras foi comprovado pela indução de danos oxidativos em lipídios e proteínas (estabelecimento de estresse oxidativo), mesmo com os aumentos significativos das atividades de todas as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GST e GR). Em princípio, o estresse oxidativo pode ser causado por redução na quantidade de antioxidante nos sistemas de defesa celular ou por produção elevada de ERO. No fígado das traíras do grupo Hg, as defesas antioxidantes hepáticas não foram eficientes para conter os danos das ERO geradas em grande quantidade frente a contaminação pelo metal. Os danos oxidativos podem levar a perda da função celular e morte celular por necrose ou apoptose.

A desintoxicação de ERO, para evitar estabelecimento de danos oxidativos em lipídios, proteínas e DNA, envolve mecanismos de elevada sincronia e que atuam de forma altamente cooperativa. Os organismos são equipados com uma cascata de enzimas capazes de conter a produção de ERO durante o metabolismo normal ou durante a exposição a xenobióticos ou metais pesados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Nessa cascata, devido ao efeito inibitório sobre a formação das ERO, o sistema SOD-CAT proporciona a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio (PANDEY et al., 2003) e é comumente usado como biomarcador indicativo da produção desses radicais livres (REGOLI et al., 2003; VAN der OOST et al., 2003). Atividades elevadas destas enzimas provavelmente constituem uma resposta ao aumento de geração das ERO, iniciado pela toxicidade do metal (JOHN et al., 2001). A SOD e/ou a CAT podem intervir antes da reação lesiva inicial das primeiras espécies reativas de oxigênio (MOSLEN, 1995). Dessa maneira, a indução do sistema SOD-CAT no fígado das traíras expostas troficamente ao Hg, ocorre na tentativa de neutralizar o radical superóxido e, conseqüentemente, o peróxido de hidrogênio produzidos em grande quantidade em resposta a exposição ao metal. Os aumentos pronunciados da SOD e CAT observados no fígado (~211 e 285 %, respectivamente) das traíras do grupo Hg provavelmente reflete o alto metabolismo oxidativo deste órgão, responsável por inúmeras funções como homeostasia do metabolismo intermediário e desintoxicação de xenobióticos entre outras que exigem síntese protéica. A síntese protéica é uma atividade que demanda muita energia. Para uma proteína de 100 aminoácidos, são gastas 398 moléculas de ATP (STRYER, 1996), o que requer do tecido um alto potencial oxidativo. Em peixes, vários metais são conhecidos por induzir a atividade do sistema SOD-CAT (PARIS-PALACIOS et al., 2000; BASHA & RANI, 2003; RUAS et al., 2008; SOARES et al., 2008),

entretanto poucos trabalhos avaliaram o efeito do mercúrio, *in vivo*, na atividade da SOD-CAT, particularmente do cloreto de mercúrio.

De maneira semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, Berntssen et al. (2003), estudando a atividade da SOD no fígado de salmão do Atlântico, *Salmo salar*, observaram aumento significativo desta enzima após quatro meses de alimentação com dieta contendo  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ . Em culturas de hepatócitos de traíra, a exposição por 96 horas a  $0,25 \text{ }\mu\text{M}$  de metilmercúrio resultou em aumento da atividade da CAT (FILIPAK NETO et al., 2008). Entretanto, quando os autores usaram a concentração de  $2,5 \text{ }\mu\text{M}$  de metilmercúrio, observaram uma redução na atividade desta enzima. Na literatura há controvérsias em relação ao efeito do mercúrio sobre a atividade da catalase em peixes. De acordo com Singh & Sivalingam (1982) o mercúrio, *in vitro*, é um potente inibidor da atividade da CAT em células da tilápia *Sarotherodon mossambicus*. Aumentos significativos nas atividades das enzimas relacionadas ao metabolismo da glutathione como a GPx e a GST também foram observados em fígado de traíras alimentadas com matrinxãs contaminados com Hg. A ação enzimática da GPx é um dos mais importantes meios de controle dos níveis de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos oriundos do ataque de espécies radicalares (COHEN & HOCHSTEIN, 1963; MEISTER & ANDERSON, 1983). De acordo com Zhang et al. (2004), a GPx exerce um efeito importante contra a peroxidação lipídica, uma vez que está envolvida preferencialmente na remoção de peróxidos orgânicos, e, em pequena extensão, na remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dessa forma, a GPx tem um papel especialmente importante na proteção de membranas contra danos decorrentes da peroxidação lipídica. Essa observação sugere que a principal função da GPx está na terminação da propagação da cadeia de radicais (VAN der OOST et al., 2003). Entretanto, sua indução não foi suficiente para conter o aumento significativo da peroxidação lipídica desencadeada pelo Hg no fígado das traíras expostas troficamente ao metal.

A GPx apresenta alta atividade no fígado, moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos esqueléticos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Esse padrão também foi observado no presente estudo, onde o fígado apresentou as mais elevadas atividades da enzima em comparação aos demais tecidos analisados. Aumentos na atividade da GPx foram observados em peixes expostos a diferentes xenobióticos (ALMEIDA et al., 2002; SAYEED et al., 2003; ZHANG et al., 2004). O cloreto de mercúrio aumentou a atividade da GPx em fígado de salmão do Atlântico, *S. salar*, após a exposição a  $100 \text{ mg}$  de  $\text{HgCl}_2$  por  $\text{kg}$  de dieta (BERNTSSEN et al., 2003). No bagre, *Ictalurus melas*, a exposição a  $35 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  também induziu aumentos significativos na atividade da GPx hepática.

A GST está envolvida nos processos de desintoxicação de xenobióticos, incluindo os metais pesados, e tem sido apontada como um biomarcador útil na avaliação do impacto ambiental causado por xenobióticos geradores de estresse oxidativo (RODRIGUEZ-ARIZA et al.,

1991; LIVINGSTONE, 1998). Esta enzima exerce um importante papel na proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo (FOURNIER et al., 1992; BANERJEE, 1999). A susceptibilidade de diferentes espécies de peixes a químicos carcinogênicos pode ser modulada pela atividade da GST (VARANASI et al., 1987).

No grupo Hg, o aumento da atividade da GST no fígado das traíras indica o desenvolvimento de um mecanismo de defesa para tentar combater os efeitos tóxicos do metal. Adicionalmente, algumas isoformas da GST também apresentam atividade de GPx, por atuarem diretamente sobre qualquer hidroperóxido orgânico, menos o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BARLING et al., 1993). Dessa forma, aumentos pronunciados na atividade da GST podem refletir uma atuação desta enzima na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídios resultantes do processo de peroxidação lipídica, uma vez que o método utilizado para medida da atividade enzimática da GST utiliza o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, que é substrato comum para a maioria das isoformas da GST (HABIG et al., 1974). Uma elevada atividade da GST foi encontrada no fígado das traíras troficamente expostas ao Hg em comparação com os demais tecidos. Isso indica uma função hepática importante no processo de desintoxicação desses xenobióticos (BASHA & RANI, 2003).

Os estudos sobre os efeitos do mercúrio na atividade da GST em peixes expostos a xenobióticos mostram tanto indução quanto inibição da sua atividade, dependendo da concentração do mercúrio, duração da exposição e tipo de tecido analisado. Elia et al. (2003) mostraram que a exposição por 10 dias ao HgCl<sub>2</sub>, nas concentrações de 35, 70 e 140 µg.L<sup>-1</sup>, aumenta a atividade da GST hepática no bagre, *Ictalurus melas*. Por outro lado, Guilherme et al. (2008) estudando biomarcadores de estresse oxidativo em tainhas, *Liza aurata*, coletadas na bacia do Laranjo, em Aveiro (Portugal), região impactada por mercúrio, não observaram alteração na atividade da GST hepática em relação aos peixes coletados em áreas de referência. Larose et al. (2008) encontraram uma correlação negativa entre a atividade da GST hepática e as concentrações de mercúrio no fígado de percas das espécies *Sander vitreus* e *Perca flavescens* coletadas de lagos contaminados por mercúrio no Canadá. Filipak Neto et al. (2008) não observaram alteração na atividade da GST após 96 horas da adição de 0,25 µM de metilmercúrio em culturas de hepatócitos de traíra, *H. malabaricus*.

Quando em contato com alguns poluentes, como mercúrio, as células dos peixes usualmente tentam removê-los por conjugação direta com a GSH ou pela ação da GST. Tanto a GPx como a GST utilizam GSH nos processos de desintoxicação de hidroperóxidos de lipídio e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de xenobióticos, respectivamente (LIEBLER & REED, 1997; SIES, 1999). Esses processos levariam a uma diminuição nos níveis de GSH. A redução significativa no conteúdo de GSH poderia ser causada tanto por um aumento na sua utilização, quanto pela inibição de sua síntese no fígado, ou ainda por uma ineficiência na regeneração desta molécula pela GR. No presente trabalho, no fígado das traíras expostas troficamente ao Hg, houve aumentos significativos no

conteúdo de GSH e GSSG e na atividade da GR. Assim, a GSH que está sendo utilizada pela GST e pela GPx, está sendo mantida pela atividade elevada da GR que converte a forma oxidada GSSG novamente a GSH as custas de NADPH ou ainda, o conteúdo de GSH pode estar sendo mantido através da indução de sua síntese, processo que não foi avaliado neste estudo. O aumento da GSH hepática em fígado de peixes frente à exposição a xenobióticos provavelmente ocorre devido a aumentos na captação de aminoácidos e nas atividades das enzimas de biossíntese da GSH (GALLAGHER et al., 1992).

A enzima GR não age diretamente na remoção de espécies radicalares, mas impede a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (ROVER et al., 2001). O mecanismo de regulação da atividade da GR em peixes não é ainda bem entendido, porém um aumento de sua atividade pode ser interpretado como uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo (ZHANG et al., 2004). Corroborando nossos resultados, Filipak Neto et al. (2008) observaram um aumento significativo na atividade da GR após 96 horas da adição de 2,5  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio em culturas de hepatócitos de traíra, *Hoplias malabaricus*.

Durante um processo moderado de estresse oxidativo, os níveis de GSH poderiam aumentar como uma resposta adaptativa por meio do aumento de sua síntese e/ou regeneração pela GR, conforme observado no fígado. Por outro lado, o estresse oxidativo severo pode reduzir os níveis de GSH por prejudicar os mecanismos adaptativos (ZHANG et al., 2004). A depleção de 20 a 30% dos níveis normais de GSH prejudica o sistema de defesa celular contra ações tóxicas, tanto de ERO como de intermediários biológicos reativos, o que pode levar à injúria e morte celular (LIEBLER & REED, 1997). Esta diminuição dos níveis de GSH reflete um aumento na produção de oxidantes, num grau que excederia a capacidade de desintoxicação pela GSH (BRAY & TAYLOR, 1993; MEISTER, 1995). De acordo com ELIA et al. (2003), a depleção da GSH pode limitar a capacidade da célula em seqüestrar radicais livres, aumentando o potencial oxidativo de maneira geral. A GSH pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada (UHLIG & WENDEL, 1992). No presente estudo, como houve uma redução da razão GSH:GSSG hepática, o aumento do conteúdo de GSH frente a exposição ao Hg pode não ter sido suficiente para dar suporte aos aumentos das atividades da GST e GPx ou a sua utilização na neutralização direta de ERO e do próprio Hg, levando a um acúmulo acentuado de GSSG. Sob estresse oxidativo severo, a capacidade da célula de reduzir GSSG para GSH pode estar excedida, levando ao acúmulo de GSSG e desequilíbrio do estado redox (DICKINSON & FORMAN, 2002).

Desvios na relação GSH:GSSG são usados para estimar o estado redox dos sistemas biológicos (MATOS et al., 2007). Assim, o índice redox GSH:GSSG torna-se uma avaliação importante, figurando como um imprescindível marcador bioquímico em células sob exposição a agentes tóxicos (REED, 1990). A redução da razão GSH:GSSG no fígado das traíras

alimentadas com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  é, provavelmente, uma indicação de sua exaustão nos processos de desintoxicação. O estresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox da glutathiona, aumentando a liberação de glutathiona oxidada no organismo (ROVER et al., 2001). A alteração na razão GSH:GSSG aumenta o risco de estresse oxidativo devido à redução da capacidade de proteção da glutathiona, desde que a sobrecarga oxidativa comprovada pelos aumentos na atividade da SOD e da CAT nesse tecido sobrepõe os mecanismos antioxidantes de defesa, que não foram suficientes para evitar danos oxidativos a lipídicos e proteínas.

A diminuição do conteúdo de GSH resulta num aumento da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que, em presença de metais, pode ser um dos fatores geradores de  $\text{OH}^\bullet$  (SALVADOR et al., 2004), aumentando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica. Adicionalmente, se grande parte da ação da GSH é obtida pela indução das enzimas que a usam como substrato, o controle do nível de GSH é necessário para manter a ação funcional destas enzimas (JONES, 1995). Além disso, variações nos níveis de GSH afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA (MEISTER & ANDERSON, 1983; DENEKE & FANBURG, 1989), uma vez que a regulação redox de sinais dependentes de receptores de membrana e vários sinais de transcrição são influenciados pelo nível intracelular de GSH (DROGE, 2002).

O fígado é um importante sítio de produção e armazenamento de substâncias antioxidantes, entre elas a GSH. Alterações hepáticas que levem a uma diminuição da produção ou exaustão da glutathiona promovem um aumento da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, dano ao tecido hepático (NICOLA, 1996; VENDEMIALE, 2001; CZUCZEJKO et al., 2003). Mais de 90% da GSH presente na circulação sistêmica resulta do influxo hepático deste peptídeo (BIANCHI et al., 1997). O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de substâncias tóxicas como metais pesados, onde ERO freqüentemente são geradas. Se o fígado for incapaz de neutralizar os oxidantes gerados, as ERO podem alcançar a corrente sangüínea e danificar outros sítios como os eritrócitos. Estes metabólitos reativos são conjugados com a GSH no fígado, resultando na diminuição da concentração de GSH hepática (HUAN et al., 1998).

A formação de complexos GSH-Hg parece ser a forma primária pela qual o metal é transportado e eliminado do organismo (ZALUPS, 2000). Os mecanismos de transporte não estão claros, mas há evidências de que esses complexos entre GSH e Hg são as formas predominantes tanto na bile quanto na urina. Tanto a GSH quanto a cisteína (aminoácido precursor da GSH) atuam como carreadores do mercúrio e parecem controlar a taxa de efluxo do metal da bile (BALLATORI & CLARKSON, 1983; BALLATORI & CLARKSON, 1984; LYN, 2002).

A concentração de GSH pode tanto aumentar como reduzir em função da exposição ao mercúrio. No bagre *I. melas* a exposição por 10 dias a  $35 \mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  também induziu redução significativa no conteúdo de glutathiona total. Entretanto, após 10 dias de exposição a 70 e  $140 \mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , não foram observadas diferenças no conteúdo desse

tripeptídeo em relação ao grupo controle. Tainhas *L. aurata* coletadas na bacia do Laranjo (Portugal), região impactada por mercúrio, apresentaram aumentos no conteúdo de GSH hepática (GUILHERME et al., 2008). Por outro lado, Larose et al. (2008) não observaram alterações no conteúdo de GSH em fígado de percas das espécies *S. vitreus* e *P. flavescens* coletadas de lagos contaminados por mercúrio no Canadá. Já Filipak Neto et al. (2008) observaram uma redução significativa nos níveis de GSH após 96 horas da adição de 0,25  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio em culturas de hepatócitos de traíra.

De maneira geral, no grupo Hg, as alterações exibidas pelo fígado das traíras também foram observadas nas brânquias desses animais, com exceção da não alteração na atividade da CAT e reduções significativas nas atividades da GR e GPx. Nas brânquias, além da indução das enzimas SOD e GST, o mercúrio também levou a um estresse oxidativo severo, comprovado pelos aumentos na peroxidação lipídica e oxidação protéica e perda da homeostase redox refletida pela diminuição da relação GSH:GSSG.

Oliveira-Ribeiro et al. (2000) avaliaram danos branquiais induzidos pelo cloreto de mercúrio no peixe-gato tropical, *Trichomycterus zonatus*, e na espécie nórdica de salmão *Salvelinus alpinus*. Foram observadas alterações patológicas branquiais como hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais das lamelas secundárias, epitélio escamoso, formação de pontes interlamelares, reduzindo o espaço para a passagem da água e, em alguns casos, chegando à fusão completa de lamelas secundárias adjacentes. Os autores ainda ressaltam que essas alterações no epitélio branquial foram mais evidentes na espécie tropical. Giari et al. (2008) também mostraram que a exposição por 48 horas a 251, 355 e 501  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Hg promoveu alterações morfológicas nas brânquias do robalo, *Dicentrarchus labrax*. Entre as alterações encontradas pelos autores destacam-se edema, aneurismas, epitélio lamelar descamado, hiperplasia das células cloreto, fusão lamelar, áreas de necrose e infiltração de leucócitos. Essas alterações morfológicas também foram descritas para o peixe “medaka”, *Oryzias latipes*, após 16 dias de exposição à concentração sub-letal de 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de metilmercúrio (LIAO et al., 2006). Os resultados encontrados no presente estudo, como aumentos na peroxidação lipídica e protéica nas brânquias das traíras alimentadas com matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  estão em concordância com tais achados histológicos.

A GR, que regenera a GSH, tem o NADPH como substrato. A disponibilidade limitada do NADPH pode levar a um aumento do conteúdo de GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo (SHAN et al., 1990; KRETZSCHMAR, 1996). Dessa forma, a redução da atividade da GR nas brânquias das traíras alimentadas com matrinxãs contaminados com Hg pode ter sido resultado da exaustão do NADPH. A glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é a enzima reguladora da via das pentoses fosfato e uma das principais funções desta via é fornecer o NADPH necessário para manter os níveis intracelulares de GSH (FRIDOVICH, 1998). Alguns



estudos sugerem que a atividade da G6PDH pode ser inibida pelo mercúrio (TSUZUKI & YAMADA, 1979; HOFFMAN & HEINZ, 1998; AZEVEDO, 2003). No presente estudo, uma possível falha no aporte de NADPH pela redução da atividade da G6PDH branquial pela ação do Hg não pode ser excluída, mesmo que esta enzima não tenha sido analisada. Em culturas de hepatócitos de traíras houve redução de cerca de 60% na atividade da GR após 96 horas de adição de 0,25  $\mu$ M de metilmercúrio, porém sem alteração na atividade da G6PDH (FILIPAK NETO et al., 2008), sugerindo que a inibição da atividade da GR pode ser uma ação direta do mercúrio nesta enzima.

Nas brânquias das traíras expostas ao Hg, a redução da atividade da GR provocou um acúmulo acentuado do conteúdo de GSSG (152 %), maior do que aquele observado no fígado (44%). Devido a ineficiência da reciclagem da GSSG a GSH pela ação da GR, comprovada pela redução da razão GSH:GSSG, o aumento de cerca de 111% no conteúdo de GSH pode não ter sido suficiente em dar suporte ao aumento da atividade da GPx, levando a redução de sua atividade. O aumento dos níveis de GSH pode ser decorrente de um maior aporte e/ou síntese desse tripeptídeo, mas também da própria inibição da atividade da GPx. Uma vez que houve um acúmulo de GSSG, durante a fase inicial de exposição pode ter ocorrido uma indução da atividade da GPx branquial, mas o sistema da glutatona (síntese e regeneração) não foi eficiente em sustentar tal indução após 30 dias de alimentação com matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Sob estresse oxidativo severo, a habilidade das células em reduzir GSSG pode ser comprometida, levando ao aumento de sua concentração (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; WANG & BALLATORI, 1998).

A atividade da GPx depende da presença da GSH, que é oxidada nesse processo, e, assim, a atividade da GPx pode ser influenciada pelos níveis de GSH. A diminuição na disponibilidade de GSH ou a diminuição na razão GSH:GSSG pode limitar o papel da GPx na desintoxicação eficiente de hidroperóxidos de lipídios (CHEUNG et al., 2004), permitindo aumentos significativos no processo de peroxidação lipídica, como observado no presente estudo. Além disso, essa diminuição da atividade da GPx observada poderia estar relacionada à produção excessiva de O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, que conforme Bagnasco et al. (1991), é capaz de inibir a atividade da GPx. A atividade da enzima GPx também pode ser reduzida por meio de “feedback” negativo do excesso de substrato ou pelo próprio dano oxidante (TABATABAIE & FLOYD, 1994). A diminuição da atividade GPx após a exposição ao Hg, observado em nosso trabalho, poderia indicar que a quantidade de hidroperóxidos, resultante do processo de LPO nas brânquias, poderia ter ultrapassado a capacidade antioxidante desta enzima (REMACLE, et al., 1992).

Por outro lado, o sítio ativo da GPx contém selenocisteína e o processo de oxirredução do selênio é a base da ação catalítica da enzima (ROTRUCK et al., 1973). Os metais pesados, incluindo o Hg, formam ligações estáveis com o grupo –SeH da mesma forma que com a sulfidril –SH. Assim, em parte, a inibição da atividade da GPx pelo Hg pode ocorrer em razão

da formação de um complexo com o selênio no sítio ativo da enzima, levando a alterações na estrutura terciária e quaternária da mesma (AZEVEDO, 2003). De acordo com o descrito na literatura, a exposição de peixes a xenobióticos pode inibir a atividade de enzimas antioxidantes como a GPx. Fatima et al. (2000) relataram uma baixa atividade da GPx em diferentes tecidos de peixes após a exposição a efluentes de fábrica de papel, indicando uma ineficiência desses órgãos em neutralizar os impactos dos peróxidos. A inibição da atividade da GPx também foi observada após o tratamento combinado com o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e com o inseticida organofosforado azinfosmetil em cérebro de carpa, *C. carpio* (ORUÇ et al., 2004) e em fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (ORUÇ & UNER, 2000).

Larose et al. (2008) observaram uma correlação negativa entre a atividade da GPx e a concentração de Hg no fígado de percas das espécies *S. vitreus* e *P. flavescens* coletadas de lagos contaminados por mercúrio no Canadá, mostrando que quanto maior era a concentração de Hg total no órgão, menor era a atividade da GPx. Bulato et al. (2007) analisaram a atividade da GPx em culturas de células LNCaP expostas ao HgCl<sub>2</sub> por até 4 dias e observaram que o Hg inibiu a atividade da GPx que, por sua vez, aumentou com a adição de doadores de selênio. Os autores concluíram que o mercúrio diminui a biodisponibilidade do selênio ao formar complexos iônicos. Elia et al. (2000) demonstraram que a exposição aguda do bagre *I. melas* a concentrações de HgCl<sub>2</sub> superiores a 140 µg.L<sup>-1</sup> promove redução na atividade da GPx no fígado e, conseqüentemente, aumenta os níveis hepáticos de GSH. Entretanto, exposições agudas a concentrações inferiores a 140 µg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> levaram a um aumento significativo na atividade da GPx hepática neste bagre (ELIA et al., 2003). Berntssen et al. (2003) estudando a atividade da GPx em diversos tecidos do salmão do atlântico, *Salmo salar* alimentados durante 4 meses com uma dieta contendo Hg inorgânico na concentração de 100 mg.kg<sup>-1</sup>, observaram uma redução da atividade da enzima no rim, um aumento no fígado e nenhuma alteração no cérebro. Dessa forma, o comportamento da GPx parece depender da concentração de mercúrio, do tempo e forma de exposição bem como do tipo de tecido analisado.

Em órgãos como as brânquias, que estão mais expostas aos danos provocados pela produção das ERO, a difusão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o sangue, onde reage com a CAT eritrocitária, pode ocorrer como um mecanismo de defesa (BORELA & VARELA, 2004). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ainda se difundir diretamente para a água, via brânquias, de forma semelhante à excreção da amônia, um mecanismo aparentemente comum nos peixes como uma possível via de desintoxicação do mesmo. Wilhelm-Filho et al. (1994) demonstraram a capacidade de excreção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas brânquias no guarú, *Poecilia velliifera*. Este composto pode difundir-se livremente através das membranas das células (FREEMAN & CRAPO, 1982) e, além disso, possui estabilidade e tempo de vida médio suficiente para percorrer as distâncias existentes entre os sítios de sua formação nos diferentes tecidos até a região branquial, por onde seria excretado (PRYOR, 1986). Apesar

deste mecanismo não ter sido analisado no presente experimento, é possível que o  $H_2O_2$  não metabolizado pela CAT e pela GPx possa ter sido eliminado por esta via. O  $H_2O_2$  que estaria sendo difundido dos tecidos para o sangue dos peixes expostos ao Hg poderia ser excretado diretamente, via brânquias, como um mecanismo mais econômico de desintoxicação desse composto, uma vez que a atividade da CAT não aumentou neste tecido.

O Hg na dieta também induziu estresse oxidativo no coração das traíras evidenciado pelos aumentos significativos na peroxidação lipídica e na oxidação protéica. Porém, no coração, o estresse oxidativo parece ter sido moderado, pois não houve diminuição da relação GSH/GSSG e sim, um aumento significativo em comparação com o valor apresentado pelos controles. A exposição via trófica ao mercúrio não levou a um acúmulo de GSSG no tecido cardíaco, mas induziu aumentos nas atividades da SOD, CAT, GPx, GST e GR e no conteúdo de GSH. Desta forma, o músculo cardíaco das traíras apresentou um potencial antioxidante superior ao exibido pelo fígado e pelas brânquias, pois apesar de danos oxidativos terem se estabelecido, os miócitos mantiveram a homeostase redox. Segundo Marcon (1997), a intensidade dos danos oxidantes depende tanto da natureza como da quantidade das ERO as quais as células estão expostas, bem como das proteções antioxidantes que estas células dispõem. A eficácia do sistema antioxidante depende de qual tipo de molécula é geradora do estresse oxidante e da localização intra- ou extracelular dessa molécula (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998). Vários trabalhos sobre efeitos de xenobióticos nos biomarcadores de estresse oxidativo em peixes e outros vertebrados aquáticos mostram respostas tecido-específicas (ORUÇ et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006, COSTA et al., 2008, MONTEIRO et al., 2009). As principais causas dessas diferenças poderiam ser atribuídas a diferentes taxas de geração das ERO e a diferentes potenciais antioxidantes dos tecidos (WINSTON, 1991; FATIMA et al., 2000).

Na literatura, muitos trabalhos mostram que os peixes são particularmente sensíveis a exposição a metais pesados e a maioria dos estudos se baseia na toxicidade hepática e renal desencadeada pela presença desses contaminantes (KELLY et al., 1998; ZIKIC et al., 1998; VAGLIO & LANDRISCINA, 1999). Porém, alguns estudos recentes sugerem que o coração mostra uma grande vulnerabilidade à intoxicação por outros metais, com alteração da função cardíaca (TORT & MADSEN, 1991; WANG et al., 1999, AURELIANO et al., 2002; SOARES et al., 2006, 2007; 2008). Dados da literatura que mostram que o Hg diminui a contratilidade do miocárdio e reduz as atividades da  $Na^+K^+$ -ATPase, da  $Ca^{2+}$ -ATPase e da miosina ATPase (REDDY et al., 1988; ANNER et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1994; SALONEN et al., 1995; VASSALO et al., 1996). Os aumentos da peroxidação lipídica e da oxidação protéica no músculo cardíaco das traíras expostas troficamente ao Hg corroboram esses resultados, uma vez que o estresse oxidativo pode acarretar todas essas alterações. Conforme será discutido no capítulo VII,

os estresse oxidativo do tecido cardíaco de traíras pode ser uma das causas do efeito inotrópico negativo observado no miocárdio das traíras expostas ao Hg.

Em músculo de peixes, o Hg é encontrado ligado ao grupo cisteinil das proteínas (HARRIS et al., 2003). Essa reação pode inativar resíduos de cisteínas que são críticos para as funções das proteínas e diminuir os estoques de GSH, levando a danos oxidativos (BULATO et al., 2007). Entretanto, no presente estudo não houve diminuição do conteúdo de GSH no tecido cardíaco das traíras do grupo Hg, sugerindo que mecanismos adaptativos ocorreram na tentativa de manter o tiol das proteínas no estado reduzido, garantido suas funções. No grupo Hg, o aumento de 30% na atividade da GR foi eficiente em evitar aumentos no conteúdo de GSSG e dar suporte para o aumento de 35% na atividade da GPx cardíaca. O aumento do conteúdo de GSH no músculo cardíaco e, conseqüentemente, da razão GSH:GSSG, pode ser o reflexo da indução da síntese de GSH e/ou maior aporte deste tripeptídeo via sangue, uma vez que o fígado é o maior responsável pela síntese de GSH plasmática (KAPLOWITZ et al., 1985). De acordo com Van der Oost et al. (2003), o quociente GSH:GSSG pode ser mantido ou aumentado devido a indução da atividade da GR e/ou da síntese de GSH. Durante um processo moderado de estresse oxidativo, os níveis de GSH poderiam aumentar como uma resposta adaptativa por meio do aumento de sua síntese e/ou regeneração pela GR, conforme observado no coração das traíras, embora esta resposta adaptativa dos miócitos não tenha sido eficaz na remoção das ERO, levando ao aumento da peroxidação lipídica e do nível de carbonilação protéica.

Estudos mostram que o mercúrio aumenta o conteúdo de GSH em fígado, brânquias e rins de peixes (RANA et al., 1995; ELIA et al., 2000; GUILHERME et al., 2008). Entretanto, na literatura há poucos estudos sobre o efeito de metais pesados no metabolismo de GSH em coração de peixes. Farombi et al. (2007) observaram que bagres africanos (*Clarias gariepinus*) coletados de rios contaminados por metais pesados como cobre, chumbo e zinco apresentaram elevados níveis de GSH no coração em comparação com peixes controles. Soares et al. (2008) mostraram que concentrações sub-letais de vanádio e cádmio no teleósteo marinho *Halobatrachus didactylus* provocou aumentos pronunciados nos níveis cardíacos de GSH após 12 e 24 horas da administração intravenosa.

Diferentemente do que observado no coração, a alimentação com matrinxãs expostas ao Hg não induziu estresse oxidativo no músculo branco das traíras. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de LPO e oxidação protéica e nem no conteúdo de GSH e GSSG no músculo branco. Assim, as defesas antioxidantes foram suficientes em conter as ERO geradas pela exposição trófica ao mercúrio e lesões oxidativas não se estabeleceram nesse tecido. Aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes na ordem de 120% para SOD, 51% para CAT, 28% para GST, 180% para GPx e 640% para GR conseguiram conter as ERO, manter a homeostase redox celular e impedir aumentos da LPO e oxidação protéica. Em comparação com

os demais tecidos, no músculo branco foram observados os aumentos mais pronunciados nas atividades da GPx e GR. Provavelmente, o elevado aumento da atividade da GPx conseguiu desintoxicar eficientemente o  $H_2O_2$  e os hidroperóxidos de lipídios. Para manter os níveis de GSH adequados para as atividades da GPx e GST, a atividade da GR aumentou 7 vezes mais que a atividade das traíras do Grupo Ct. Como a GR é uma enzima NADPH dependente, no músculo branco, o grande aporte desse nucleotídeo deve ter decorrido de uma elevação da atividade da G6PDH. Entretanto, no presente trabalho a atividade da G6PDH não foi avaliada.

A literatura mostra que, sob estresse oxidativo, a atividade da G6PDH varia grandemente dependendo do tecido analisado, do tipo e da dose do xenobiótico estudado. Reddy & Bhagyalakshmi (1994) encontraram um aumento na atividade em hepatopâncreas e músculo do caranguejo *Scylla serrata* após a exposição ao  $CdCl_2$ . Em ratos, a injeção de 0.4 mg Cd por kg de peso corpóreo, provocou uma diminuição inicial na atividade da G6PDH seguida de um aumento após 72 horas de tratamento (SARKAR et al., 1995). Filipak Neto et al. (2008) mostraram que a exposição a 0,25  $\mu M$  de metilmercúrio por 96 horas, *in vitro*, não altera a atividade da G6PDH em culturas de hepatócitos de traíra. Entretanto, a exposição a 2,5  $\mu M$  de metilmercúrio por 96 horas provocou uma indução significativa na atividade desta enzima. Ratos que receberam, por gavagem, doses de 0.1 mg/kg de  $HgCl_2$  por três dias consecutivos, mostram um aumento da atividade hepática da G6PDH (BANDO et al., 2005).

O mercúrio inorgânico possui grande afinidade por grupos sulfidrilas (-SH) de biomoléculas endógenas (CLARKSON, 1997). Deste modo, ele pode se complexar com estruturas que contêm estes grupos sulfidrilas, como a cisteína e a glutatona (ZALUPS, 2000) e também com as metalotioneínas (YOSHIDA et al., 1999). As metalotioneínas (MTs) são proteínas com massa molecular de aproximadamente 6-15 kDa, contêm cerca de 30% de resíduos de cisteína e apresentam afinidade pelo mercúrio, cádmio, cobre e zinco (MONSERRAT et al., 2007). A abundância de ligantes tiólicos dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere a proteína uma alta afinidade por íons metálicos livres, o que faz das MTs, proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico (NORDBERG, 1998). Os resíduos de -SH das cisteínas da MT ligam-se aos íons dos metais dos grupos I-B e II-B da tabela periódica, como zinco ( $Zn^{2+}$ ), cádmio ( $Cd^{2+}$ ), mercúrio ( $Hg^{2+}$ ) e cobre ( $Cu^{2+}$ ), prevenindo sua ação tóxica e danos celulares. Sabe-se que uma molécula de MT pode se ligar a 7 átomos de cádmio ou zinco, ou a 11-12 átomos de cobre (SUZUKI et al., 1996). Entretanto, a afinidade da MT é diferente para os vários metais e depende da afinidade de cada metal pelos grupos sulfidrilas presentes na sua molécula:  $Hg^{2+} > Cu^+ > Ag^+ > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^+$  (CANESI et al., 1999). Conseqüentemente, um metal com maior afinidade pela MT pode deslocar outro que já esteja ligado a esta proteína.

Na região promotora do gene das MTs existem os elementos responsivos a metais (MREs – “metal regulatory element”), que são os elementos de resposta mais comuns, podendo

ser encontrados tanto em invertebrados quanto em vertebrados. Dentre os diversos fatores de transcrição que interagem com os MREs, o mais conhecido é o MTF-1 (“metal transcription factor-1”). A transcrição das MTs depende da interação do MTF-1 com os MREs, e esta ligação é mediada pela presença de zinco (“zinc fingers”). O fator de transcrição MTF-1 encontra-se inativo quando complexado com seu inibidor MTI (“metallothionein transcription inhibitor”) que é sensível ao zinco. A presença de metais mais tóxicos como o cádmio ou cobre promovem a liberação do zinco do seu sítio de armazenamento num ligante intracelular de metais, uma vez que estes metais possuem maior afinidade pelo ligante que o zinco. Dessa forma, há um aumento nos níveis citosólicos de zinco livre, que por sua vez se liga ao complexo MTI/MTF-1, promovendo a dissociação deste e a liberação do MTF-1, que interage com os MREs ativando a transcrição de MT (ROESIJADI, 1996). Dessa forma, as MTs atuam na desintoxicação de metais não essenciais como o Hg e o Cd pois estes se ligam aos grupos de cisteínas-SH da MT com grande afinidade em substituição ao Zn/Cu de sua constituição, que promovem, por sua vez, a expressão da MT.

Assim, a MT contribui para a desintoxicação de metais e, conseqüentemente, aumenta a tolerância dos peixes aos metais (SCHLENK et al., 1999; AHMAD et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000). A MT tem sido identificada em vários órgãos de peixes expostos a metais sendo o fígado o órgão no qual tem sido encontrada em concentrações mais altas (AHMAD et al., 2000; OLSVIK et al., 2000; BRAGIGANG & BERTHET, 2003). Os esforços para estabelecer o papel das MTs em peixes, têm sido focalizado na potencial função da proteína na redução da toxicidade de metais. A indução da MT resulta em um aumento da ligação de metais a proteína, e tem sido sugerido que os efeitos tóxicos do Cd e Hg ocorrem somente quando a capacidade de ligação das MTs é excedida e estes metais aparecem associados a proteínas de alto peso molecular no citosol. O seqüestro de metais pela MT não é um sistema estático, de modo que um aumento na taxa de síntese da MT é ocasionado por um aumento nos níveis de metais no organismo (HOGSTRAND & HAUX, 1991).

No presente estudo, as traíras expostas troficamente ao Hg apresentaram um aumento no conteúdo de MT no fígado, brânquias e coração, mas nenhuma alteração foi observada no músculo branco. Concomitantemente, houve um acúmulo significativo de mercúrio nas brânquias, fígado, coração e músculo branco de traíras deste grupo experimental (capítulo III). Entretanto, o músculo branco foi o tecido que menos acumulou o metal o que, por sua vez, pode ter sido a causa da não indução da MT nesse tecido. O grau de indução da MT varia entre as espécies e tecidos. Nesse sentido, Berntssen et al. (2003) também verificaram aumentos significativos no conteúdo de MT em fígado e em rim de salmão do Atlântico alimentados por 4 meses com dieta contendo  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ , sendo que a indução da MT foi mais acentuada nos rins. Vários estudos em diferentes espécies de peixe têm demonstrado que MTs se ligam a íons metálicos e que seus níveis estão correlacionados com os níveis teciduais de metal

(HYLLAND et al., 1992; SCHLENK et al., 1995; OLSVIK et al., 2000). Da mesma forma, os níveis de MT aumentam em relação ao tempo ou a dose após a administração de metais. No entanto, a grande influência dos metais em promover a indução de MT pode variar de acordo com a espécie de peixe, tecido e condições experimentais.

A capacidade de indução das MTs é maior nos tecidos que estão envolvidos na captação, acúmulo e excreção como fígado, rins, brânquias e intestino (CAJARAVILLE et al., 2000). No entanto, suas concentrações podem variar de acordo com a espécie, condições reprodutivas, idade e dieta alimentar (ROESIJADI & ROBINSON, 1994; FILIPOVI & RASPOR, 2003). Diferentes espécies de peixe mostram diferenças nos níveis de MTs. Por isso, algumas espécies são capazes de tolerar altas concentrações de alguns metais comparadas a outras (OLSSON & KILLE, 1997). Aumentos de aproximadamente 30% no conteúdo de metalotioneína no fígado e nas brânquias das traíras alimentadas com matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> provavelmente não foram suficientes para o sequestro do metal que se biomagnificou acentuadamente nestes tecidos. Assim, esse pequeno aumento da MT pode ter contribuído para a redução significativa da relação GSH:GSSG, uma vez que o metal estaria mais disponível para se ligar irreversivelmente a GSH, tornando tais tecidos mais suscetíveis ao estresse oxidativo induzido pelo mercúrio. Por outro lado, aumentos na indução da MT na ordem de 70% no tecido cardíaco das traíras expostas troficamente ao Hg podem ter contribuído para a manutenção dos níveis de GSH e GSSG. No coração, uma menor quantidade do metal estaria disponível para se ligar irreversivelmente a GSH, mantendo a homeostase redox celular e atenuando o estresse oxidativo gerado pela exposição ao Hg.

Huang et al. (2007) avaliaram os níveis de MT em diversos tecidos de carpas (*C. carpio*) expostas ao Hg ou ao Cd por 10 dias e mostraram que o padrão de indução da MT difere de acordo com o metal. Para o Cd, a indução da MT seguiu a ordem brânquias > rim > fígado e para o Hg, rim > fígado > brânquias. Isso implica que a síntese de MT em diferentes órgãos de peixes varia com os diferentes tipos de metais, sendo uma síntese metal-específica. Adicionalmente, estudos realizados em *C. carpio* por Cosson (1994) e De Conto Cinier et al. (1998) mostraram diferenças entre órgãos com relação à indução da MT de modo que a exposição a 1 mg.L<sup>-1</sup> de Cd por uma semana causou um aumento da MT em brânquias, mas nenhum aumento significativo foi observado no fígado. Somente em animais expostos a 0,44 mg.L<sup>-1</sup> de Cd por 115 dias, foi observado um aumento dos níveis de MT no tecido hepático e renal. Assim, pode-se verificar que o tempo de exposição é um fator importante na indução da MT entre os diferentes órgãos. Dessa forma, 30 dias de exposição trófica ao mercúrio não foi suficiente para induzir a MT no músculo branco das traíras, o que provavelmente ocorreria em um maior período de exposição.

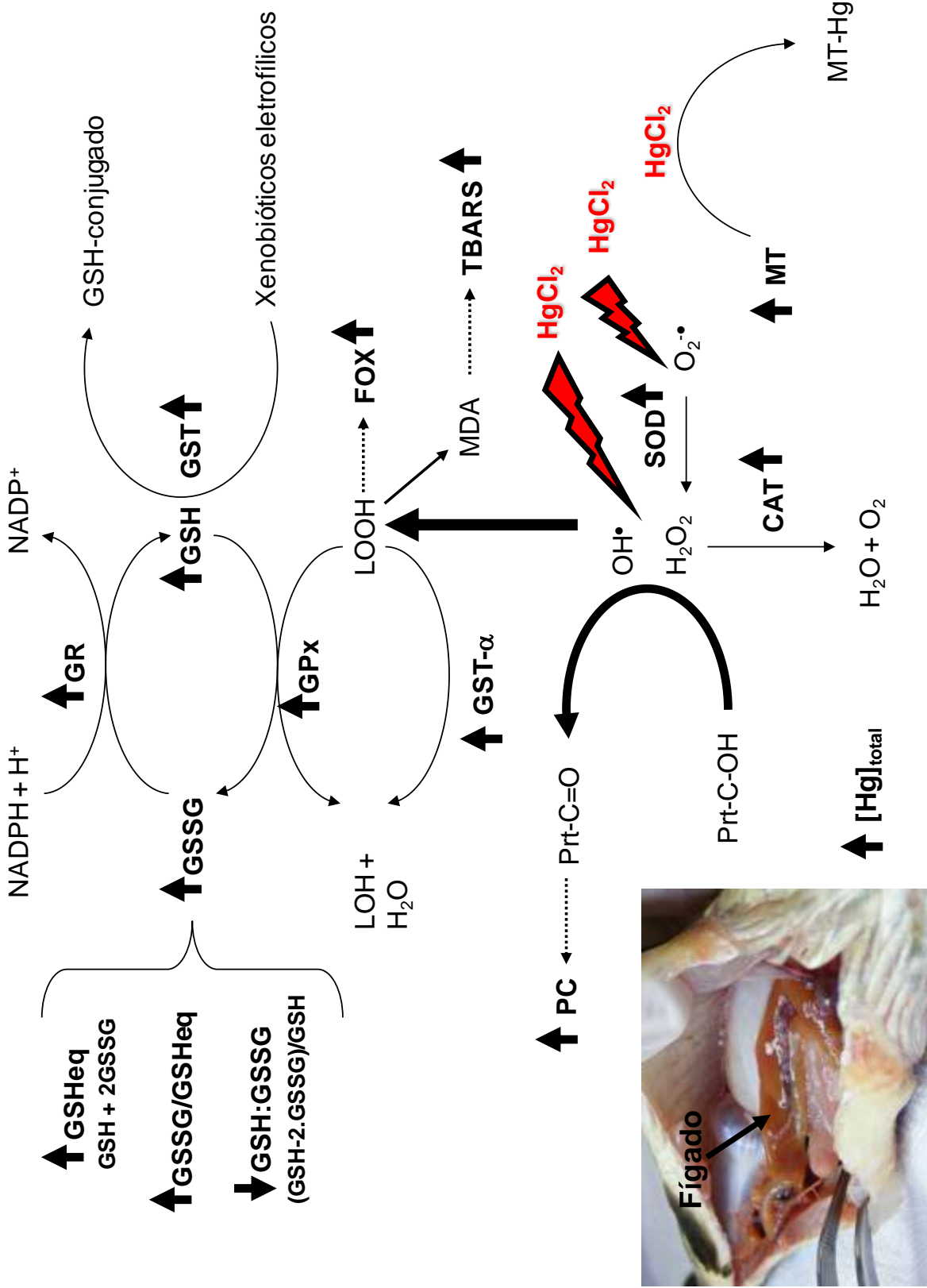
## 5 CONCLUSÕES

Os efeitos da exposição trófica ao Hg sobre os biomarcadores de estresse oxidativo em fígado, brânquias, músculo branco e coração de traíras, *H. malabaricus*, são sumarizados nos esquemas propostos nas figuras 5 a 8.

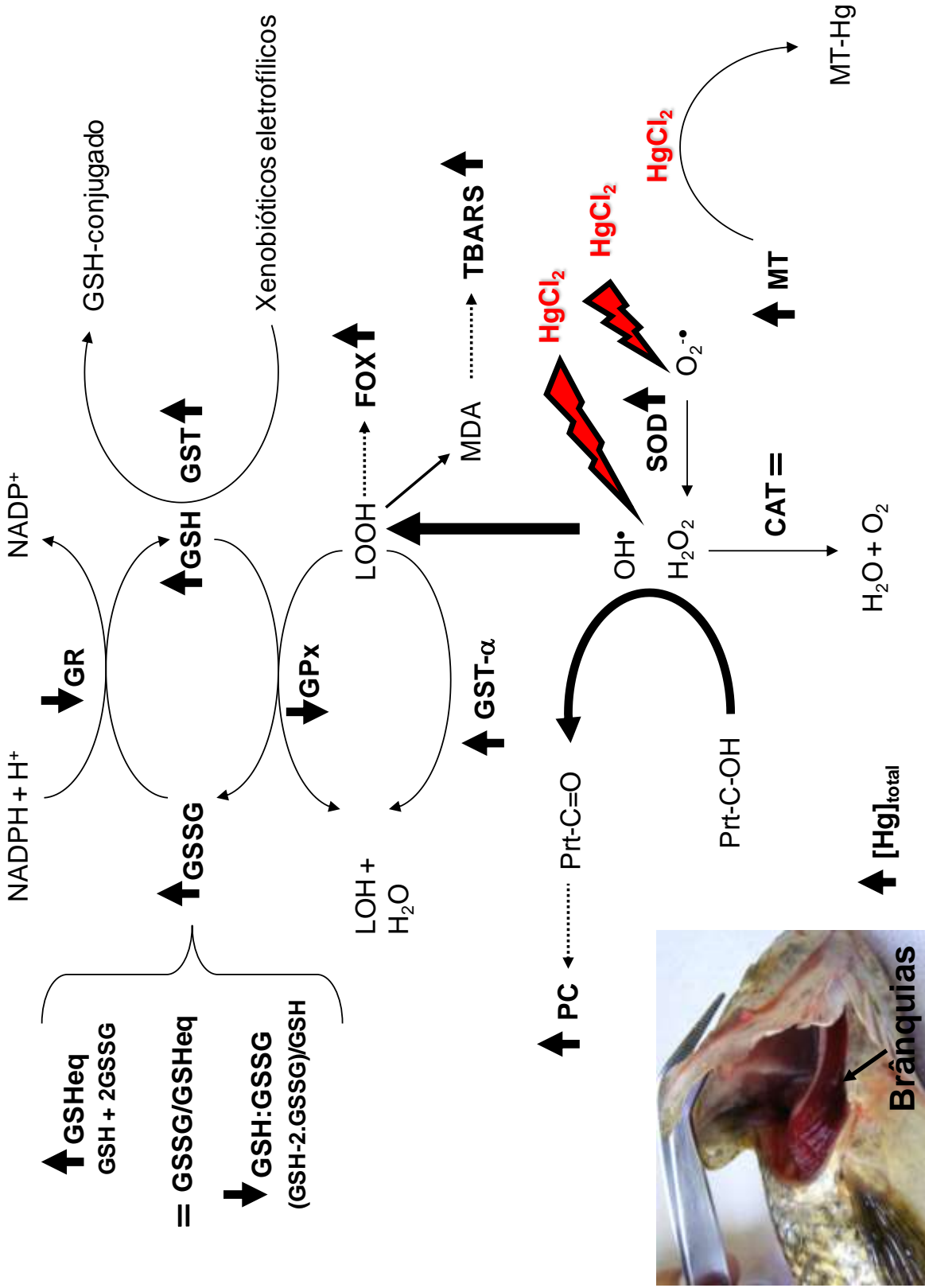
Os resultados apresentados permitem concluir que o mercúrio, mesmo na sua forma inorgânica, em uma exposição trófica e sub-crônica de 30 dias e numa dose sub-letal é um potente indutor de estresse oxidativo em fígado, brânquias e coração de traíra, *H. malabaricus*. O estresse oxidativo induzido pelo Hg foi capaz de comprometer funções das membranas lipídicas e de proteínas essenciais na manutenção da homeostasia celular desses tecidos. Respostas adaptativas, como aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes e no conteúdo de MT, ocorreram na tentativa de neutralizar a sobrecarga de ERO induzida pelo metal, embora não tenham sido suficientes em conter os danos oxidativos. No fígado e nas brânquias o estresse oxidativo foi mais intenso conforme demonstrado pela perda da homeostase redox celular com aumentos nos níveis de GSH e GSSG e diminuições na razão GSH:GSSG. Adicionalmente, nas brânquias foi observada uma redução significativa da atividade da GR que provocou um acúmulo acentuado do conteúdo de GSSG em relação ao tecido hepático. Esta ineficiência da reciclagem da GSSG a GSH fez com que o aumento no conteúdo de GSH fosse insuficiente em dar suporte ao aumento da atividade da GPx, levando a redução de sua atividade. Por outro lado, apesar da exposição trófica ao Hg ter induzido estresse oxidativo no tecido cardíaco, a intensidade desse estresse foi moderado. uma vez que, houve aumentos no conteúdo de GSH e na razão GSH:GSSG, mantendo a homeostase redox dos miócitos, provavelmente devido ao aumento mais pronunciado na indução da MT cardíaca. O músculo branco se mostrou resistente à exposição ao Hg por via trófica, provavelmente devido aos aumentos mais pronunciados nas atividades da GPx e GR em comparação aos outros tecidos analisados.

Assim, foram observadas respostas tecido-específicas relacionadas às defesas antioxidantes e aos danos oxidativos, sendo que o músculo branco foi o tecido mais resistente, não apresentando sinais de perdas na homeostase redox nem danos oxidativos a lipídeos e a proteínas, nem indução da MT. Mesmo exposições sub-crônicas a baixas concentrações de HgCl<sub>2</sub>, por via trófica, podem ser potencialmente prejudiciais à saúde, sobrevivência e a qualidade dos peixes carnívoros, fontes potenciais de recurso alimentar.





**Figura 5** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no fígado de ratas alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostas por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ .



**Figura 6** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas nas brânquias de traíras alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostas por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ .

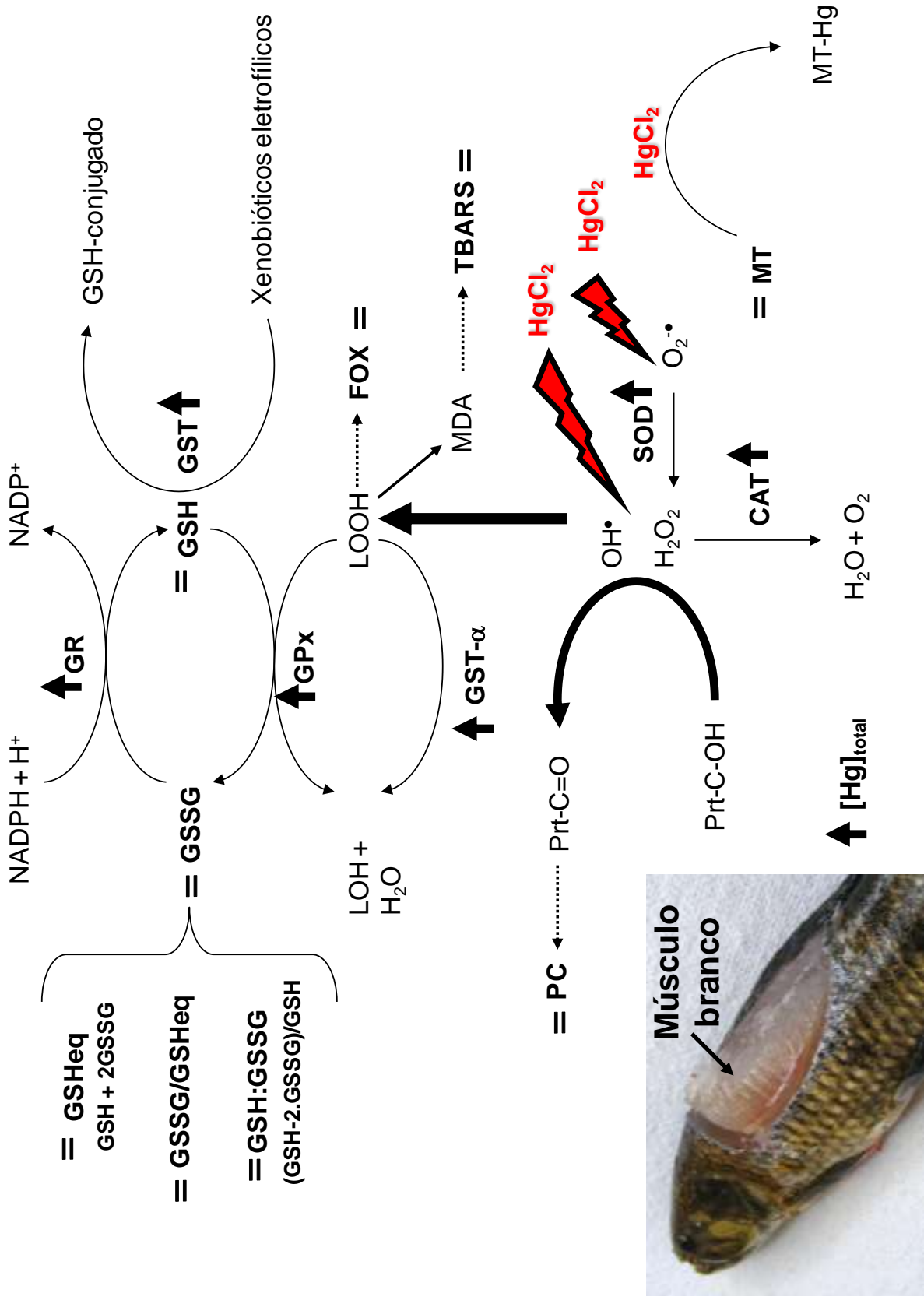
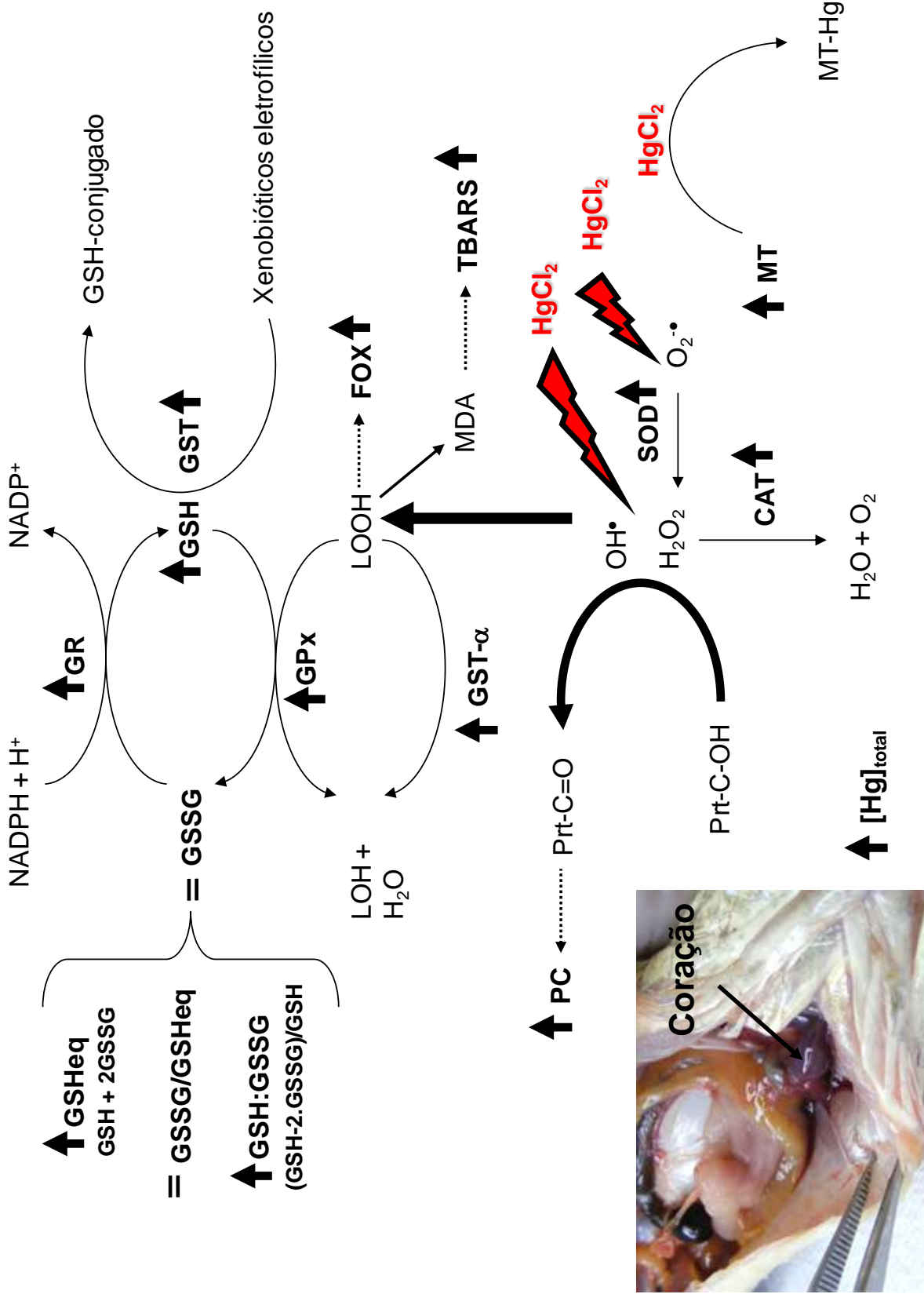


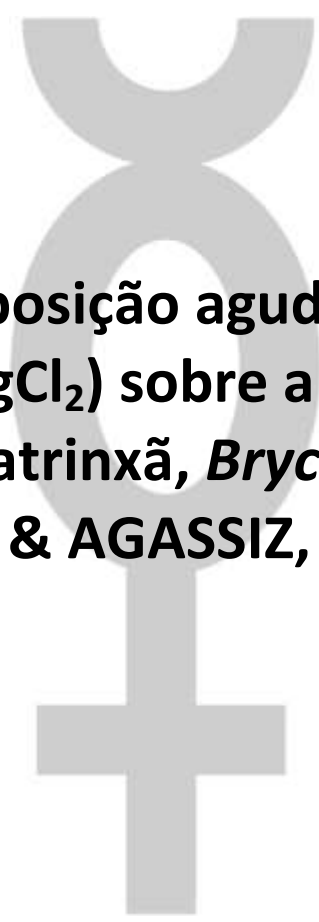
Figura 7 - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no músculo branco de trairas alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostas por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ .



**Figura 8** - Esquema mostrando as principais alterações evidenciadas no coração de traíras alimentadas durante 30 dias com matrinxãs expostos por 96 horas ao  $HgCl_2$ .

## CAPÍTULO VI

**Efeitos da exposição aguda ao mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre a contratilidade cardíaca de matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)**



---

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição aguda ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) na água sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contracção (E-C) do miocárdio isolado de matrinxã *Brycon amazonicus*. Exemplares juvenis, foram divididos em 2 grupos ( $n = 12$ ). Um dos grupos foi utilizado como controle (Ct) e o outro foi exposto por 96 horas a uma concentração nominal e sub-letal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (1/5 da  $\text{CL}_{50}$  96h) em sistema estático ( $\text{HgCl}_2$ ). Após o sacrifício, tiras ventriculares dos peixes de ambos os grupos experimentais foram preparadas para o registro da força de contracção isométrica (Fc), tensão de repouso (RT), dos parâmetros tempo-dependentes (tempos para o pico máximo de tensão - TPT e para 50% de relaxamento - THR), das taxas de contracção ( $d\text{Fc}/d\text{T}$ ) e relaxamento ( $-d\text{Fc}/d\text{T}$ ), da relação força-frequência, da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) e da potenciação pós-pausa, sendo todos os protocolos realizados na presença ou na ausência de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina (RIAN). O  $\text{HgCl}_2$  causou redução significativa ( $p < 0,05$ ) na Fc e na RT (~48%), na  $d\text{Fc}/d\text{T}$  (~48%) e na  $-d\text{Fc}/d\text{T}$  (~51%) e na potenciação após pausas de 30, 60 e 300 s (~10%). Simultaneamente, o  $\text{HgCl}_2$  não alterou os valores absolutos de TPT e THR, porém aumentou significativamente os valores das razões TPT/Fc e THR/Fc devido ao seu efeito inotrópico negativo. O  $\text{HgCl}_2$  ainda reduziu a CBC (~48%) e a frequência de contracção máxima atingida pelas tiras ventriculares (frequência máxima de 96 bpm no grupo  $\text{HgCl}_2$  e de 120 bpm no grupo Ct). O tratamento com RIAN provocou diminuição da Fc, reduziu frequência de contracção máxima, a CBC e aboliu completamente a potenciação pós-pausa em ambos os grupos experimentais. A adição deste alcalóide permitiu inferir que há uma contribuição significativa do retículo sarcoplasmático (RS) para o fornecimento do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador, que supera a participação dos mecanismos transsarcolemais como canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L e trocador NCX atuando no modo reverso. No miocárdio dos matrinxãs do grupo Ct, na frequência cardíaca *in vivo*, o RS representa uma contribuição relativa de cerca de 80% do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador reponsável pelo desenvolvimento da Fc e da CBC. Já para os miócitos dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  essa contribuição relativa foi de cerca de 60%. Assim, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  reduziu significativamente o papel do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  para a contracção tornando-o semelhante ao do influxo sarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  a frequências de estimulação abaixo de 60 bpm para o desenvolvimento da Fc e abaixo de 48 bpm para a manutenção da CBC. Acima de tais frequências o papel do RS parece se sobrepor a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema, porém ainda a um nível proporcionalmente muito menor que aquele observado para o grupo Ct. Por outro lado, apenas no grupo  $\text{HgCl}_2$  a adição da rianodina resultou em redução nos valores absolutos de TPT e THR em todas as frequências de estimulação testadas enquanto que no grupo Ct nenhuma diferença foi observada sugerindo que o metal de alguma forma favorece a atividade da sarcolema, situação não evidenciada quando o RS está funcional e representa o maior contribuição de  $\text{Ca}^{2+}$  à maquinaria contrátil. Os resultados evidenciaram que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  limitou a manutenção da performance cardíaca mesmo na frequência cardíaca fisiológica, reduzindo a Fc, promovendo uma ciclagem de cálcio mais lenta no interior dos miócitos, prejudicando a função do retículo sarcoplasmático e diminuindo a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio. O  $\text{HgCl}_2$  parece ainda apresentar um duplo efeito: a) no RS atua negativamente provocando um vazamento do  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais de rianodina e/ou redução da atividade da SERCA podendo ser este o principal mecanismo responsável pelo efeito inotrópico negativo do metal; b) na sarcolema atua positivamente, favorecendo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L e a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  mais acelerada do citosol pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema e/ou do trocador NCX. Todos esses efeitos, em condições naturais, podem afetar significativamente o sucesso e a sobrevivência da espécie em questão. Considerando que, no ambiente, a presença do Hg pode ocorrer concomitantemente com alterações em outros parâmetros ambientais como, por exemplo, uma reduzida disponibilidade de oxigênio, tal situação imporia uma demanda ainda maior ao coração destes peixes, cujo funcionamento já estaria comprometido pelos efeitos do mercúrio.

## 1 INTRODUÇÃO

Devido à diversidade de regimes aos quais estão submetidos, os vertebrados basais apresentam uma ampla variedade de estratégias fisiológicas e bioquímicas, de adaptações ecológicas, estilos de vida e peculiaridades metabólicas (COSTA, 2003). Essa elevada variabilidade influi diretamente na demanda imposta ao coração desses animais, implicando, conseqüentemente, em uma grande diversidade morfológica e de adaptações fisiológicas do sistema cardiovascular (MUÑOZ-CHAPULI & HAMLETT, 1996), inclusive no acoplamento excitação-contração (E-C).

O acoplamento E-C é a seqüência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração muscular. A principal diferença entre ectotérmicos e mamíferos no que concerne ao acoplamento E-C está relacionada à origem do  $\text{Ca}^{2+}$  que chega as miofibrilas (TIBBITS et al., 1992). Segundo DRIEDZIC & GESSER (1994), os mecanismos contráteis, ou seja, a interação acto-miosínica e sua regulação pelo  $\text{Ca}^{2+}$  parecem ser similares nos diferentes grupos de vertebrados. Porém, as distinções anatômicas e estruturais existentes entre os corações de peixes e mamíferos formam a base de importantes diferenças fisiológicas, particularmente quanto à origem do  $\text{Ca}^{2+}$  a ser utilizado pelo aparato contrátil (TIBBITS et al., 1991). Tais diferenças incluem miócitos de pequeno tamanho (1 a 12,5  $\mu\text{m}$ ) em relação ao dos mamíferos (10 a 25  $\mu\text{m}$ ); limitado desenvolvimento anatômico do retículo sarcoplasmático (RS); arranjo periférico das miofibrilas e ausência de túbulos T (FARREL & JONES, 1992).

O miocárdio de teleósteos contém a maior parte dos componentes celulares envolvidos no acoplamento E-C do miocárdio de mamíferos como canais de cálcio lentos (canais do tipo L), elementos contráteis, bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal. Adicionalmente, algumas espécies de peixes possuem estoques de cálcio no retículo sarcoplasmático (RS). A ativação do acoplamento E-C ocorre como resposta a um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol do miócito (TIBBITS et al., 1992). Esse aumento depende da mobilização deste íon que pode ser proveniente do influxo através da sarcolema, por meio de canais voltagem-dependentes do tipo-L e do trocador NCX, atuando em seu modo reverso e também de reservas intracelulares como o RS (HOVE-MADSEN et al., 2001).

O influxo de cálcio nos miócitos através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes do tipo-L (lentos), presentes na sarcolema, constituem o componente essencial para o acoplamento E-C nos miócitos de vertebrados. Esses canais por serem sensíveis às dihidropiridinas (DHP) também são denominados como receptores de DHP e caracterizados pelo tempo relativamente longo que levam para se abrir e que permanecem abertos, sendo responsáveis pelo platô característico dos potenciais de ação da musculatura cardíaca. (BERS, 2001; TIBBITS et al., 1992).

Segundo Fabiato (1983), em mamíferos, o influxo transsarcolemal do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , através da troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e de canais voltagem-dependentes do tipo L, dispara a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS, através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  denominados receptores de rianodina (RyR), fenômeno chamado de liberação de cálcio cálcio-induzida. Apesar da magnitude do influxo transsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  variar amplamente entre as diversas espécies de mamíferos estudadas, a maioria dos estudos indica que este é insuficiente para desencadear a contração cardíaca (BERS, 2001; CHAPMAN, 1983). Assim, o RS é a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração no coração dos mamíferos já estudados (WIER, 1990).

Nos vertebrados ectotérmicos, o desenvolvimento do RS varia amplamente entre as espécies. Em comparação aos mamíferos, os anfíbios e a maioria dos peixes teleósteos estudados apresentam RS bastante esparso. Na maioria dos teleósteos, o RS reduzido parece não contribuir ativamente com a contração, sendo esta última devida exclusivamente ao influxo de cálcio através da sarcolema (DRIEDZIC & GESSER, 1994; EI-SAYEB & GESSER, 1989; SANTER & COBB, 1972; TIBBITS et al, 1990). Segundo Harwood et al. (2000), 95% do cálcio ativador em mamíferos é liberado pelo RS e em peixes o influxo de cálcio pela sarcolema corresponde a 85% do cálcio ativador. Entretanto, o músculo cardíaco de outras espécies de peixes, em contraste, tem um RS bem desenvolvido, sugerindo que o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado teria participação em determinado grau na contração (DRIEDZIC & GESSER, 1994; EI-SAYEB & GESSER, 1989; HOVE-MADSEN et al., 2001; SANTER, 1985; TIBBITS et al, 1990). Espécies como o atum (*Thunnus spp*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimatá (*Prochilodus lineatus*) o RS, sob determinadas condições, pode atuar como a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração (SHIELS et al., 1999; SHIELS & FARRELL, 2000; ANELLI-Jr., 2002; RIVAROLI et al., 2006). Para o matrinxã (*Brycon amazonicus*), espécie utilizada no presente estudo, contrações pós-pausa sensíveis a rianodina foram observadas em preparações de músculo ventricular isolado (OLLE, 2007) está relacionado com a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (BERS, 1985).

O relaxamento muscular ocorre com a redução da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol, através do efluxo pela SL  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e por meio do NCX e pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente no RS, conhecida como cálcio-ATPase-sarco(endo)plasmática ou SERCA (TIBBITS et al., 1992). No coração de mamíferos, a SERCA e o NCX são os principais mecanismos para reduzir a concentração citosólica de cálcio a fim de induzir o relaxamento máximo (BERS et al., 1989). Já os peixes, por apresentarem um RS relativamente menos desenvolvido e uma maior razão superfície/volume, diferem dos mamíferos em termos da contribuição relativa dos mecanismos para a movimentação de  $\text{Ca}^{2+}$  também no relaxamento cardíaco. Nos vertebrados basais, o  $\text{Ca}^{2+}$  é removido do citosol durante o relaxamento cardíaco basicamente através do NCX e da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal (THOMAS et al., 1996), o primeiro constituindo-se no principal mecanismo em teleósteos (DRIEDZIC & GESSER, 1994; FARRELL et al., 2003; TIBBITS et al., 1991).



Embora haja um grande volume de dados disponíveis na literatura sobre a regulação e manutenção do processo de acoplamento E-C em mamíferos, os estudos em peixes, incluindo aqueles com abordagem em nível celular e/ou molecular, ainda estão limitados a um número muito reduzido de espécies (BLATTER et al., 1997; FAY & POPPER, 2000; TIBBITS et al., 2002; VORNANEN et al., 2002), particularmente frente à exposição à xenobióticos, presentes de modo cada vez mais crescente e freqüente nos ecossistemas aquáticos. A capacidade do músculo cardíaco em manter seu desempenho frente a diferentes condições fisiológicas é uma das mais importantes características que permitem os vertebrados sobreviverem em condições extremas (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Ajustes no débito cardíaco em resposta a xenobióticos, executados por alterações no volume sanguíneo e/ou na freqüência cardíaca, são extremamente importantes, onde o volume cardíaco é determinado pela regulação da contratilidade miocárdica, a qual depende da regulação intracelular de cálcio em cada batimento (BERS, 2001; LEWATOWSKI & PYTKOWSKI, 1987).

A ação tóxica do Hg sobre o aparelho cardiovascular é de natureza complexa, envolvendo fatores diversos (VASSALO et al., 1996) e está relacionada com o transporte de  $Ca^{2+}$  e com a manutenção da sua concentração no interior das células (SOUZA de ASSIS et al., 2003; MASSARONI et al., 1995; MOREIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 1994; VASSALO et al., 1999), motivo pelo qual se torna importante o conhecimento dos efeitos do Hg sobre o acoplamento E-C no miocárdio de peixes. Os efeitos tóxicos do Hg sobre o aparelho cardiovascular incluem o risco de doença cardíaca coronariana, hipertensão, infarto do miocárdio, inotropismo e cronotropismo negativos e efeito arritmogênico (GUALLAR et al., 2002; MACHADO et al., 2007; MASSARONI et al., 1995; RHEE & CHOI, 1989; SU & CHEN, 1979). Tais efeitos são intensos e podem ser responsabilizados por óbitos de pacientes intoxicados agudamente (VASSALO et al., 1996). Adicionalmente, a literatura aponta para efeitos antagônicos do Hg sobre o sistema cardiovascular que parecem depender da dose e do tempo de exposição.

Fatores como a plasticidade da função cardíaca em peixes, bem como regimes ambientais de ampla variação e a constante exposição a poluentes impõem demandas únicas sobre a regulação da contratilidade cardíaca e, então, ao acoplamento E-C. Pelo fato da maioria dos estudos existentes até o momento terem sido desenvolvidos com peixes de ambiente temperado, torna-se imprescindível o conhecimento dos mecanismos intracelulares envolvidos com a regulação do  $Ca^{2+}$  no músculo cardíaco de peixes tropicais. Adicionalmente, os efeitos da exposição a poluentes de grande relevância ecológica como o mercúrio são desconhecidos, aumentando a importância de estudos desta natureza. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações, frente uma exposição aguda e sub-letal ao mercúrio inorgânico ( $HgCl_2$ ), no acoplamento E-C no miocárdio isolado de matrinxã, uma espécie nativa e amplamente distribuída no território brasileiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Exemplares juvenis e de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram adquiridos do Centro de Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros com recirculação de água de cloração (pH 7,0-7,5; DO<sub>2</sub> 6,5-7,3 mg.L<sup>-1</sup>; dureza 48-56 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade 40-43 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e condutividade 120-128 µS.cm<sup>-1</sup>), aeração constante (condições normóxicas, P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 45 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante o período de aclimação, os matrinxãs foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes com 40% de proteína (Pira Alevinos - Guabi Nutrição Animal<sup>®</sup>).

### 2.2 Desenho Experimental

Antes do início do experimento, os matrinxãs ( $W_T = 139,3 \pm 8,6$  g;  $L = 21,8 \pm 0,60$  cm) foram aleatoriamente divididos em dois grupos de doze peixes cada um: grupo controle (Ct), em que os peixes permaneceram em água sem mercúrio e grupo exposto ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) na concentração nominal e sub-letal de 0,15 mg.L<sup>-1</sup> ou ppm de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (~1/5 da CL<sub>50</sub> 96 horas). Os peixes foram expostos individualmente em sistema estático mantendo a proporção de 1,0 g de peixe por litro de água. Os detalhes da exposição e da escolha da dose testada foram descritos no Capítulo III.

### 2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos adotados por BAILEY & DRIEDZIC (1990), descritos a seguir.

Os peixes de ambos os grupos experimentais foram sacrificados por meio de secção medular por transecção da coluna espinal em conformidade com as normas da "American Veterinary Medical Association" (AVMA, 2001) e imediatamente pesados. O coração foi removido cirurgicamente e colocado em solução fisiológica gelada própria para teleósteos de água-doce,

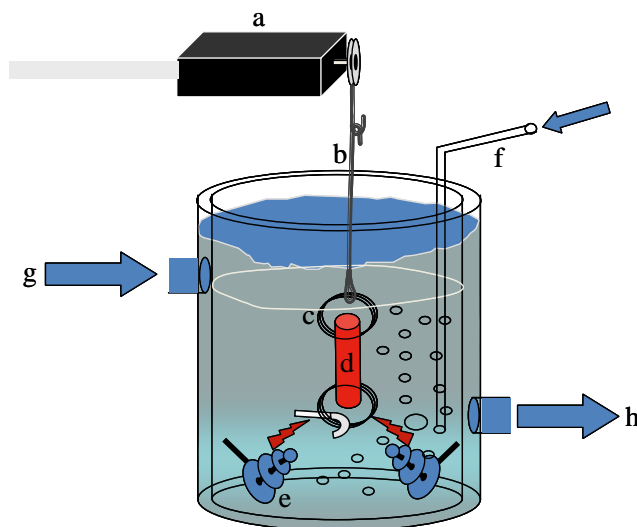
com a seguinte composição: 125,0 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 0,94 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1,0 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30,0 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de glicose. A essa solução foi borbulhada uma mistura carbogênica (2% CO<sub>2</sub> e 98% O<sub>2</sub>) a 25°C por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, o pH final da solução foi acertado para 7,2.

Após a dissecação do coração (remoção do o bulbo arterioso e átrio), o ventrículo foi pesado ( $W_v$ ), para determinação da massa ventricular relativa (MVR) que foi expressa em porcentagem ( $W_v/W_T \times 100$ ). Em seguida, foram preparados anéis ventriculares de largura de aproximadamente 1-2 mm através do corte transversal do ventrículo. O ápice do ventrículo foi desprezado para diminuir a probabilidade de ocorrência de contrações espontâneas das preparações no decorrer dos experimentos.

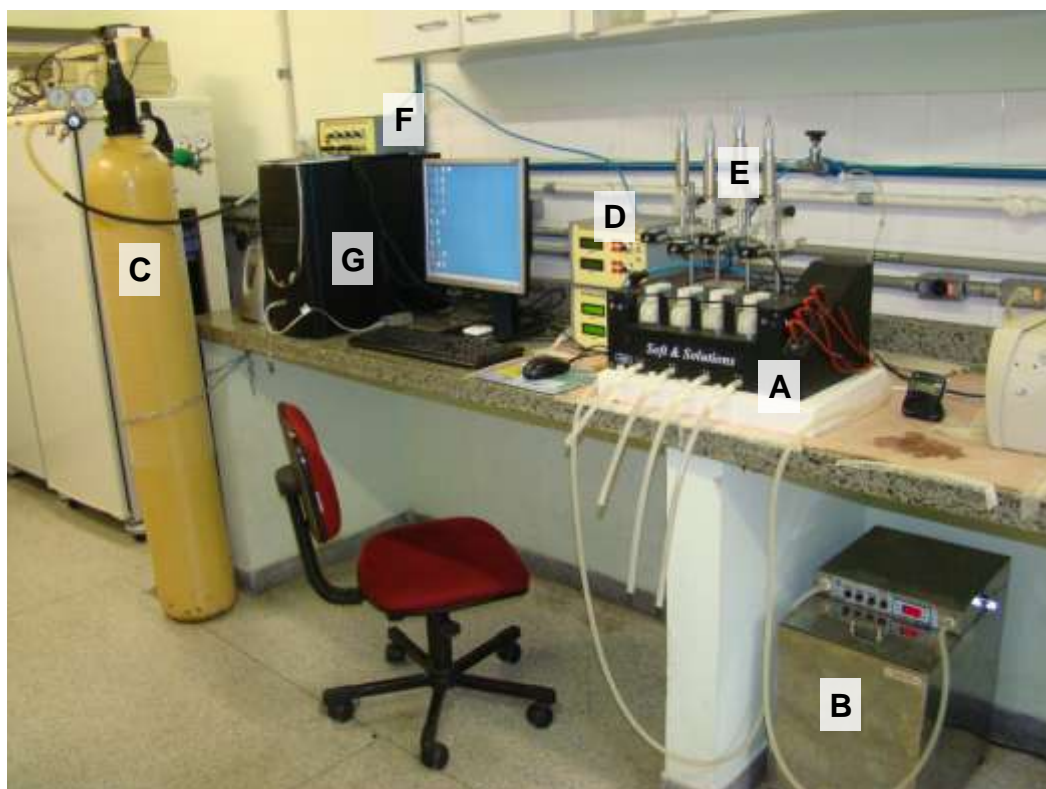
Os anéis ventriculares foram então cortados ao meio para a obtenção de pares de tiras ventriculares. As tiras tinham entre 1 e 2 mm de largura de acordo com o sugerido por Shiels et al. (2002). De acordo com esses autores, as preparações multicelulares devem ser finas o bastante para garantir uma difusão adequada de oxigênio do meio externo até o seu interior, evitando hipóxia das fibras mais internas e, por conseguinte, alteração na tensão isométrica desenvolvida pelas tiras ventriculares. A massa média das tiras ventriculares ficaram em torno de  $2,90 \pm 0,27$  mg.

As extremidades das tiras foram cuidadosamente presas a duas pequenas espirais metálicas e transferidas para um banho contendo 30 mL de solução fisiológica termostatizada a 25°C, dotado de borbulhamento constante de mistura carbogênica. Uma extremidade da tira foi fixada, por meio de uma das espirais metálicas, a um gancho construído na parte terminal de um eletrodo de estimulação de platina. A espiral metálica da outra extremidade foi presa a um fio de aço conectado a um gancho metálico que, por sua vez, foi acoplado a um transdutor de força isométrica (LETICA Scientific Instruments, Espanha). A figura 1 mostra o esquema detalhado da preparação.

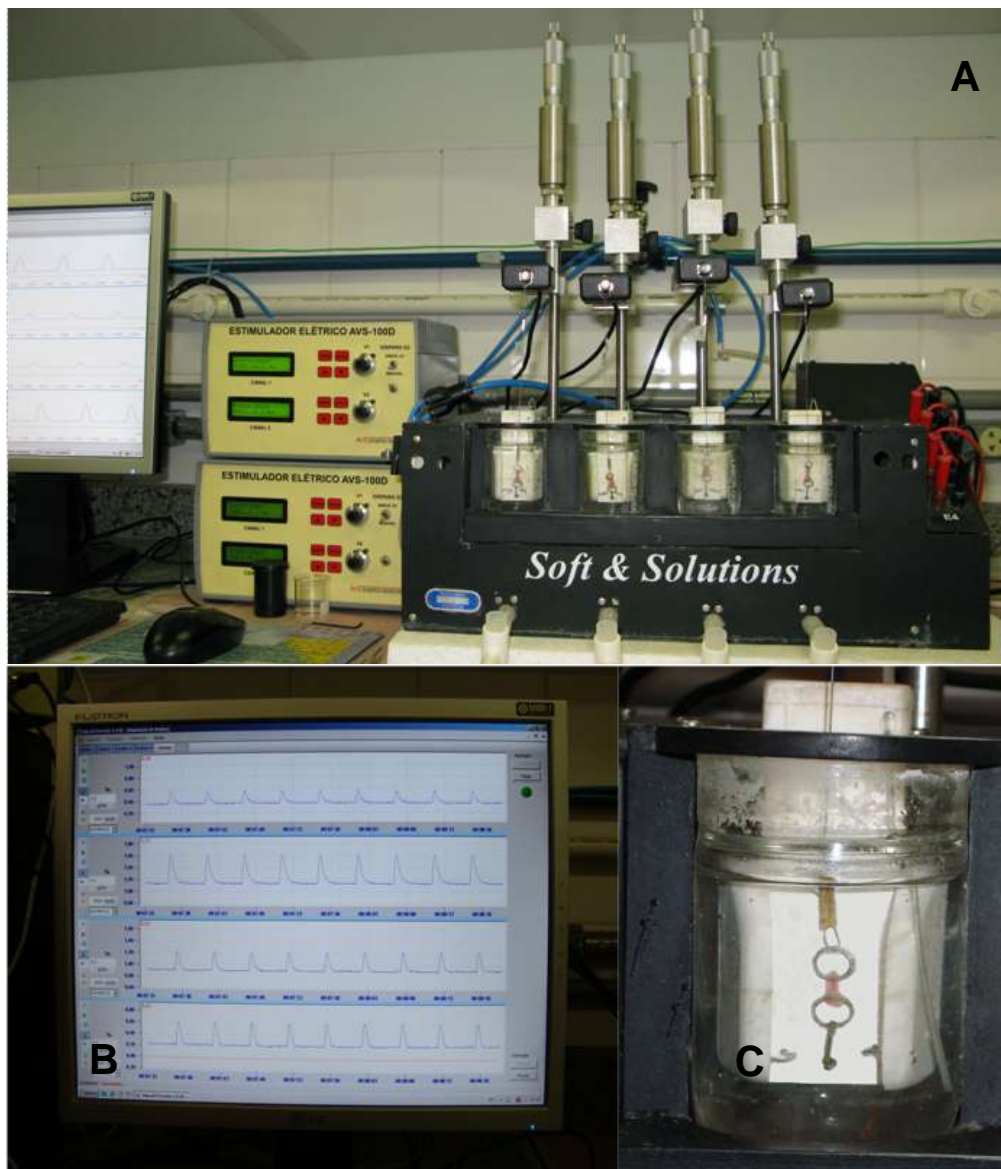
Os eletrodos de estimulação de platina foram acoplados a estimuladores AVS-100D (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP), os quais geram pulsos elétricos com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior àquela necessária para que se que atinja o limiar da resposta mecânica (~90 V), permitindo assim a estimulação elétrica das tiras para o desenvolvimento da tensão isométrica a diferentes taxas de estimulação. Os transdutores de força isométrica foram acoplados a um amplificador AECAD 0408 (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP) conectado a um computador para que os registros das tensões isométricas pudessem ser efetuados pelo software AQCAD - Soft & Solutions (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP) (Figuras 2 e 3).



**Figura 1** - Esquema da cubeta experimental: **a.** transdutor de força; **b.** fio de fixação e estiramento da preparação; **c.** argola metálica; **d.** tira ventricular; **e.** eletrodo de estimulação; **f.** entrada de mistura carbogênica; **g.** entrada de água para termostatar a cubeta; **h.** saída de água da cubeta.



**Figura 2** - Equipamentos utilizados ("setup" experimental) para os experimentos *in vitro* no presente estudo: **A:** banho com quatro cubetas; **B:** banho termostático; **C:** cilindro de mistura carbogênica; **D:** estimuladores elétricos; **E:** transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; **F:** amplificador de força; **G:** sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.



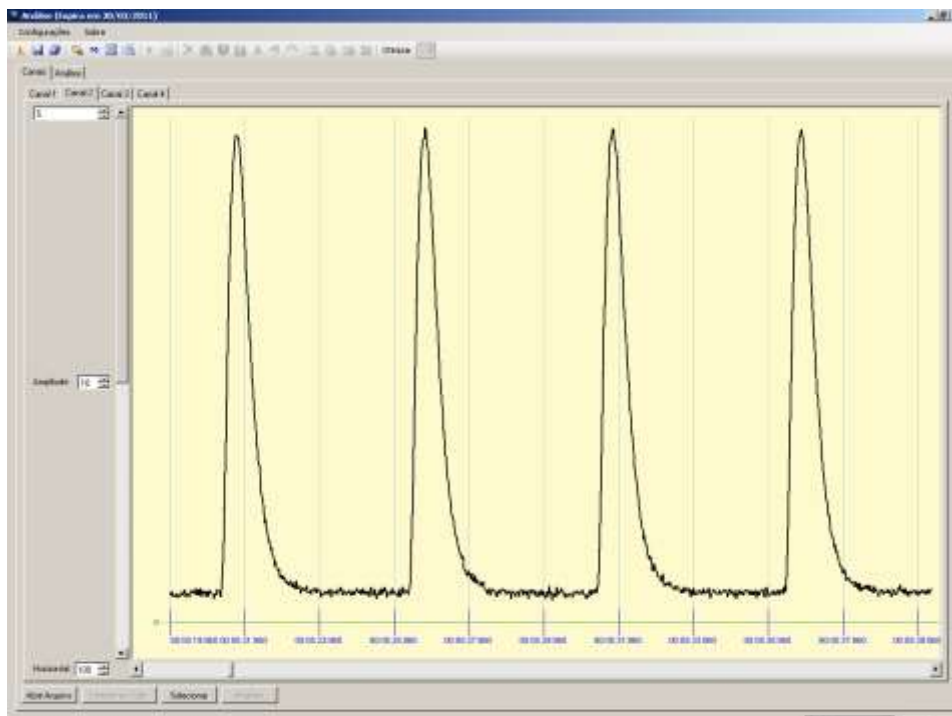
**Figura 3** - Detalhes do set experimental (A) e dos registros de força de contração isométrica (B) e da cubeta com uma tira ventricular (C).

As tiras ventriculares foram estimuladas a uma frequência constante de 0,2 Hz (2 pps ou 12 bpm) e estiradas, utilizando-se micromanipuladores, para aumentar a distância entre o transdutor de força isométrica e o gancho de fixação do eletrodo de platina. O estiramento foi realizado até que uma relação constante entre o comprimento da preparação e o pico de tensão pudesse ser obtida seguindo a lei de Frank-Starling, ou seja, a força de contração cardíaca está diretamente relacionada ao grau de estiramento da fibra miocárdica (ALLEN & KENTISH, 1985). Dessa forma, a tensão máxima foi atingida a 0,2 Hz e seguiu-se um período de estabilização do tecido cardíaco de 20 a 30 minutos. Após a estabilização, os diferentes protocolos experimentais, descritos a seguir, foram realizados.

## 2.3 Protocolos Experimentais

### 2.3.1 Efeito do tempo

As tiras ventriculares foram mantidas a 12 bpm na temperatura de aclimação (25°C) por um período de 40 minutos, durante o qual a força isométrica de contração ( $F_c$ ) foi registrada ininterruptamente para avaliar a possível ocorrência de sua deterioração no decorrer do período experimental.

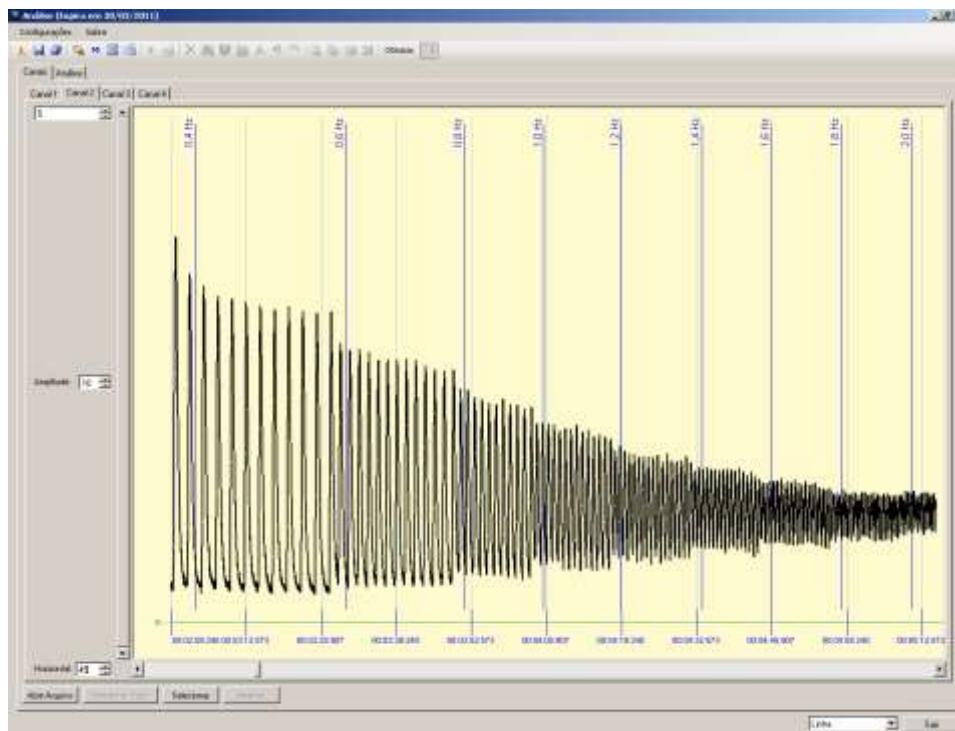


**Figura 4** - Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, na frequência de estimulação de 0,2 Hz ou 12 bpm.

### 2.3.2 Aumento da frequência de estimulação (relação força-freqüência)

Este protocolo foi realizado com o objetivo de determinar a capacidade do miocárdio dos peixes controles e expostos ao Hg em manter o acoplamento E-C frente a incrementos da freqüência de contração. As tiras ventriculares foram submetidas a incrementos progressivos de 0,2 Hz na freqüência de estimulação partindo-se da freqüência inicial de 12 bpm, até que os registros de se tornassem irregulares. Essa relação força-freqüência permite avaliar o

desenvolvimento da força isométrica de contração do miocárdio desde frequências sub-fisiológicas até supra-fisiológicas. Foram consideradas frequências de estimulação máximas aquelas em que 80% das tiras ventriculares contraíram de forma regular.



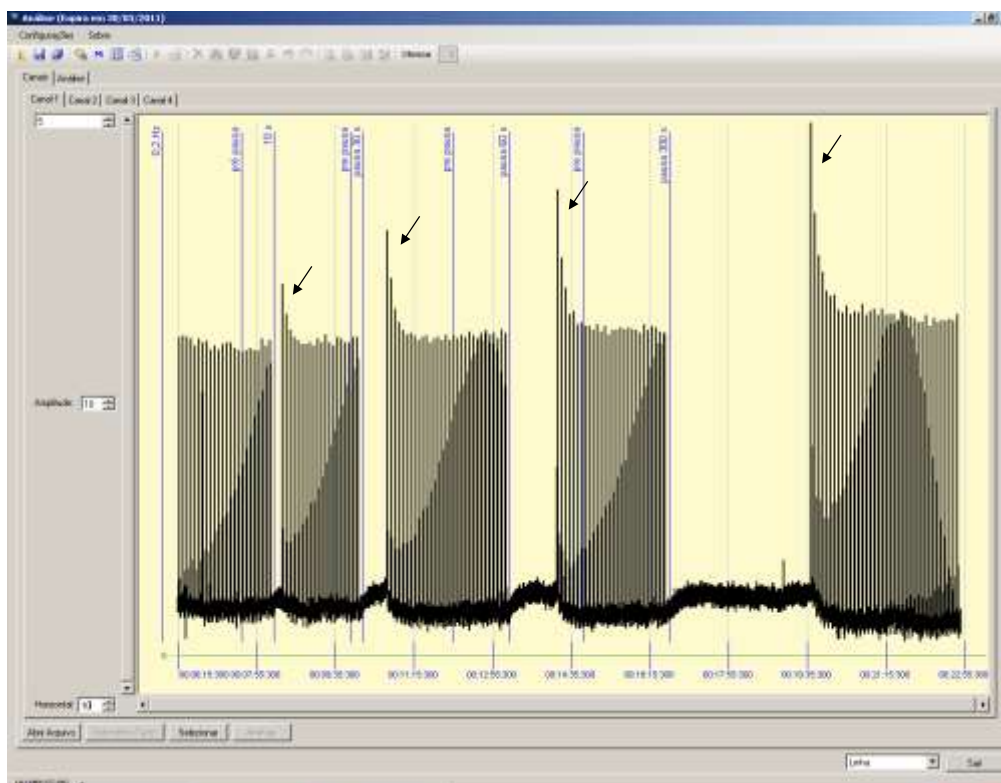
**Figura 5** - Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrixã, *B. amazonicus*, em diferentes frequências de estimulação elétrica.

### 2.3.3 Tensão pós-reposo

Este protocolo foi conduzido com o objetivo de fornecer informações sobre a capacidade de armazenamento intracelular de cálcio durante o período de repouso ou pausa diastólica prolongada e não fisiológica.

Após a estabilização, a tira ventricular foi estimulada a uma taxa constante (12 bpm) durante 5 minutos. Seguiu-se então um período de repouso de 10, 30, 60 e 300 segundos, após o qual a tira foi novamente estimulada a 0,2 Hz, sendo que a primeira contração registrada após a primeira estimulação foi considerada a tensão pós-reposo, como pode ser observado na figura 6. A tensão pós-reposo foi considerada como uma porcentagem da última contração

precedente ao período de repouso, permitindo assim que fossem verificadas possíveis alterações na força de contração após as pausas diastólicas.



**Figura 6** - Registros típicos da força de contração isométrica desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, após estabilização a 0,2 Hz e suas respectivas potenciações (setas) após pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 segundos.

### 2.3.4 Efeito da rianodina

Com o objetivo de determinar a importância funcional do retículo sarcoplasmático (RS) nos matrinxãs controles e expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , os protocolos experimentais descritos acima em 2.3.1, 2.3.2 e 2.3.3 foram repetidos na presença de rianodina (RIAN). Após a estabilização das tiras ventriculares, os banhos receberam  $10 \mu\text{M}$  de rianodina ( $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_9$  - Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 30 minutos antes do início dos protocolos experimentais. Assim, além dos grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ , foram formados os grupos Ct+RIAN e  $\text{HgCl}_2$ +RIAN ( $n=12$  em cada um dos 4 grupos experimentais).

A rianodina é um alcalóide neutro retirado da planta *Ryania speciosa* (JONES et al., 1979) e se liga específica e irreversivelmente aos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Quando



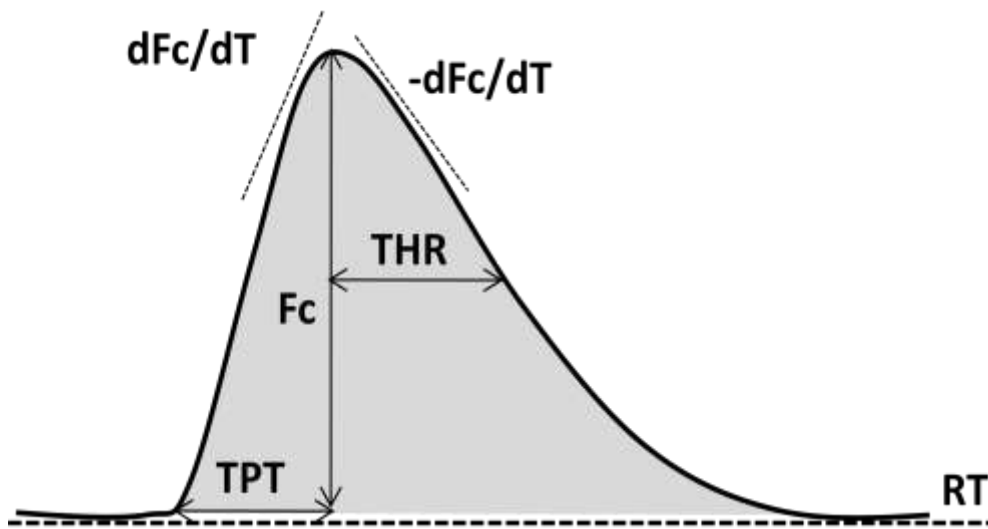
utilizada em concentrações micromolares (10 a 300  $\mu\text{M}$ ), provoca uma diminuição da condutância desses canais de  $\text{Ca}^{2+}$  bloqueando-os e, assim, inibindo a função do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aprato contrátil do músculo cardíaco (CORONADO et al., 1994). A rianodina, na concentração utilizada no presente estudo (10  $\mu\text{M}$ ), tem sido amplamente utilizada para o teste da importância funcional do RS no acoplamento E-C de diversos vertebrados, inclusive peixes (GESSER, 1996; HOVE-MADSEN, 1992; THOMAS et al., 1996; TIBBITS et al., 1991; VORNANEN, 1996).

## 2.4 Análise dos Resultados

### 2.4.1 Forma de apresentação dos dados

Todos os protocolos experimentais foram aplicados para os peixes de ambos os grupos experimentais e tiveram um n mínimo de 10. Os registros foram arquivados em um computador, onde os mesmos foram posteriormente analisados pelo software ANCAD (Soft & Solutions/Solução Integrada Ltda., São Paulo, Brasil).

Ao término de cada protocolo, as tiras ventriculares eram levemente secas em papel de filtro para a determinação do peso úmido da porção da tira responsável pelas contrações isométricas registradas. O comprimento da porção contrátil das tiras ventriculares também foi medido. Tanto a massa quanto o comprimento das tiras ventriculares foram usados no cálculo da área de seção transversal (CSA – “cross-sectional area” -  $\text{mm}^2$ ), assumindo-se a densidade muscular de  $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$  (LAYLAND et al, 1995). A força de contração isométrica de cada tira ventricular ( $F_c$  -  $\text{mN.mm}^{-2}$ ) foi calculada pela diferença entre os valores do pico da tensão isométrica e da tensão de repouso (RT – “resting tension” -  $\text{mN.mm}^{-2}$ ) dividida pela CSA da respectiva tira. Os parâmetros tempo-dependentes foram analisados em todos os protocolos experimentais e expressos em valores absolutos como TPT (“time to peak tension” – ms) e THR (“time to half relaxation” – ms) e através das relações TPT/ $F_c$  e THR/ $F_c$  ( $\text{ms. mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ). Nos registros também foram analisadas as taxas de contração ( $dF_c/dT$  - derivada máxima da contração -  $\text{mNmm}^{-2}.\text{ms}^{-1}$ ) e de relaxamento ( $-dF_c/dT$  - derivada máxima do relaxamento -  $\text{mNmm}^{-2}.\text{ms}^{-1}$ ) das tiras ventriculares. A fig. 5 apresenta todas as variáveis analisadas em cada protocolo. O produto do pico da força de contração isométrica pela frequência de estimulação foi usado para determinar o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBP -  $\text{mN.mm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ) de acordo com MATIKAINEN & VORNANEN (1992). Vale ressaltar que tal medida é uma apenas uma estimativa do funcionamento do coração enquanto “bomba” uma vez que leva em consideração apenas a tensão isométrica desenvolvida pelas tiras cardíacas isoladas.



**Figura 7** - Variáveis medidas no registro de força de contração isométrica nos diferentes protocolos experimentais. Fc: força de contração isométrica; TPT: tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento; dFc/dT: taxa de contração; -dFc/dT: taxa de relaxamento; RT: tensão de repouso.

#### 2.4.2 Tratamento estatístico dos dados

Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. Os seguintes procedimentos foram adotados no presente estudo:

- A Análise de variância (ANOVA) one-way, complementada pelo teste de Dunnett de comparações múltiplas, para verificar a existência de possíveis diferenças estatisticamente significativas entre os valores de um mesmo protocolo experimental tendo como referência de controle os valores iniciais de cada protocolo (GraphPad Instat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- Teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade foi realizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes de diferentes grupos experimentais (Ct e HgCl<sub>2</sub>) (GraphPad Instat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito do tempo

Os valores médios da Fc desenvolvida pelas tiras ventriculares do músculo cardíaco isolado de *B. amazonicus*, estimuladas a 12 bpm ao longo do tempo experimental, nos grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN são mostrados na **Tabela 1**. Nesta tabela também estão apresentados os valores de TPT, THR, TPT/Fc, THR/Fc, RT, dFc/dT e -dFc/dT para os respectivos grupos no período de 40 minutos.

Em relação ao início do protocolo experimental (tempo 0 min), não foi observada deterioração da Fc e da RT ao longo em todos os grupos experimentais. A análise estatística dos resultados também indicou que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros tempo-dependentes analisados durante o período experimental para nenhum dos grupos.

Em relação ao grupo controle, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> reduziu a Fc e a RT das tiras ventriculares em aproximadamente 48% em todos os tempos analisados. A adição de rianodina também reduziu significativamente a RT somente no grupo Ct e a Fc nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> não havendo diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.

Os valores absolutos dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. No entanto, ao se compararem os valores das razões entre TPT/Fc ou THR/Fc, foram observados aumentos significativos em tais razões no grupo HgCl<sub>2</sub> (elevações médias de 84 e 92%, respectivamente), considerando-se os mesmos períodos de exposição. A rianodina aumentou significativamente o TPT/Fc e THR/Fc nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> não havendo diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Por outro lado, a rianodina reduziu significativamente o TPT e o THR apenas no grupo HgCl<sub>2</sub>, o que resultou em diferenças significativas nos valores de THR dos grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN em todos os tempos analisados.

Tanto a exposição ao HgCl<sub>2</sub> e como a adição de rianodina reduziram as taxas de contração (dFc/dT) e de relaxamento (-dFc/dT) as tiras ventriculares em todos os tempos analisados sendo que entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN diferenças significativas não foram observadas para tais parâmetros.

**Tabela 1:** Valores absolutos da Fc e RT, do TPT e THR, das relações TPT/Fc e THR/Fc e das taxas dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus* do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 12 bpm, na ausência ou na presença de 10 µM de rianodina. Valores são médias ± E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.

Tempo (min)	Grupos Experimentais			
	Ct	HgCl <sub>2</sub>	Ct+RIAN	HgCl <sub>2</sub> +RIAN
<b>Fc (mN.mm<sup>-2</sup>)</b>				
0	5,58 ± 0,28	2,87 ± 0,20 *	1,78 ± 0,34 #	1,58 ± 0,32 @
10	5,50 ± 0,27	2,83 ± 0,20 *	1,76 ± 0,34 #	1,54 ± 0,31 @
20	5,42 ± 0,30	2,77 ± 0,19 *	1,72 ± 0,35 #	1,48 ± 0,29 @
30	5,28 ± 0,35	2,73 ± 0,18 *	1,71 ± 0,34 #	1,43 ± 0,28 @
40	5,12 ± 0,33	2,70 ± 0,18 *	1,64 ± 0,33 #	1,40 ± 0,27 @
<b>RT (mN.mm<sup>-2</sup>)</b>				
0	7,50 ± 0,57	3,65 ± 0,49 *	4,68 ± 0,50 #	3,51 ± 0,48
10	6,94 ± 0,57	3,58 ± 0,51 *	4,70 ± 0,50 #	3,53 ± 0,47
20	6,75 ± 0,55	3,48 ± 0,50 *	4,71 ± 0,52 #	3,54 ± 0,46
30	6,52 ± 0,55	3,39 ± 0,52 *	4,72 ± 0,53 #	3,54 ± 0,45
40	6,40 ± 0,53	3,34 ± 0,50 *	4,70 ± 0,55 #	3,54 ± 0,43
<b>TPT (ms)</b>				
0	373,20 ± 15,84	342,51 ± 4,30	317,42 ± 19,11	284,18 ± 14,36 @
10	378,14 ± 18,15	341,52 ± 5,50	312,93 ± 15,65	275,30 ± 12,71 @
20	374,97 ± 19,17	346,92 ± 5,97	314,17 ± 16,77	282,40 ± 12,30 @
30	376,51 ± 17,99	353,17 ± 6,69	309,73 ± 17,00	271,00 ± 10,95 @
40	364,98 ± 12,71	347,52 ± 7,17	310,02 ± 17,78	274,09 ± 11,85 @
<b>THR (ms)</b>				
0	286,22 ± 14,16	276,43 ± 17,20	256,45 ± 14,72	177,45 ± 5,06 @ &
10	279,97 ± 12,64	272,88 ± 17,90	253,65 ± 11,80	179,65 ± 6,14 @ &
20	269,00 ± 10,94	261,67 ± 15,84	253,39 ± 12,28	184,05 ± 8,38 @ &
30	260,27 ± 11,13	258,61 ± 15,66	255,83 ± 11,12	183,42 ± 8,90 @ &
40	253,07 ± 10,91	250,43 ± 15,33	258,60 ± 11,95	181,10 ± 7,49 @ &
<b>TPT/Fc (ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>)</b>				
0	67,37 ± 4,68	129,06 ± 10,20 *	172,73 ± 42,60 #	215,64 ± 32,22 @
10	68,47 ± 4,93	123,52 ± 9,12 *	173,85 ± 43,76 #	211,78 ± 28,79 @
20	70,62 ± 5,96	130,67 ± 11,63 *	186,91 ± 47,42 #	227,67 ± 32,52 @
30	74,79 ± 7,17	135,81 ± 11,90 *	183,35 ± 47,39 #	225,67 ± 32,62 @
40	75,47 ± 6,65	134,22 ± 11,09 *	187,91 ± 45,77 #	233,45 ± 34,34 @
<b>THR/Fc (ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>)</b>				
0	52,90 ± 3,98	99,60 ± 5,93 *	148,60 ± 28,93 #	169,25 ± 19,37 @
10	52,22 ± 3,68	102,45 ± 6,26 *	148,49 ± 28,73 #	174,97 ± 17,63 @
20	51,24 ± 3,45	99,60 ± 6,70 *	155,78 ± 32,00 #	186,37 ± 22,97 @
30	52,18 ± 4,80	99,46 ± 5,96 *	159,73 ± 32,64 #	192,96 ± 25,79 @
40	51,97 ± 4,27	97,83 ± 6,18 *	167,11 ± 31,37 #	196,61 ± 28,40 @
<b>dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>				
0	0,0290 ± 0,0023	0,0152 ± 0,0012 *	0,0104 ± 0,0022 #	0,0093 ± 0,0016 @
10	0,0282 ± 0,0019	0,0147 ± 0,0013 *	0,0101 ± 0,0021 #	0,0091 ± 0,0016 @
20	0,0282 ± 0,0019	0,0143 ± 0,0011 *	0,0099 ± 0,0022 #	0,0087 ± 0,0014 @
30	0,0278 ± 0,0023	0,0141 ± 0,0011 *	0,0100 ± 0,0021 #	0,0086 ± 0,0015 @
40	0,0274 ± 0,0021	0,0138 ± 0,0010 *	0,0095 ± 0,0021 #	0,0083 ± 0,0014 @
<b>-dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>				
0	-0,0174 ± 0,0014	-0,0083 ± 0,0004 *	-0,0054 ± 0,0011 #	-0,0055 ± 0,0012 @
10	-0,0175 ± 0,0011	-0,0083 ± 0,0005 *	-0,0053 ± 0,0011 #	-0,0053 ± 0,0013 @
20	-0,0170 ± 0,0010	-0,0085 ± 0,0005 *	-0,0052 ± 0,0011 #	-0,0049 ± 0,0010 @
30	-0,0169 ± 0,0011	-0,0085 ± 0,0005 *	-0,0051 ± 0,0011 #	-0,0048 ± 0,0011 @
40	-0,0168 ± 0,0012	-0,0086 ± 0,0005 *	-0,0049 ± 0,0011 #	-0,0049 ± 0,0011 @

### 3.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequência) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC)

A Figura 6 apresenta os valores médios da Fc das tiras ventriculares de matrinxãs dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação tanto na ausência quanto na presença de 10 µM de rianodina.

A análise dos resultados revela que, para o grupo Ct, houve uma redução significativa e progressiva da Fc em relação aos valores iniciais (12 bpm), a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz ou 36 bpm atingindo o valor mínimo de  $1,83 \pm 0,21$  mN.mm<sup>-2</sup>, na frequência de 2,0 Hz ou 120 bpm, acima da qual os registros tornaram-se irregulares. Para o grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, a redução da Fc ocorreu a partir da frequência de 36 bpm, atingindo o valor mínimo de  $1,58 \pm 0,12$  mN.mm<sup>-2</sup> na frequência de 1,4 Hz ou 84 bpm, a máxima atingida por este grupo experimental. Adicionalmente, as tiras ventriculares dos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram valores de Fc significativamente inferiores (aproximadamente 50%) quando comparados aos valores apresentados pelo grupo Ct, em todas as frequências de estimulação (Fig. 6A).

No grupo Ct+RIAN houve redução significativa da Fc a partir da frequência de estimulação de 1,0 Hz ou 60 bpm atingindo o valor mínimo de  $0,41 \pm 0,08$  mN.mm<sup>-2</sup>, na frequência de 2,0 Hz ou 120 bpm (Fig. 6B). No grupo HgCl<sub>2</sub>+RIAN, a Fc se manteve constante até a frequência de estimulação de 1,0 Hz sofrendo redução significativa em seu valor nas frequências de 1,2 e 1,4 Hz (72 e 84 bpm, respectivamente) (Fig. 6C). A presença da rianodina reduziu significativamente a Fc tanto no grupo Ct quanto no HgCl<sub>2</sub> não havendo, entretanto, diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN (Fig 6D).

A Figura 7 e 8 apresentam os valores médios do TPT e THR, respectivamente, das tiras ventriculares de matrinxãs dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação tanto na ausência quanto na presença de 10µM de rianodina.

Os valores de TPT e THR obtidos a partir de 36 bpm foram significativamente inferiores aos valores iniciais (12 bpm) para os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. O TPT chegou ao valor mínimo de 206 ms na frequência de 120 bpm, no grupo Ct e 228 ms no grupo HgCl<sub>2</sub>, na frequência de 84 bpm. Por outro lado, o THR chegou ao valor mínimo de 141 ms na frequência de 120 bpm, no grupo Ct, e 164 ms, aos 84 bpm, no grupo HgCl<sub>2</sub>. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> nos valores de TPT e THR em todas as frequências de estimulação analisadas (Figs. 7A e 8A).

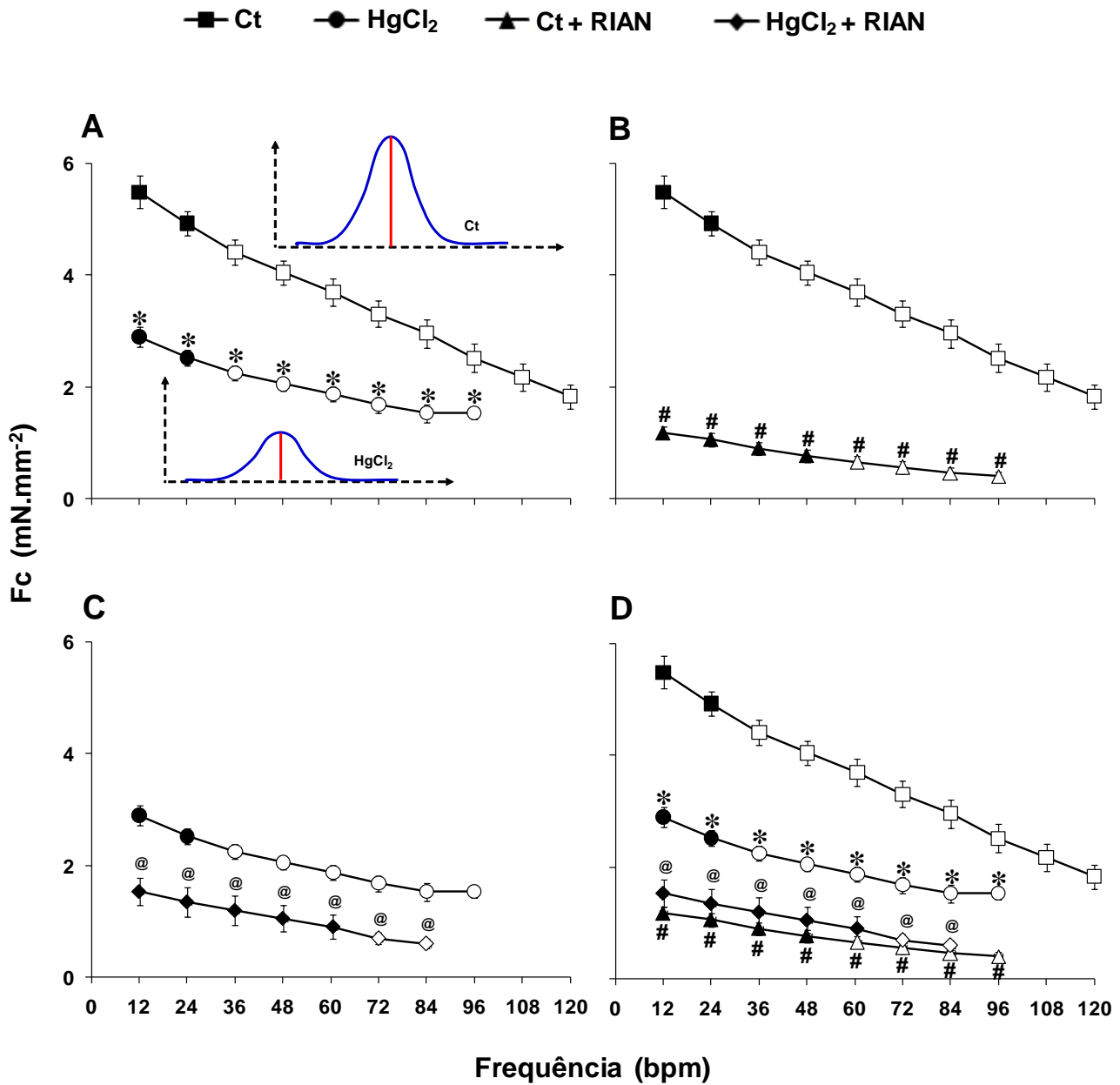
No grupo Ct+RIAN houve redução significativa do TPT e THR a partir da frequência de estimulação de 0,8 Hz ou 48 bpm atingindo os valores mínimos de  $208,24 \pm 4,26$  e  $159,48 \pm 6,66$  ms, respectivamente, na frequência de 1,6 Hz ou 96 bpm (Fig. 7B e 8B). No grupo  $HgCl_2$ +RIAN, os valores de TPT sofreram redução significativa a partir da frequência de 0,8 Hz (Fig. 7C), enquanto que os valores de THR só apresentaram redução significativa nas frequências de 1,2 e 1,4 Hz (72 e 84 bpm, respectivamente) (Fig. 8C). A presença da rianodina reduziu significativamente o TPT e o THR apenas no grupo  $HgCl_2$  havendo diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN para o parâmetro THR (Fig 8D).

As Figuras 9 e 10 mostram os valores das relações TPT/Fc e THR/Fc para os grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN. Foram observados aumentos significativos em tais razões no grupo  $HgCl_2$  em relação ao grupo Ct, em todas as frequências de estimulação (Figs. 9A e 10A). No grupo controle, com os incrementos na frequência de estimulação, as razões TPT/Fc foram significativamente superiores aos valores iniciais (12 bpm) a partir de 1,6 Hz (ou 96 bpm), enquanto que as razões THR/Fc aumentaram significativamente a partir de 1,8 Hz (ou 108 bpm). Para o grupo  $HgCl_2$ , os valores de TPT/Fc e THR/Fc não sofreram alteração com os incrementos na frequência de estimulação em relação aos valores iniciais (12 bpm), mantendo-se constantes até a frequência de 84 bpm (ou 1,4 Hz), a máxima atingida pelas tiras ventriculares onde os registros ainda permaneciam regulares.

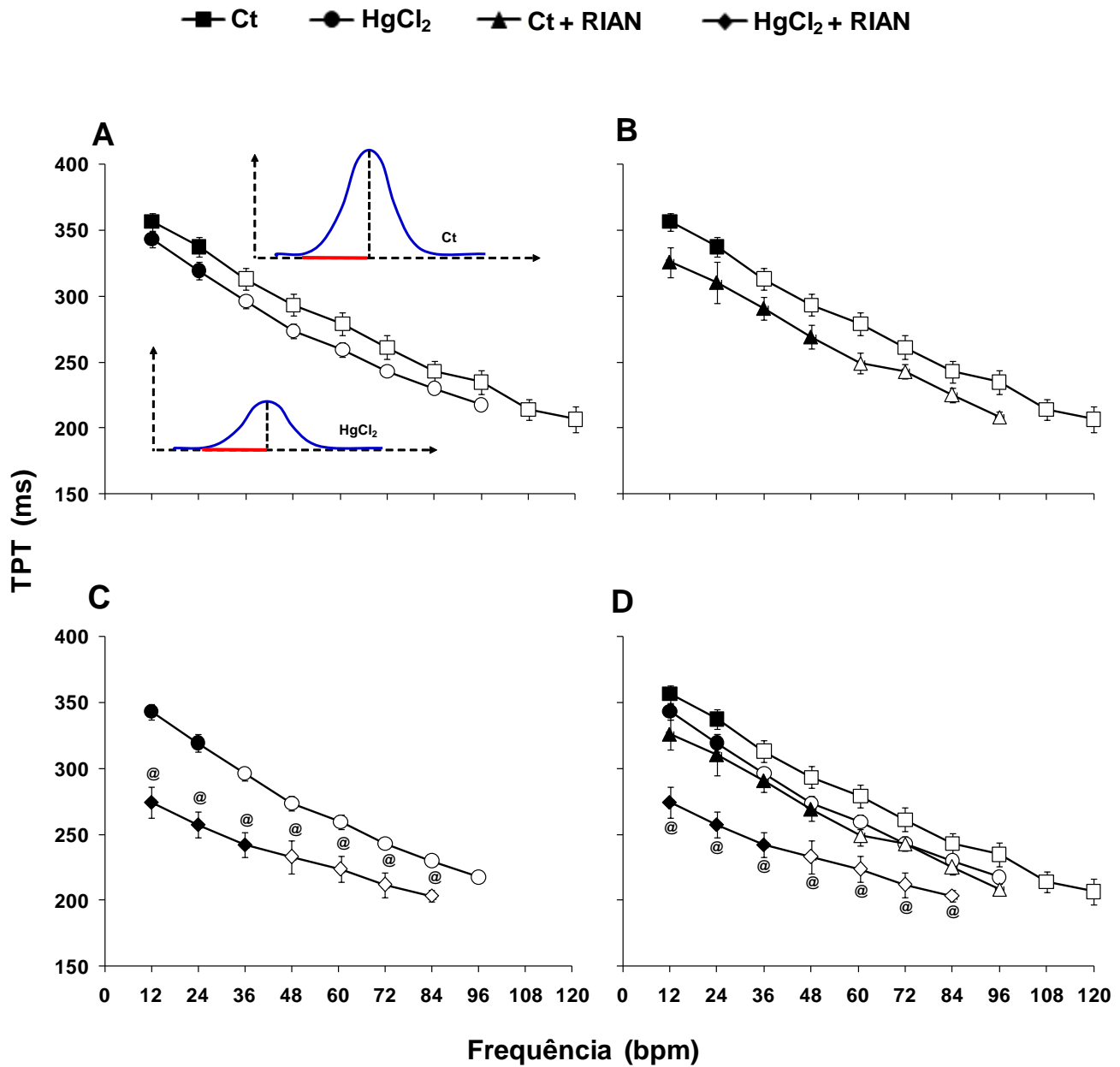
No grupo Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN não foram observadas alterações significativas no TPT/Fc e THR/Fc com o aumento da frequência de estimulação (Figs. 9B, 9C, 10B e 10C). Por outro lado, a rianodina aumentou significativamente tais razões tanto no grupo Ct como no  $HgCl_2$  sem que fossem produzidas diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN (Fig 9D e 10 D).

O efeito de incrementos sucessivos de 12 bpm na frequência de estimulação sobre valores médios da RT das tiras ventriculares de matrizã do grupo Ct e  $HgCl_2$  está representado graficamente na Figura 11.

Dentro de cada um dos grupos experimentais, os valores da RT não sofreram alterações com incrementos progressivos da frequência de estimulação. Entretanto, para frequências correspondentes, os valores de RT das tiras ventriculares dos matrizãs expostos ao  $HgCl_2$  foram significativamente inferiores quando comparados àqueles apresentados pelas tiras ventriculares dos matrizãs controles (Fig. 11A). Após a adição de rianodina, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Ct e  $HgCl_2$  nos valores de RT em todas as frequências de estimulação analisadas (Figs. 11B e 11C).

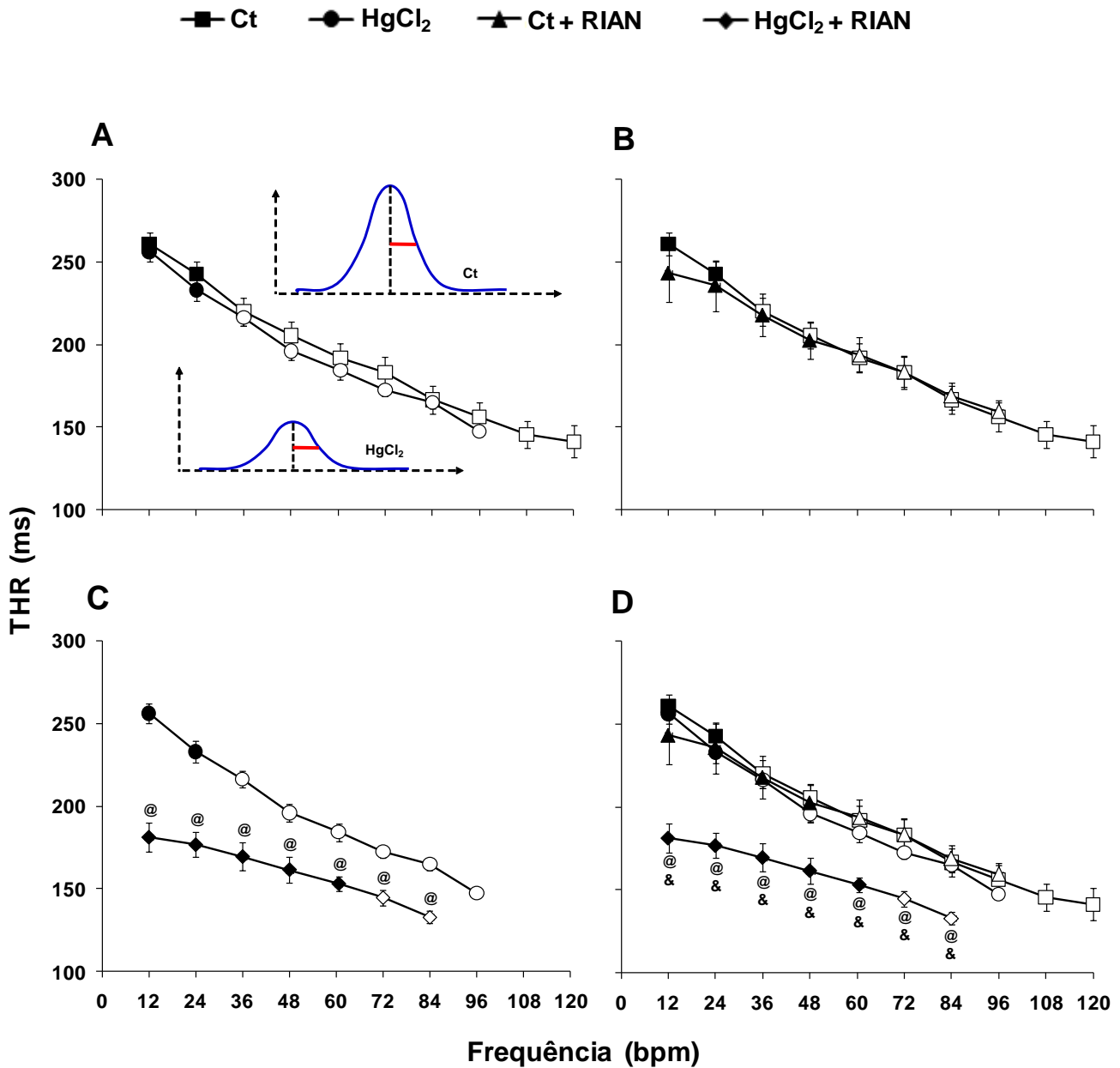


**Figura 6** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração isométrica ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 12$ ) e exposto a  $0,15 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h ( $HgCl_2$ ,  $n = 12$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e  $HgCl_2$  e os efeitos do  $HgCl_2$  (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN e em **D**: grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN.

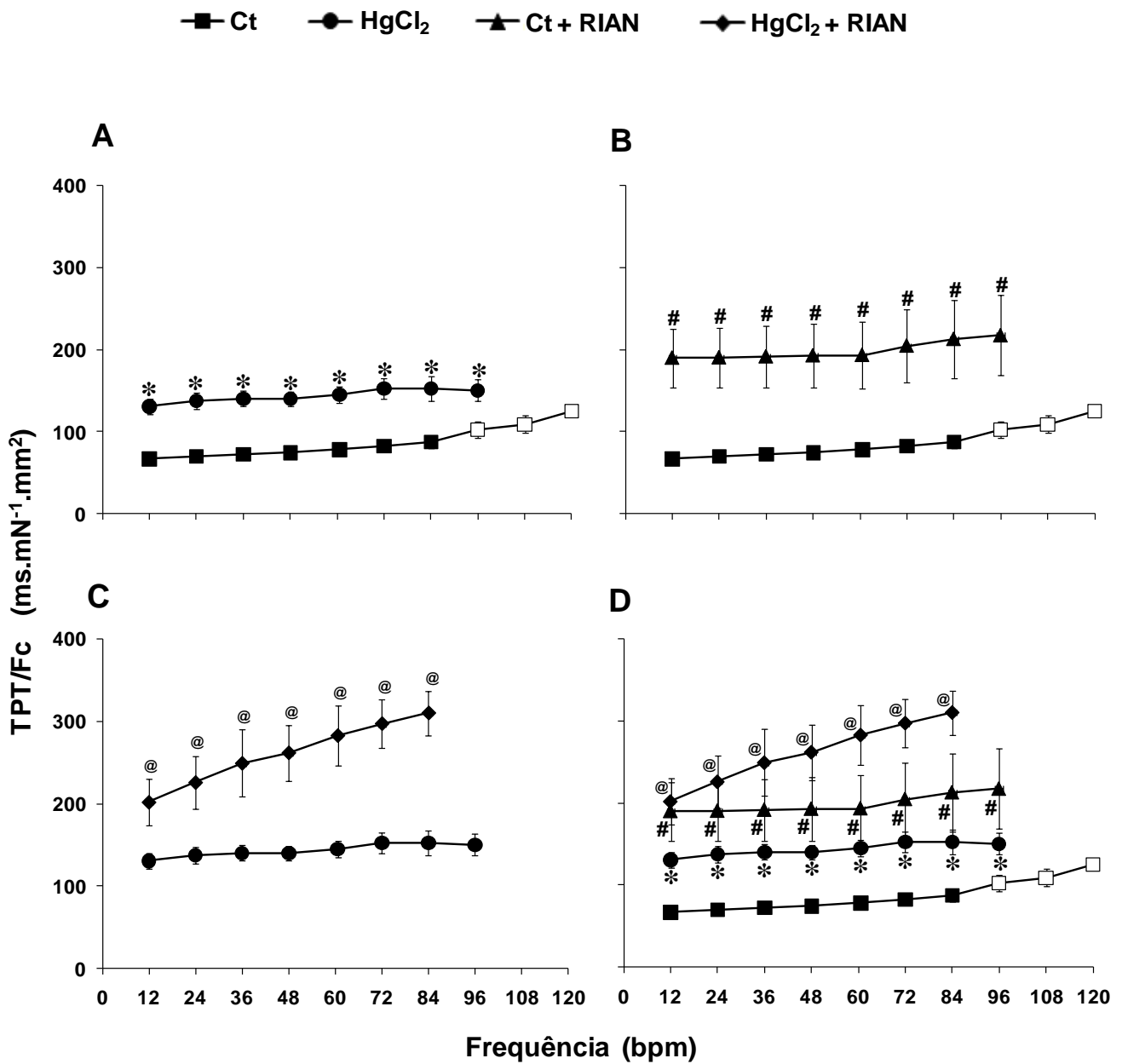


**Figura 7** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão isométrica (TPT - ms) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.

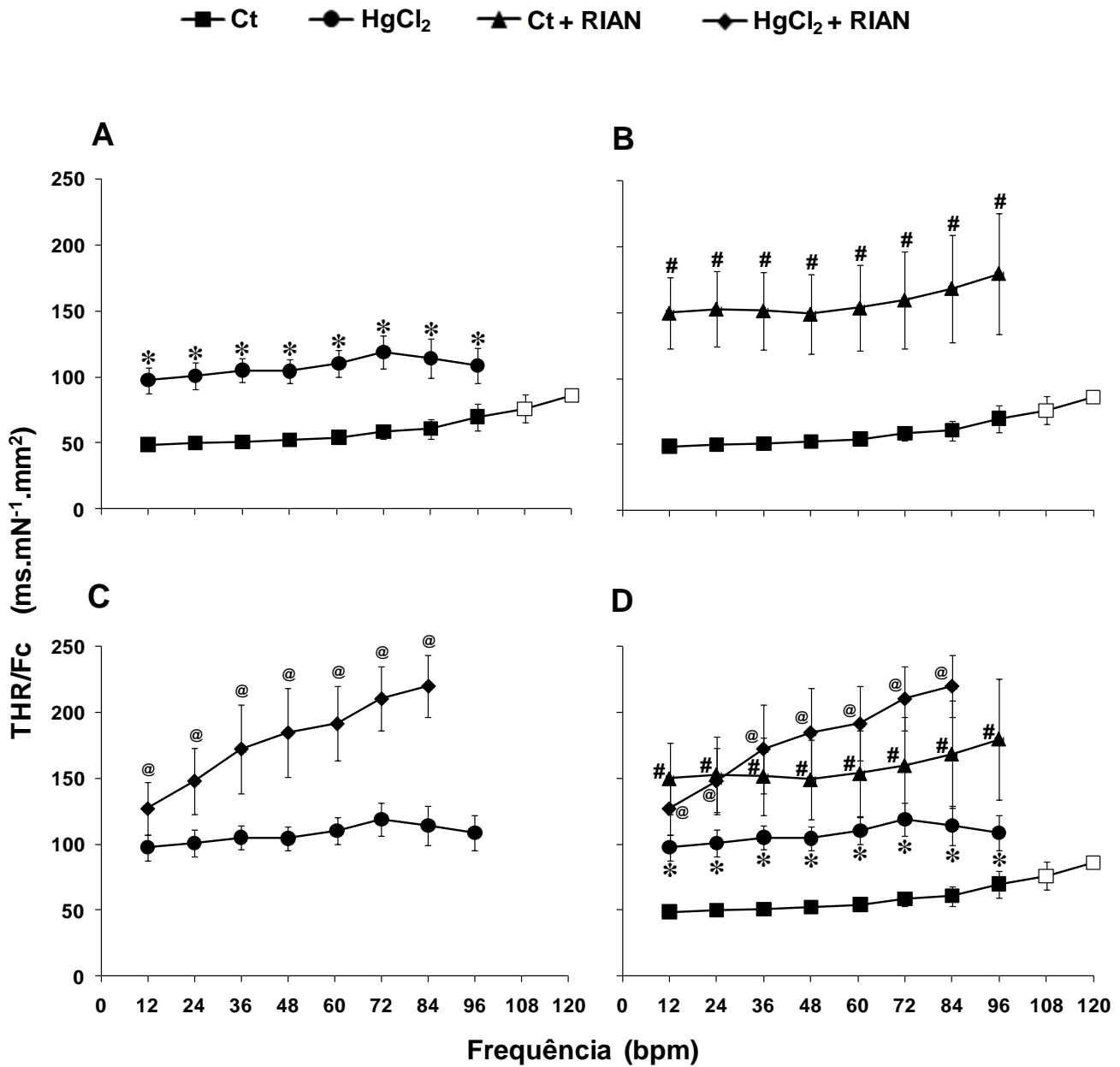




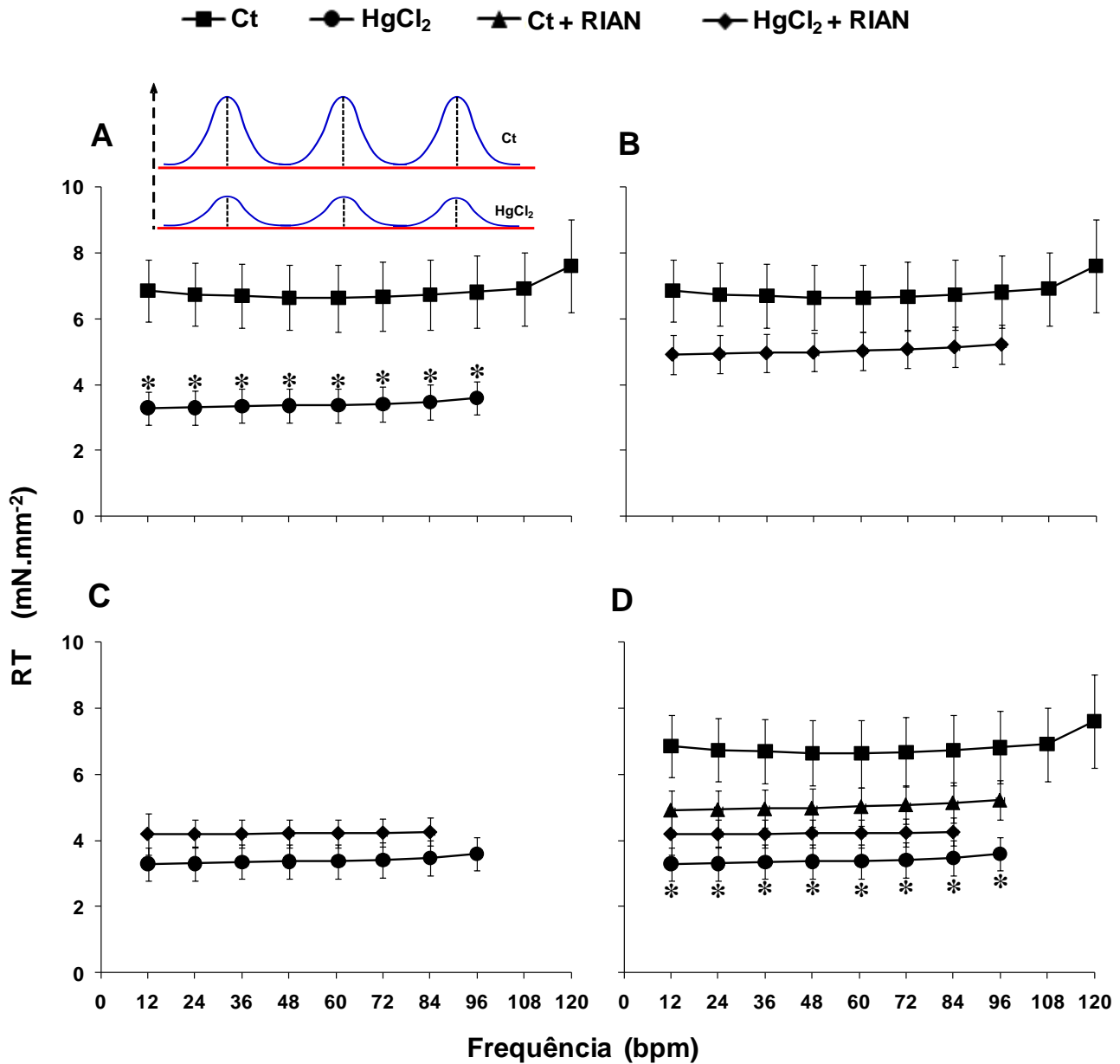
**Figura 8** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de matrixã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.



**Figura 9** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para o pico de tensão e a força de contração isométrica (TPT/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.



**Figura 10** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para 50% do relaxamento e a força de contração isométrica (THR/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.



**Figura 11** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a tensão de repouso (RT - mN.mm<sup>-2</sup>) das tiras ventriculares de matrixã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.

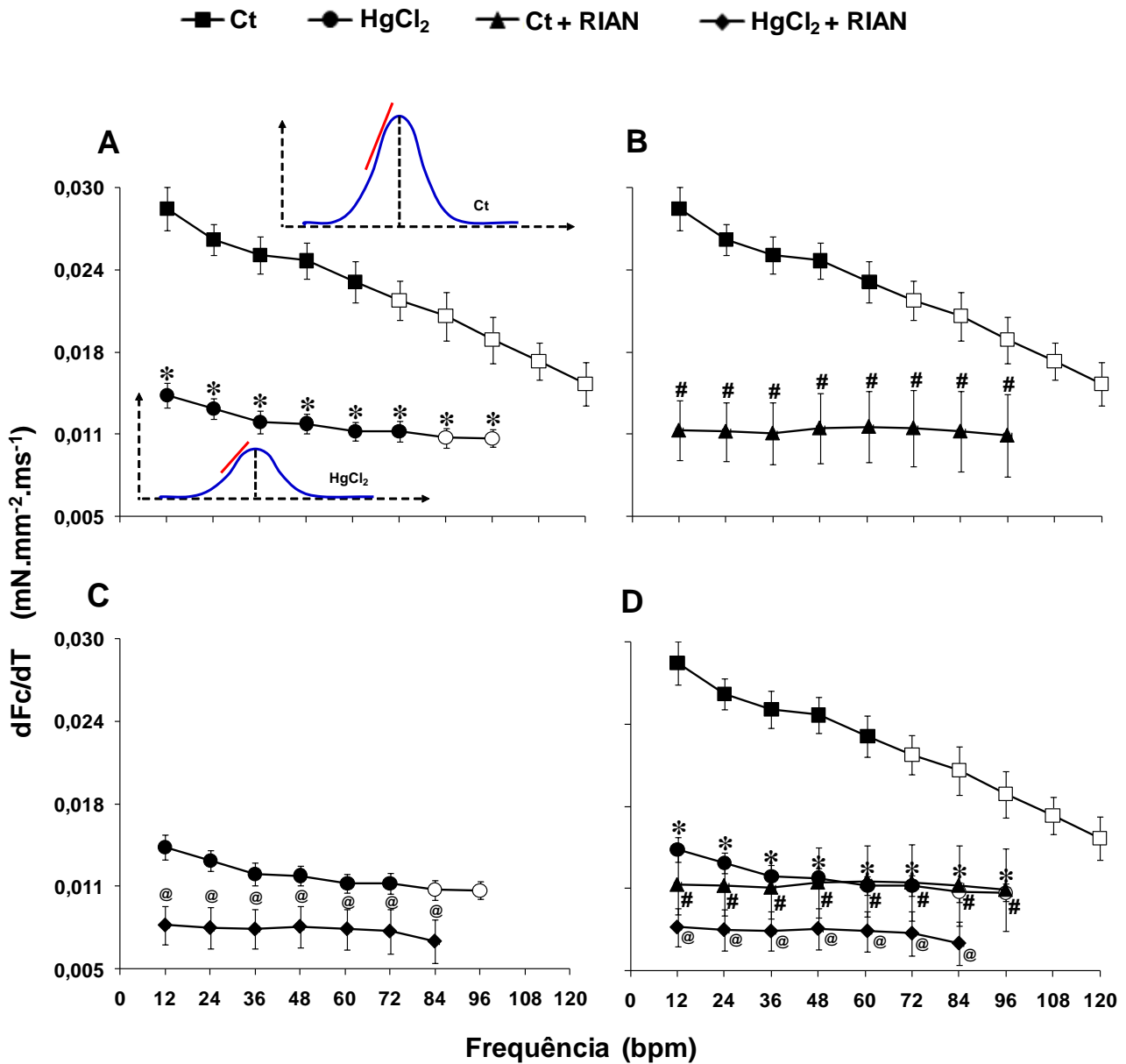
As figuras 12 e 13 mostram, respectivamente, as taxas de contração ( $dF_c/dT$ ) e de relaxamento ( $-dF_c/dT$ ) desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrinxãs nas diferentes frequências de estimulação, dos grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN.

As tiras ventriculares do grupo controle mantiveram suas taxas de contração constantes até a frequência de 1,0 Hz (60 bpm), abaixo da qual houve uma redução significativa da  $dF_c/dT$  em relação aos valores iniciais de 0,2 Hz (12 bpm). No grupo exposto ao  $HgCl_2$  os valores de  $dF_c/dT$  foram significativamente inferiores ao valor inicial somente nas frequências acima de 1,4 Hz (84 bpm) (Fig. 12A). Por outro lado, as tiras ventriculares dos grupos Ct e  $HgCl_2$  mantiveram as taxas de relaxamento ( $-dF_c/dT$ ) constantes em todas as frequências de estimulação alcançadas, não havendo diferenças significativas em relação aos valores iniciais (12 bpm) (Fig. 13A). Adicionalmente, a exposição ao  $HgCl_2$  reduziu significativamente tanto a taxa de contração como a de relaxamento das tiras ventriculares em todas as frequências de estimulação testadas (Figs 12A e 13A).

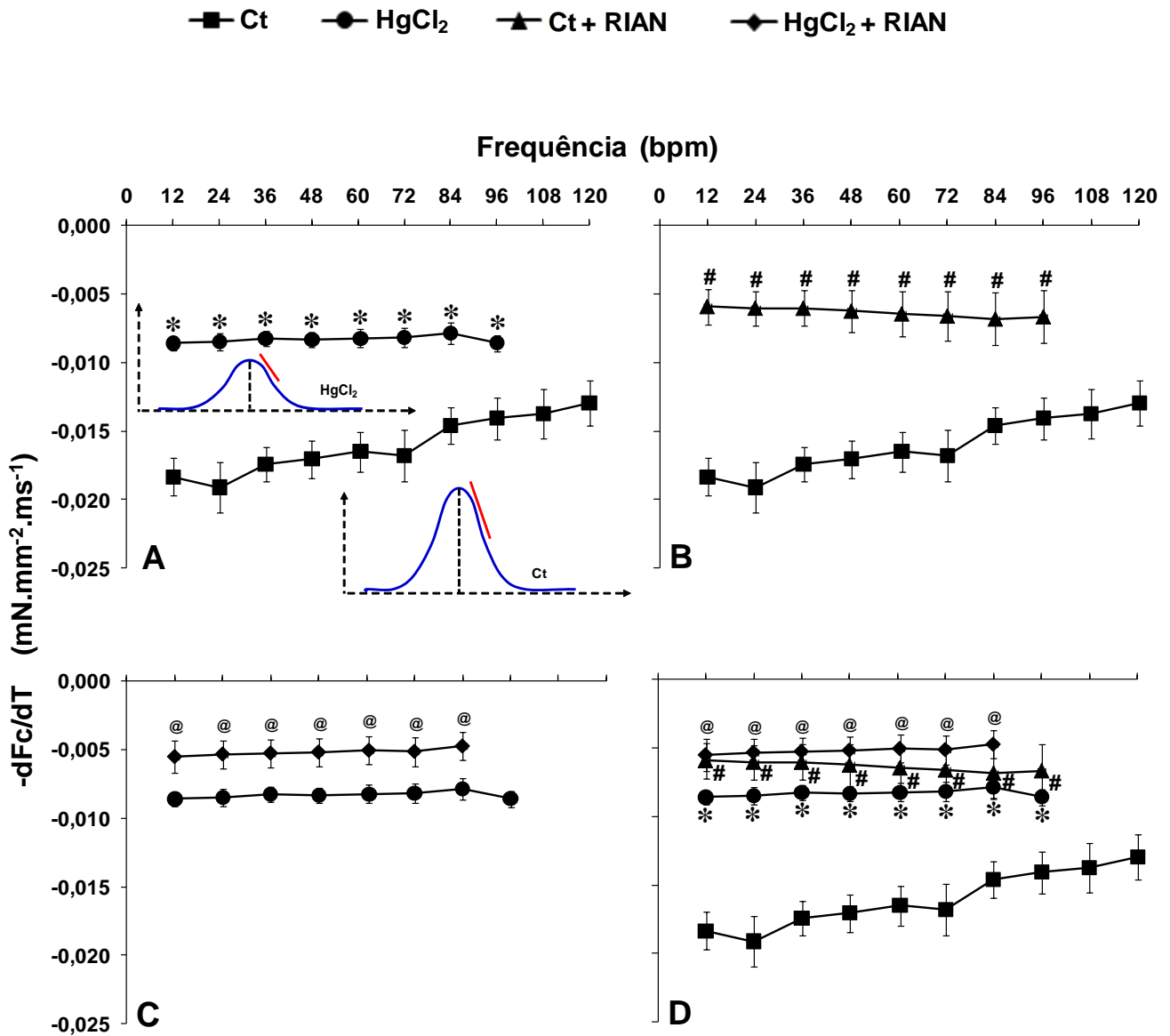
Nos grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN não foram observadas alterações tanto na  $dF_c/dT$  como na  $-dF_c/dT$  com aumentos sucessivos da frequência de estimulação (Figs. 12B, 12C, 13B e 13C). A presença da rianodina reduziu significativamente as taxas de contração e de relaxamento dos grupos Ct e  $HgCl_2$  de forma a não produzir diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN (Figs. 12D e 13D).

A figura 14 apresenta o produto da frequência de estimulação pelo pico da tensão isométrica – a capacidade de bombeamento cardíaco (CBC). Tanto no grupo Ct como no  $HgCl_2$ , a CBC aumentou significativamente a partir da frequência de 0,6 Hz (36 bpm) em relação aos valores iniciais de 0,2 Hz (12 bpm). Os valores máximos da CBC foram obtidos entre 1,2 e 1,8 Hz para o grupo Ct e em 1,6 Hz para o grupo exposto ao  $HgCl_2$  (frequência máxima alcançada pelas tiras ventriculares dos matrinxãs deste grupo). A análise estatística revelou que os valores da CBC do grupo Ct foram significativamente superiores (aproximadamente 50%) aos do grupo exposto ao  $HgCl_2$  em todas as frequências de estimulação testadas (Fig. 14A).

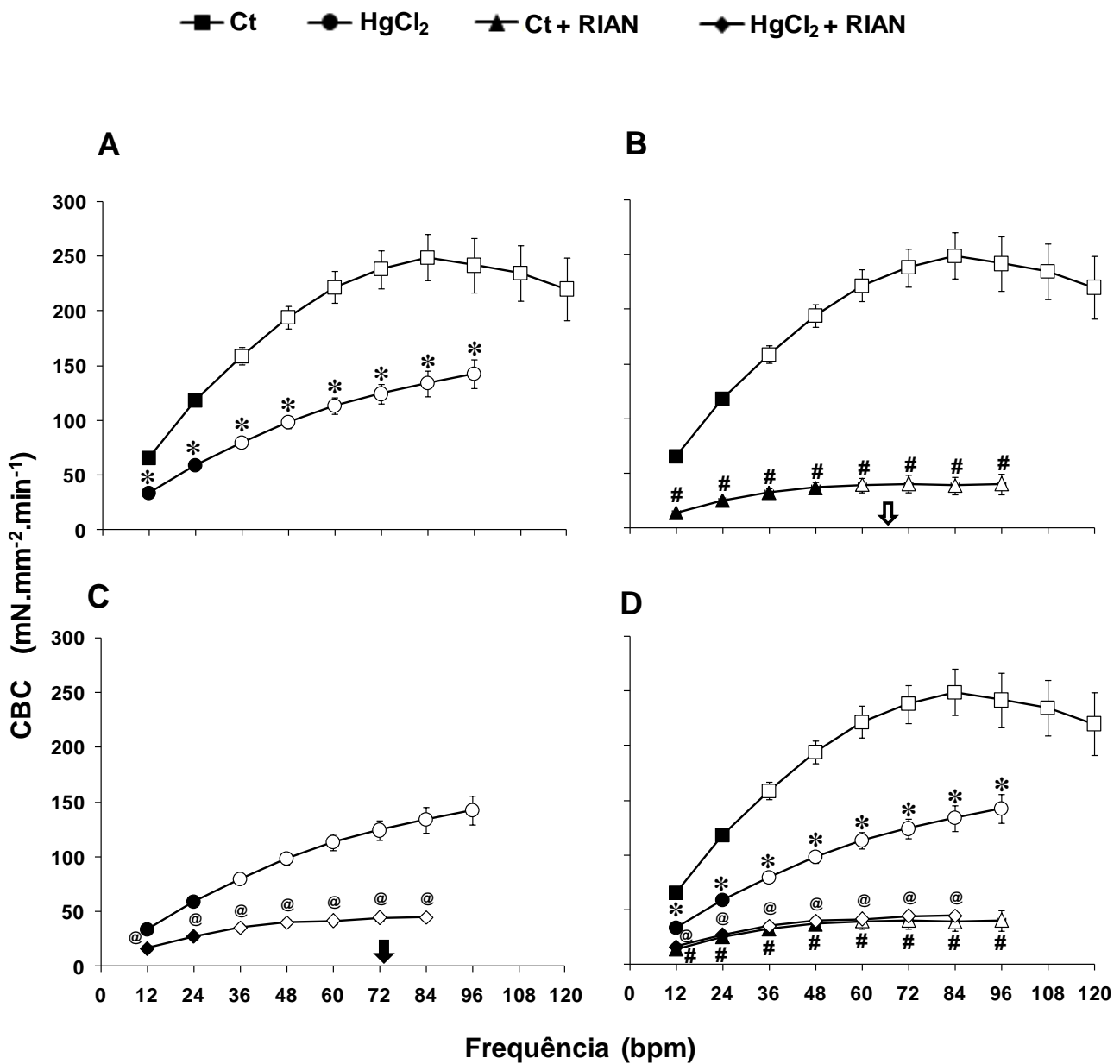
No grupo Ct+RIAN houve aumento significativo da CBC a partir da frequência de estimulação de 1,0 Hz ou 60 bpm a partir da qual a CBC se manteve constante (Fig. 14B). No grupo  $HgCl_2$ +RIAN, a CBC aumentou significativamente a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz (36 bpm), a partir da qual também se manteve constante não sendo possível identificar valores máximos e ótimos para seu desenvolvimento em tais grupos (Fig. 14C). A adição de rianodina reduziu significativamente a CBC tanto no grupo Ct quanto no  $HgCl_2$  não havendo, entretanto, diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN (Fig 14D).



**Figura 12** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de contração ( $dF_c/dT$  -  $mN \cdot mm^{-2} \cdot ms^{-1}$ ) das tiras ventriculares de matrixã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 12$ ) e exposto a  $0,15 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>,  $n = 12$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e os efeitos do HgCl<sub>2</sub> (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.



**Figura 13** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de relaxamento ( $dF_c/dT$  -  $mN.mm^{-2}.ms^{-1}$ ) das tiras ventriculares de matrixã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 12$ ) e exposto a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h ( $HgCl_2$ ,  $n = 12$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e  $HgCl_2$ ; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN e em **D**: grupos Ct,  $HgCl_2$ , Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais ( $0,2 Hz$  ou  $12 bpm$ ). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e  $HgCl_2$ +RIAN.



**Figura 14** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. A seta branca em **B** representa a frequência cardíaca *in vivo* obtida para o grupo Ct. A seta preta em **C** representa a frequência cardíaca *in vivo* obtida para o grupo HgCl<sub>2</sub> (para detalhes, ver capítulo VIII).



### 3.3 Tensão pós-repouso

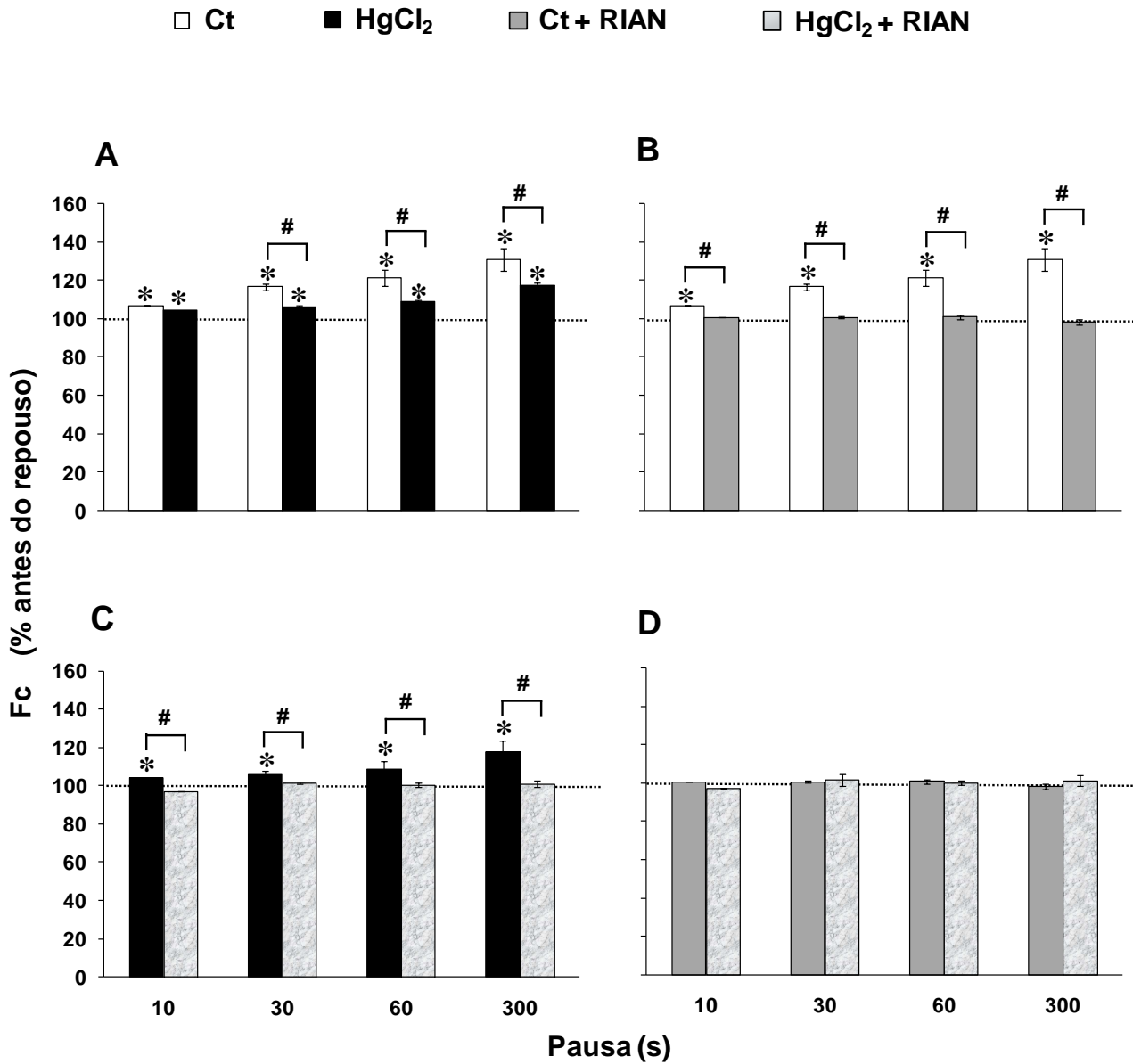
Os valores médios da força de contração (porcentagem dos valores observados na última contração precedente ao período de repouso) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *B. amazonicus* em resposta a pausas diastólicas variando de 10 a 300 s nos grupos Ct, HgCl<sub>2</sub>, Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN são mostrados na Figura 15.

Houve resposta inotrópica positiva na tensão pós-repouso (ou potenciação pós-pausa) do grupo controle em todas as pausas diastólicas utilizadas no experimento. Quando comparados os valores de Fc pós-repouso e os observados imediatamente antes da pausa, a potenciação máxima foi de 30,8 %, para a maior pausa diastólica (300 s) (Fig. 15A). Houve resposta inotrópica positiva na tensão pós-repouso do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, para todas as pausas diastólicas utilizadas. Quando comparados os valores de Fc pós-repouso e os observados imediatamente antes da pausa, a potenciação máxima foi de 17,4% para a maior pausa diastólica (300 s) (Fig. 15B). A comparação dos efeitos das pausas diastólicas sobre a Fc das tiras ventriculares de matrinxãs dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, revela que houve diferenças significativas nas potenciações pós-pausa entre os grupos experimentais. A exposição ao HgCl<sub>2</sub> reduziu os valores de potenciação pós-pausa nas pausas diastólicas de 30, 60 e 300 s em aproximadamente 10%.

O tratamento com rianodina aboliu completamente a potenciação pós-pausa exibida pelas tiras ventriculares dos matrinxãs dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> (Figs. 15B e C), não havendo diferenças entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN (Fig. 15D).

Os valores médios de TPT, THR, dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de *B. amazonicus* após pausas diastólicas variando de 10 a 300 s na ausência ou na presença de 10 µM de rianodina estão apresentados na Tabela 2.

Em todos os grupos experimentais, nenhuma alteração foi observada nos valores de TPT após todos os períodos de pausas testados. Por outro lado, as tiras ventriculares dos matrinxãs do grupo HgCl<sub>2</sub> tratadas com 10 µM de rianodina exibiram valores de THR significativamente inferiores de maneira a se observar diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Tanto a exposição ao HgCl<sub>2</sub> quanto o tratamento com 10 µM de rianodina reduziram significativamente tanto a taxa de contração como a de relaxamento das tiras ventriculares após as pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 s sem haver diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.



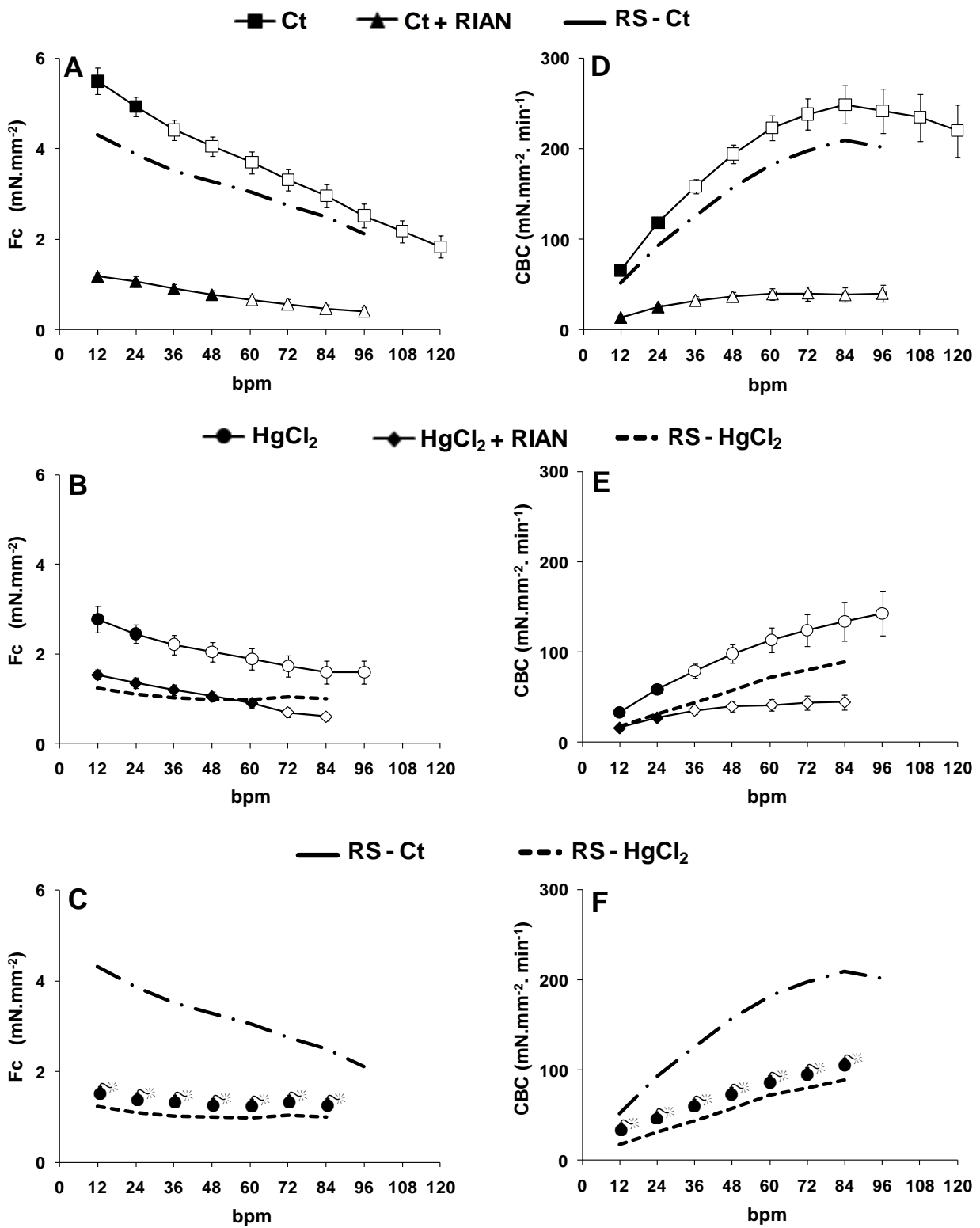
**Figura 15** - Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 s desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) registrados na primeira contração após os períodos das pausas na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN e em **D**: grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. \*: indica diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa; #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

**Tabela 2:** Valores médios de TPT, THR, dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus* do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) após pausas diastólicas variando de 10 a 300 s na ausência ou na presença de 10 μM de rianodina. Valores são médias ± E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e HgCl<sub>2</sub>+RIAN.

Pausas (s)	Grupos Experimentais			
	Ct	HgCl <sub>2</sub>	Ct+RIAN	HgCl <sub>2</sub> +RIAN
<b>TPT (ms)</b>				
<b>10</b>	338,85 ± 13,03	310,38 ± 9,75	317,66 ± 23,16	255,87 ± 9,81
<b>30</b>	345,53 ± 7,47	324,57 ± 7,82	346,42 ± 29,70	275,00 ± 26,55
<b>60</b>	355,18 ± 14,83	329,03 ± 10,45	321,25 ± 16,05	269,16 ± 8,58
<b>300</b>	376,41 ± 22,66	333,40 ± 9,14	333,25 ± 18,90	295,66 ± 20,38
<b>THR (ms)</b>				
<b>10</b>	282,11 ± 10,70	253,03 ± 14,60	279,75 ± 19,55	185,50 ± 12,11 @ &
<b>30</b>	297,64 ± 7,55	264,02 ± 14,35	318,50 ± 31,94	188,61 ± 11,06 @ &
<b>60</b>	299,87 ± 10,37	272,27 ± 15,31	302,87 ± 30,45	191,00 ± 10,16 @ &
<b>300</b>	320,24 ± 12,42	301,76 ± 20,98	321,62 ± 42,91	197,66 ± 13,90 @ &
<b>dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>				
<b>10</b>	0,0274 ± 0,0017	0,0151 ± 0,0008 *	0,0095 ± 0,0022 #	0,0076 ± 0,0015 @
<b>30</b>	0,0275 ± 0,0012	0,0156 ± 0,0010 *	0,0091 ± 0,0020 #	0,0079 ± 0,0014 @
<b>60</b>	0,0296 ± 0,0017	0,0156 ± 0,0011 *	0,0095 ± 0,0022 #	0,0077 ± 0,0016 @
<b>300</b>	0,0334 ± 0,0023	0,0183 ± 0,0017 *	0,0092 ± 0,0020 #	0,0079 ± 0,0013 @
<b>-dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>				
<b>10</b>	-0,0146 ± 0,0013	-0,0095 ± 0,0004 *	-0,0046 ± 0,0012 #	-0,0049 ± 0,0012 @
<b>30</b>	-0,0141 ± 0,0008	-0,0092 ± 0,0005 *	-0,0046 ± 0,0010 #	-0,0051 ± 0,0011 @
<b>60</b>	-0,0142 ± 0,0009	-0,0089 ± 0,0004 *	-0,0045 ± 0,0011 #	-0,0052 ± 0,0011 @
<b>300</b>	-0,0145 ± 0,0011	-0,0088 ± 0,0006 *	-0,0043 ± 0,0008 #	-0,0051 ± 0,0009 @

### 3.4 Papel do RS

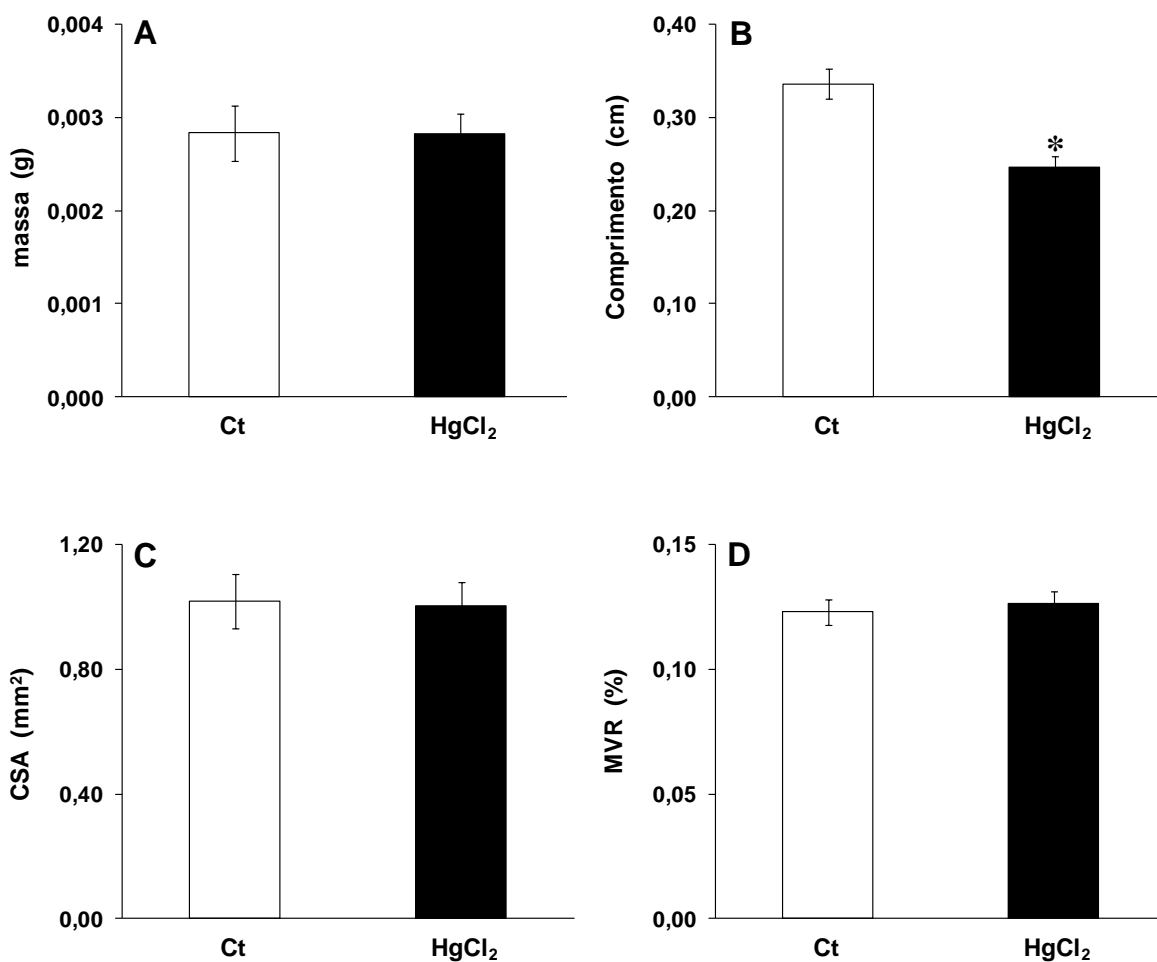
A representação gráfica da contribuição relativa do Ca<sup>2+</sup> acumulado no RS para a geração de força total e CBC em função da frequência de estimulação é apresentada na figura 16 como sendo a diferença entre o desenvolvimento de tais parâmetros nas preparações com e sem rianodina em cada grupo experimental (Ct e HgCl<sub>2</sub>). Os resultados revelam que no ventrículo de matrinxã, há uma contribuição significativa do RS (aproximadamente 80% nas tiras ventriculares do grupo Ct) para o fornecimento do Ca<sup>2+</sup> ativador que supera a participação dos mecanismos sarcolemais como canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L e trocador NCX atuando no modo reverso. Graficamente, pode ser observado que a exposição ao HgCl<sub>2</sub> promoveu uma redução significativa na contribuição do RS no desenvolvimento da Fc e da CBC.



**Figura 16** – Contribuição relativa do retículo sarcoplasmático (RS) no desenvolvimento da força de contração isométrica ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) e do índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $mN \cdot mm^{-2} \cdot min^{-1}$ ) em função da frequência de estimulação das tiras ventriculares de matrizã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct,  $n = 12$ ) e exposto a  $0,15 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h ( $HgCl_2$ ,  $n = 12$ ). Em **A** e **D**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **B** e **E**: grupos  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ +RIAN; em **C** e **F**: papel do RS nos grupos Ct e  $HgCl_2$ . Valores são médias  $\pm$  E.P.M.  $\bullet^*$ : indica diferença significativa do papel do RS entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Massa ventricular relativa (MVR)

Os valores da massa e do comprimento das tiras ventriculares, da área de seção transversal (CSA) e da massa ventricular relativa (MVR) dos matrinxãs do grupo controle e exposto ao Hg estão representados na Figura 17. A exposição ao  $\text{HgCl}_2$  não alterou a MVR dos matrinxãs, porém diminuiu o comprimento máximo de estiramento para se atingir pico de tensão seguindo a lei de Frank-Starling. Além disso, as tiras ventriculares dos peixes expostos ao  $\text{HgCl}_2$  apresentaram um período de estabilização maior, de cerca de 40 a 60 minutos, exibindo contrações espontâneas que desapareceram ao longo deste período.



**Figura 17.** Massa (g), comprimento (cm) e área de seção transversal (CSA -  $\text{mm}^2$ ) das tiras ventriculares e massa ventricular relativa (MVR - %) de matrinxãs, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 12) e exposto a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h ( $\text{HgCl}_2$ , n = 12). Valores são médias  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$  ( $p < 0,05$ ).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito do tempo

O presente trabalho se propôs avaliar os efeitos da exposição aguda (96 horas, via água) ao mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ), sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração (respostas cronotrópicas e inotrópicas) do miocárdio isolado de matrinxã, *B. amazonicus*, teleósteo nativo e característico de ambientes neotropicais, de grande importância econômica e amplamente distribuído nas bacias hidrográficas brasileiras comumente sujeitas a contaminação pelo Hg.

A força de contração (Fc) bem como os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) e seus índices derivados (TPT/Fc; THR/Fc; RT;  $dF_c/dT$  e  $-dF_c/dT$ ), no grupo controle e no grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$ , mantiveram-se constantes ao longo dos 40 minutos de experimento. Tais resultados indicam que as preparações não desenvolveram qualquer efeito inotrópico negativo devido a deteriorações tempo-dependentes. Dessa forma, o tempo máximo de 40 min utilizados em todos os protocolos experimentais mostrou-se adequado, não interferindo nos registros dos dados. O protocolo do efeito do tempo também permite avaliar as respostas das tiras ventriculares estimuladas a 0,2 Hz (12 bpm), frequência sub-fisiológica, evitando, assim, que a frequência *in vivo*, por si própria, interfira nas respostas isométricas, uma vez que a relação força-frequência é diferente para as diferentes espécies de teleósteos (SHIEL et al, 2002).

Nos matrinxãs, foi observado um efeito inotrópico negativo do  $\text{HgCl}_2$ , uma vez que a Fc média deste grupo ( $\sim 2,87 \text{ mN.mm}^{-2}$ ) foi aproximadamente a metade da apresentada pelo grupo controle ( $\sim 5,58 \text{ mN.mm}^{-2}$ ). Não há ainda estudos que avaliem os efeitos dos compostos mercuriais sobre o AEC em peixes. É conhecido que a exposição aguda (96 h) a concentrações sub-letais dos inseticidas organofosforados metil paration ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e triclorfon ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e ao sulfato de cobre ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) induz, respectivamente, a redução da tensão isométrica desenvolvida pelas tiras ventriculares do miocárdio isolado de matrinxãs, tilápias-do-Nilo e tilápias tailandesas, (OLLE, 2007; THOMAZ, 2008; WALDEMARIN, 2008).

Na literatura, as ações tóxicas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular são descritas para ratos como uma resposta inotrópica bifásica dose-dependente: um aumento inicial, em baixas concentrações, seguido por uma redução da Fc em concentrações mais elevadas de  $\text{HgCl}_2$ . Em pequenas concentrações, 2 horas de exposição ao  $\text{HgCl}_2$  ( $1$  e  $2,5 \mu\text{M}$ ), ocorrem elevações na força e taxa de contração ( $dF/dt$ ) de músculo papilar de rato (OLIVEIRA et al., 1994; VASSALO et al., 1996; VASSALO et al., 1999). Os autores atribuem tais efeitos a um provável efeito digitálico-símile, devido a diminuição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, o que levaria a um aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular, diminuindo a eficácia do mecanismo do trocador

NCX. Essa redução no gradiente transsarcolemal de  $\text{Na}^+$  reduziria a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ , elevando sua concentração intra-citoplasmática e favorecendo, assim, o aumento da força de contração. No presente estudo, esse efeito digitálico-símile do Hg não foi observado nos matrinxãs após a exposição aguda (96 horas) a 0,15 ppm de  $\text{HgCl}_2$ , via água. Provavelmente, essa ausência de inotropismo positivo se deve ao fato de que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  induziu uma elevada acumulação de mercúrio no coração desses peixes (7,23 mg/Kg - pool de 10 corações), conforme discutido no capítulo III. Considerando a densidade do músculo de  $1,06 \text{ g/cm}^3$ , o nível de mercúrio aproximado em cada coração de matrinxã exposto ao  $\text{HgCl}_2$  é de  $4,25 \text{ } \mu\text{M}$ , concentração de Hg total superior a descrita como indutora de inotropismo positivo em ratos.

Por outro lado, exposições a concentrações maiores de  $\text{HgCl}_2$  (acima de  $2,5 \text{ } \mu\text{M}$ ), promoveram em músculo papilar e em tiras ventriculares de rato, uma diminuição na força isométrica de contração com concomitante redução do TPT, da potenciação pós-pausa e da contração tetânica e uma restituição dos valores de  $dF/dt$  semelhantes aqueles observados nos controles (CUNHA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1994; VASSALO et al., 1996; VASSALO et al., 1999). Para explicar o efeito inotrópico negativo, dois fatores poderiam estar ocorrendo ao mesmo tempo. O 1º seria uma sobrecarga de cálcio (“calcium overload”), condição que ocorre sempre que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é inibida, levando a um aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular que, por sua vez, diminui a atividade da troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (VASSALO et al., 1996) e, assim, aumenta o cálcio intracelular. O 2º fator seria uma ação direta do Hg sobre as proteínas contráteis, demonstrada pela depressão da contração tetânica pelo Hg, sugerindo um efeito tóxico direto do metal sobre o componente contrátil (VASSALO et al., 1996).

Wang & Horisberger (1996) também observaram inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pelo  $\text{HgCl}_2$  em oócitos do anuro *Xenopus laevis*, decorrente da ligação do Hg a cisteína do primeiro segmento transmembrana da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Outra possibilidade que contribuiria para a sobrecarga de cálcio seria a redução da atividade da bomba de cálcio do RS (SERCA), já que com isto não haveria redução da concentração de cálcio mioplasmático após a ativação da contração, uma vez que a redução da atividade da SERCA reduz a quantidade de cálcio armazenada pelo RS. Com a ativação, menor quantidade de cálcio é liberada, reduzindo a força de contração. Este fato foi demonstrado pela redução progressiva da potenciação relativa com o aumento da concentração do  $\text{Hg}^{2+}$ .

No presente estudo, a redução da Fc em matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  pode ser explicada pelas hipóteses acima mencionadas. O  $\text{HgCl}_2$  pode ter induzido uma sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  pela inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e da SERCA, reduzindo a Fc pela menor liberação deste íon a cada ativação. A diminuição da atividade da SERCA após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  foi comprovada pela diminuição da potenciação pós-pausa, discutida posteriormente.

Adicionalmente, a própria ação do  $\text{HgCl}_2$  sobre as proteínas contráteis não pode ser excluída, uma vez que a RT dos matrinxãs expostos diminuiu significativamente em relação ao controle durante todo o período experimental (40 min). Segundo Varian et al. (2009), uma diminuição na RT está associada a uma pequena quantidade de pontes cruzadas devido à redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Isso mostra que o  $\text{HgCl}_2$  pode ter reduzido a responsividade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  na tiras ventriculares de matrinxã. De acordo com Giordano (2005), as ERO reduzem a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  através da ativação da proteína quinase 1 reguladora do sinal apoptótico (ASK-1) e pode ser um dos meios pelos quais o  $\text{HgCl}_2$  reduziu esta sensibilidade nos miócitos de matrinxã, uma vez que induziu estresse oxidativo neste tecido aumentando, assim, a produção de ERO. A ASK-1 fosforila a troponina T alterando sua interação troponina-tropomiosina levando a redução da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase miofibrilar e diminuindo a contratilidade cardíaca (HE et al., 2003).

Cazorla et al. (1997) sugeriram que, em miócitos ventriculares de porquinho da índia, a RT é um fator importante na modulação do inotropismo positivo ao refletir qualquer alteração na acomodação do espaço intermiofilamentar e no comprimento do sarcômero. Segundo os autores a titina é a principal proteína envolvida no desenvolvimento da RT, pois ao interagir com os filamentos finos, pode modular a velocidade do deslizamento da actina sobre a miosina e, portanto, a velocidade da contração. Em cardiomiócitos humanos, bovinos e de rato, a fosforilação da titina mediada pela proteína quinase A (PKA), reduz a RT (KRÜGER & LINKE, 2006). A PKA é uma proteína sensível a regulação redox que pode ser modulada por vários oxidantes como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e peroxinitrito (KOHR et al., 2010). Dessa forma, o  $\text{HgCl}_2$  pode estimular a PKA via indução de estresse oxidativo ou até mesmo aumentando a liberação de catecolaminas (SOLOMON & HOLLENBERG, 1975) que, via receptores  $\beta$ -adrenérgicos, estimulam a proteína G ligada ao GTP que estimula a adenilato ciclase a produzir AMPc, o que, por sua vez, ativa a PKA (WEHRENS & MARKS, 2004).

Cabe ressaltar que o desenvolvimento da força de contração é modulado pelas interações das pontes cruzadas pela cooperatividade entre a formação dessas pontes. Por outro lado, de acordo com Shiels & White (2008), a RT é importante para a função cardíaca por refletir a tensão diastólica do ventrículo e está, dessa forma, diretamente relacionada ao enchimento do coração. Uma diminuição na RT indica uma alteração na relação comprimento-tensão do sarcômero, implicando em um aumento paralelo da conformidade elástica (GOLDBERG & ULLRICK, 1967). Adicionalmente, o Hg interage principalmente com as proteínas, ligando-se com alta afinidade a radicais sulfidrilas (-SH) (ANNER et al., 1992; IMESCH et al., 1992). Como as miosinas têm vários grupos -SH em sua composição (FLINK et al., 1978), são um dos alvos potenciais da ação do mercúrio (CLARKSON, 1972; HALBACH et al., 1981; HALBACH, 1990). Nesse sentido, Moreira et al. (2003) mostraram que a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase da miosina de



ventrículo de rato é inibida pelo  $\text{HgCl}_2$  de maneira dose-dependente, a partir de baixas concentrações (50 nM).

Os grupamentos sulfidrilas presentes nas miosinas de cadeia pesada são tióis reativos necessários para a geração do movimento das cabeças da miosina (GEEVES & HOLMES, 1999) e estão envolvidos na interação entre a cabeça da miosina com a actina (BOBKOVA et al., 1999). Esses grupamentos sulfidrilas estão arrajandos em hélice e as alterações nessa conformação implicarão em mudança durante a hidrólise do ATP acoplada a geração de força. A presença de pequenas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  (1  $\mu\text{M}$ ) é capaz de modificar os resíduos -SH, inibindo a atividade ATPásica da miosina (VASSALLO et al, 1999). Nas cadeias pesadas da miosina, há dois importantes grupamentos -SH reativos, o SH1Cys-707 e o SH2Cys-697 (BOBKOVA et al., 1999). Os grupos SH1 e SH2 são necessários para a geração do movimento das cabeças de miosina, pois se apresentam em hélice e qualquer alteração em sua estrutura promove a rotação do domínio motor durante a hidrólise do ATP acoplada à geração de força (GEEVES & HOLMES, 1999). Segundo Vassalo et al. (1999), a ATPase miosínica é muito sensível à ação do Hg e pode ser a causa da redução da atividade contrátil. Moreira e colaboradores (2003) mostram que, *in vitro*, a adição de GSH reverte o efeito inibitório do  $\text{HgCl}_2$  sobre a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase miosínica do ventrículo de ratos, protegendo os resíduos de -SH.

O Hg também é capaz de promover alterações estruturais no músculo que, por si, podem levar ao comprometimento da Fc. Em músculos esqueléticos branco e vermelho do peixe paulistinha (*Danio rerio*), a exposição a 13,5  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de metilmercúrio na dieta provocou desorganização das miofibrilas, dilatação das sisternas do RS e redução do espaço entre os feixes de fibras e do tamanho das mitocôndrias (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2008).

Outra hipótese que pode ter contribuído para a redução da Fc desenvolvida pelas tiras ventriculares dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  é a inibição da atividade da proteína quinase C (PKC) pelo mercúrio. Rajanna et al. (1995) mostraram que tanto o mercúrio orgânico ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ) como o inorgânico (Hg) são capazes de inibir a atividade da PKC neural, *in vitro*, em concentrações micromolares e de maneira dose-dependente, sendo que a  $\text{IC}_{50}$  (concentração responsável por 50% de inibição) do  $\text{CH}_3\text{Hg}$  foi de 0,22  $\mu\text{M}$  e do Hg de 1,5  $\mu\text{M}$ . No músculo cardíaco, a PKC fosforila diferentes proteínas que contribuem pra a excitabilidade miocárdica e para a contração (KEEF et al., 2001). Entre essas proteínas, está o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, cuja fosforilação pela PKC aumenta sua atividade e, conseqüentemente, a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito (SHISTIK et al., 1998). O Hg, ao inibir a PKC, pode diminuir a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nos miócitos, reduzindo a oferta deste íon ao aparato contrátil e, por conseguinte, levando a diminuição da Fc. Adicionalmente, a PKC pode ativar o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (IWAMOTO et al., 1998).

A troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  nas células cardíacas é um processo determinado pelos gradientes eletroquímicos para o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema, de forma que o NCX é

sensível ao potencial de membrana. Em potências de repouso normais e durante a maior parte do potencial de ação, o NCX retira  $\text{Ca}^{2+}$  da célula (modo normal), enquanto que durante a fase ascendente do potencial de ação cardíaco (“upstroke”), o NCX pode reverter a direção e trazer  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula (modo reverso) durante a fase descendente (“overshoot”) (MULLINS, 1979). Dessa forma, o sistema de troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  não é apenas a principal via de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  como também, a princípio, pode mediar parte do influxo trans-sarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$ . A inibição da PKC pelo  $\text{HgCl}_2$  pode, dessa forma, contribuir para uma diminuição tanto da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando o trocador atua em seu modo reverso, como na extrusão desse íon, quando o trocador atua no seu modo normal. O tempo gasto para o aumento e o decréscimo da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como a quantidade deste íon que é ciclada batimento-a-batimento, dependem diretamente do grau de atividade dos mecanismos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (GWATHMEY & MORGAN, 1991; VORNANEN, 1998). Assim, alterações nas atividades do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L e do NCX, induzidas pelo  $\text{HgCl}_2$  via inibição da PKC, podem ter contribuído para as elevações nas razões TPT/Fc e THR/Fc e reduções das taxas de contração e relaxamento apresentadas pelas tiras ventriculares dos matrinxãs após a exposição ao metal.

Conforme discutido no capítulo IV, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  induziu estresse oxidativo no tecido cardíaco de matrinxã. Os principais mecanismos de lesão provocada pelas EROs são a peroxidação de lipídios ou lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular e a oxidação protéica (proteína carbonilada). Ambos os danos oxidativos aumentaram significativamente no coração dos matrinxãs e das traíras após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ . A LPO implica em alterações na estrutura das membranas celulares, resultando em transtornos de permeabilidade, alteração do fluxo iônico e perda de seletividade (BABER & HARRIS, 1994). Já a formação de derivados carbonilados é irreversível, causando alterações conformacionais nas proteínas, diminuindo a atividade catalítica das enzimas e/ou aumentando a susceptibilidade das proteínas à ação de proteases, resultando em quebra de cadeias polipeptídicas (ALMROTH et al., 2005). Os danos oxidativos às proteínas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos, proteínas de transporte, etc., causando alterações funcionais na célula (NYSTRÖM, 2005).

Kramer et al. (1984) verificaram que miócitos de cães adultos expostos a um sistema produtor de radicais livres (diidroxifumarato e  $\text{Fe}^{3+}$ -ADP) mostraram perda das atividades enzimáticas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase sarcolêmica e da NADH citocromo c redutase microsomal, juntamente com aumentos associados na peroxidação lipídica medida pela formação de MDA. Além dos efeitos adversos nas enzimas, a destruição peroxidativa das membranas celulares comprometerá a função celular através de um aumento geral na permeabilidade aos íons, como o  $\text{Na}^+$ , e, por fim, aos constituintes citoplasmáticos incluindo macromoléculas, devido à perda da integridade da dupla camada de fosfolipídios da membrana (TAYLOR & SHAPPEL, 1995). Aida et

al. (1990) demonstraram que após 60 minutos de adição de 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em culturas de miócitos de ratos houve a formação de vesículas e perda da viabilidade celular acompanhada por um significativo aumento da formação de MDA e depleção de ATP.

Existem vários mecanismos de interação pelos quais as ERO podem causar disfunção no miócito. De acordo com revisão feita por Hidalgo & Donoso (2008), há interações significativas entre a cilcagem do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e as ERO capazes de modificar uma variedade de proteínas que participam de vias de transdução de sinalização e de outras funções celulares fundamentais que determinam a vida ou a morte. Segundo os autores, alterações no  $\text{Ca}^{2+}$  transiente induzidas pelo estresse oxidativo podem causar uma variedade de patologias cardíacas. Dentre essas interações destacam-se as modificações oxidativas em resíduos de cisteína de várias proteínas envolvidas na homeostasia e sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  tais como os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, a SERCA e canais de rianodina do RS. Nesse sentido, no coração dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , foi observada uma elevação no conteúdo de GSSG e uma tendência a queda na razão GSH:GSSG, indicando uma oxidação de grupamentos sulfidrílicos o que pode ser uma das causas da diminuição da Fc do miocárdio.

Dados da literatura que mostram que o Hg diminui a contratilidade do miocárdio e reduz as atividades da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e da miosina ATPase (REDDY et al., 1988; HECHENBERG & BEYERSMANN, 1991; ANNER et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1994; SALONEN et al., 1995; VASSALO et al., 1996; SOUZA de ASSIS et al., 2003). Os aumentos da peroxidação lipídica e da oxidação protéica no músculo cardíaco dos matrinxãs frente à exposição ao  $\text{HgCl}_2$  corroboram esses resultados, uma vez que o estresse oxidativo pode acarretar todas essas alterações. Luo et al. (2006) demonstraram que, em miocárdio de ratos, o estresse oxidativo reduziu a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , além de alterar o manejo do  $\text{Ca}^{2+}$  ao promover “downregulation” dos receptores de dihidropiridina (DHPR) e aumento da atividade da SERCA e do NCX.

De acordo com revisão feita por Hidalgo & Donoso (2008), há um relevante “crosstalk” entre a sinalização do cálcio e a sinalização redox em miócitos sob condições fisiológicas normais e/ou patológicas. O aumento da produção das EROs pode induzir a inibição de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes e da SERCA, além de modular a interação do  $\text{Ca}^{2+}$  com proteínas tamponantes como calmodulina, calreticulina, calretinina e troponina. Tais alterações na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo estado redox celular desencadearão mudanças no AEC e também podem ter contribuído para os efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos do  $\text{HgCl}_2$  nos corações dos matrinxãs.

Adicionalmente, o Hg é capaz de induzir um desacoplamento da cadeia de fosforilação oxidativa mitocondrial, bloqueando o estágio 3 da respiração mitocondrial e a citocromo c oxidase e reduzindo a liberação de ATP e, conseqüentemente, inibindo o metabolismo

energético mitocondrial. Su & Chen (1979) também realizaram estudos morfológicos no miocárdio de ratos tratados com 2 ppm de Hg e encontraram dilatação e edema de mitocôndrias e do RS, depósito de material amorfo nas mitocôndrias e degeneração das fibras do miocárdio. Cambier et al. (2009) e Oliveira Ribeiro et al. (2008) mostraram que a exposição crônica (até 49 e 63 dias, respectivamente) a  $\sim 13 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de metilmercúrio na dieta induziu várias anormalidades estruturais nas mitocôndrias dos músculos esqueléticos branco e vermelho do peixe paulistinha, *D. rerio*. Dentre estas anormalidades destacam-se: redução do número de mitocôndrias, perda e/ou desorganização da arquitetura das cristas mitocondriais, separação de intermembranas com formação de vacúolos. Diante dessas evidências, não se pode descartar a possibilidade de um decréscimo da contratilidade como um efeito secundário, proveniente da incapacidade da mitocôndria em fornecer um suprimento energético adequado a manutenção da performance cardíaca frente exposição ao  $\text{HgCl}_2$  pode ter ocorrido no miocárdio dos matrinxãs no presente estudo. De acordo com Atchison & Hare (1994), o Hg inibe várias enzimas mitocondriais e diminui o potencial transmembrana, reduzindo a produção de ATP e o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, todas as alterações mitocondriais induzidas em resposta a exposição ao Hg podem contribuir também para uma diminuição do tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria, o que corroboraria uma sobrecarga de cálcio (*calcium overload*) resultando num efeito inotrópico negativo do Hg, reduzindo a Fc e, portanto, alterando o débito cardíaco.

Em relação aos parâmetros tempo-dependentes, nos matrinxãs, não foram observadas diferenças nos valores de TPT e de THR entre os grupos controle e exposto ao  $\text{HgCl}_2$ , indicando que este metal aparentemente não altera os tempos absolutos de contração e relaxamento ventricular. No entanto, foi possível observar um aumento nos valores das razões TPT/Fc e THR/Fc no grupo exposto ao metal provavelmente devido a um prejuízo nos mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  no acoplamento E-C, levando um maior tempo para a contração e também para o relaxamento (SHIELS et al., 1997). Assim, quando os valores de TPT e THR foram normalizados pelos respectivos valores de Fc observou-se que, após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , tanto o pico de tensão quanto 50% do relaxamento despenderam um tempo igual ao das tiras ventriculares do grupo controle para desenvolver uma força de contração isométrica menor, indicando prejuízo nos mecanismos de contração e relaxamento. Dessa forma, não apenas os valores absolutos de TPT e THR são importantes na avaliação da dinâmica dos mecanismos tempo-dependentes no acoplamento E-C, como também o uso das razões TPT/Fc e THR/Fc. Nesse sentido Thomaz et al (2009) também observaram aumentos em tais razões sem alteração dos valores absolutos de TPT e THR em tiras ventriculares de tilápia (*O. niloticus*) expostas por 96 h a  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  do inseticida organofosforado triclorfon (Neguvon<sup>®</sup>, Bayer).

Entretanto, os valores de TPT e THR, *per se*, não são bons indicadores da cinética da contração, a qual se torna patente quando as derivadas máxima e mínima da Fc pelo tempo

são comparadas a esses valores absolutos. Enquanto os valores absolutos de TPT e THR das tiras ventriculares dos matrinxãs não sofreram alterações mediante a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , as derivadas máxima e mínima reduziram-se significativamente em todo o período experimental (40 min) na frequência de 0,2 Hz, evidenciando prejuízos nas cinéticas de contração e relaxamento. Esses resultados indicam uma ciclagem de cálcio mais lenta após a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  devido: a) a prejuízos nos mecanismos sarcolemais de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; b) prejuízos no funcionamento da SERCA, uma vez que o RS é funcional nessa espécie; c) mecanismos de efluxo de cálcio incapazes de reduzir os níveis intracelulares deste íon a um taxa compatível àquela observada nos controles. Os possíveis efeitos inibitórios do Hg nos mecanismos de influxo e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foram anteriormente discutidos. De acordo com Berridge et al. (2003) os desvios na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , como os induzidos pela exposição a baixos níveis de metais pesados, podem afetar a capacidade celular de manter e modular a sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  depois de um período de tempo. No caso dos miócitos, isso implicaria na perda da capacidade de regular o débito cardíaco por meio de ajustes inotrópicos, o que prejudicaria o desempenho cardíaco normal e, por conseguinte, o sucesso e a sobrevivência da espécie em questão. Isso foi evidenciado na incapacidade do coração dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  em manter os batimentos cardíacos constantes frente à hipóxia gradual, em tensões de  $\text{O}_2$  onde animais controles normalmente regulam a frequência cardíaca, conforme será discutido posteriormente no capítulo VIII.

#### **4.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequência) e o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC)**

A força de contração desenvolvida pelo músculo cardíaco está diretamente relacionada com a frequência de estimulação e sua regularidade. A relação entre a força isométrica máxima e a frequência de contração é conhecida como relação força-frequência ou “efeito escada” (“staircase”). Em algumas espécies de mamíferos esses aumentos promovem concomitante aumento no pico de tensão, mecanismo conhecido como relação força-frequência positiva. O maior desenvolvimento de força em elevadas frequências está relacionado com a presença de um RS funcional e trocadores sarcolemais extremamente eficientes (LAYLAND & KENTISH, 1999).

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

espécies de peixe estudadas, o desenvolvimento de força em tiras cardíacas isoladas diminui em resposta a um aumento na frequência de estimulação. Esta relação inversa é conhecida como relação força-freqüência negativa ou “efeito escada” negativo. Em tiras atriais do ciclóstomo peixe bruxa, *Myxine glutinosa*, e em tiras ventriculares da maioria dos teleósteos, um aumento na frequência de estimulação causa uma redução na duração do estado ativo, diminui a tensão isométrica máxima e a taxa de contração (DRIEDZIC & GESSER, 1985; VORNANEN, 1989). Em frequências elevadas, logo antes das contrações se tornarem arrítmicas, a força é reduzida de 50 a 90% no músculo cardíaco da maioria dos teleósteos (SHIELS & FARRELL, 2000). Em outros grupos de vertebrados, conforme demonstrado em estudos realizados com tecido ventricular de mamíferos, répteis, anfíbios e também de elasmobrânquios (DRIEDZIC & GESSER, 1985; 1988) e no tecido atrial de atum, *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al., 1992), há uma relação positiva entre a frequência de contração e a tensão isométrica máxima em baixas frequências, relação que se torna negativa em frequências mais elevadas.

Segundo Helle (1983), o RS funciona não apenas como fonte de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração, mas também desempenha um papel fundamental como armazenador deste íon no relaxamento cardíaco, pela tomada de cálcio dependente de ATP (SERCA). Na maioria das espécies estudadas, há uma correlação entre o desenvolvimento do RS e a frequência de contração máxima que o músculo pode atingir, sendo que as maiores taxas de contração foram encontradas nos tecidos que apresentam um RS mais desenvolvido ou mecanismos de transporte sarcolemais de cálcio mais eficientes. Entretanto, em anfíbios, o menor diâmetro da célula reduz o tempo de difusão do cálcio e a quantidade necessária deste íon para promover a contração, permitindo que estes animais mantenham um acoplamento E-C eficiente, refletindo-se em uma relação força-freqüência positiva, mesmo na ausência de um RS anatomicamente bem desenvolvido (CHAPMAN, 1983; TIBBITS et al., 1992).

De acordo com Driedzic & Gesser (1985), a relação força-freqüência negativa apresentada pela maioria dos peixes reflete indiretamente a ineficácia do acoplamento excitação-contração, evidenciando uma menor capacidade de obtenção de cálcio livre a partir de reservas intracelulares nestes animais, ou ainda uma inabilidade dos mecanismos que promovem o efluxo deste íon do citosol, o que levaria a um relaxamento incompleto, comprometendo o desenvolvimento de força (SHIELS & FARRELL, 1997). A relação força-freqüência negativa pode estar relacionada ao declínio frequência-dependente do  $[\text{Ca}^{2+}]$ , devido a uma redução no influxo de cálcio no citoplasma, causada pela diminuição do influxo pela sarcolema, pelo NCX ou ainda uma redução na liberação de cálcio a partir do RS (SHIELS et al., 2002). Segundo Gesser et al. (1997), os pontos determinantes para o desenvolvimento da força cardíaca são a atividade do cálcio intracelular e o tempo para a interação do cálcio com o sistema contrátil.

Vornanen (1989) afirmou que a duração do potencial de ação cardíaco de teleósteos e anfíbios é muito semelhante à duração da contração, apresentando uma fase de platô mais prolongada que a de mamíferos, indicando que a despolarização da membrana desempenha um papel fundamental na geração de tensão. Este autor concluiu que a relação negativa observada na maioria dos teleósteos pode ser devida a um tempo insuficiente para a difusão de  $\text{Ca}^{2+}$  da superfície do miócito ao aparato contrátil, ou vice-versa, ocasionada pela diminuição do tempo de contração a elevadas frequências. Essa relação força-frequência negativa também foi documentada para algumas espécies tropicais, tais como o amorê de poça de maré (RANTIN et al., 1998), tilápia-do-nilo (COSTA et al., 2000), traíra (OLLE, 2003), pacu (ANELLI-Jr. et al., 2004) e a pirambóia, (COSTA et al., 2004). Entretanto, estudos desenvolvidos com tiras ventriculares de répteis, anfíbios e elasmobrânquios e tiras atrias de atum demonstraram uma relação força-frequência positiva em baixas frequências de estimulação, mas que se tornava negativa à medida que a frequência era elevada (DRIEDZIC & GESSER, 1985,1988; KEEN et al., 1992).

O estudo da relação entre a frequência de estimulação e a força isométrica desenvolvida (relação força-frequência) é de fundamental importância para a compreensão da habilidade do coração em desenvolver força perante diferentes frequências de estimulação. Isto se deve ao fato de que o aumento no metabolismo requer concomitante aumento no débito cardíaco, que é o produto da frequência cardíaca e do volume de ejeção. De acordo com Shiels et al. (2002), o mecanismo de Frank-Starling é mais importante para aumentar o débito cardíaco em peixes do que nos mamífero, o que torna imprescindível o desenvolvimento de estudos que mensurem a força sob diferentes frequências de estimulação.

Considerando-se que a frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$ ) registrada para matrinxãs controles em normóxia é de aproximadamente 1,0 Hz (65 bpm, capítulo VIII), a frequência máxima obtida *in vitro* (2,0 Hz ou 120 bpm tanto para o matrinxã) superou a frequência obtida *in vivo*, indicando que os miócitos de matrinxãs não trabalham, *in vivo*, no limite de sua capacidade de acoplamento E-C. Esses resultados estão em acordo com os obtidos para outras espécies de peixes (DRIEDZIC & GESSER, 1985; COSTA et al., 2000; ANELLI-Jr. et al., 2004; ROCHA et al., 2007). Entretanto, nota-se que a força de contração reduziu-se significativamente durante os incrementos na frequência, tanto no grupo controle como para o grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$ . Além disso, a tensão isométrica desenvolvida pelas tiras ventriculares dos peixes dos grupos expostos ao  $\text{HgCl}_2$  foi significativamente inferior a dos grupos controle em todas as frequências avaliadas.

Mudanças no desenvolvimento de força/tensão estão diretamente relacionadas a mudanças no transiente de cálcio intracelular. Portanto, reduções nos níveis de cálcio citoplasmático diminuiriam a força de contração devido à menor disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  para ativar os filamentos contráteis (SHIELS et al., 1999). Essas reduções nos níveis citoplasmáticos de cálcio sob altas frequências podem estar relacionadas a uma diminuição do influxo deste íon

via sarcolema, através dos canais L ou NCX, à redução na liberação de cálcio do RS ou ainda a uma combinação dos dois mecanismos (liberação de cálcio cálcio-induzida).

A contração cardíaca dos vertebrados ectotérmicos, ao contrário dos endotérmicos, é mais dependente do fluxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema, enquanto o RS parece ser de importância menor (CHAPMAN, 1983). No coração de teleósteos, o RS também parece ser pouco importante em temperaturas e frequências fisiologicamente relevantes (DRIEDZIC & GESSER, 1988; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989). Tibbits et al. (1990) sugerem que o fluxo transarcolema de  $\text{Ca}^{2+}$  é o maior mediador da regulação da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico quando o músculo está em “steady-state”. Entretanto, cabe ressaltar que, o matrinxã apresenta um RS funcional, de forma que a contração ventricular dessa espécie é significativamente dependente dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares conforme comprovado após adição de rianodina, que resultou em redução significativa da Fc. A rianodina é um alcalóide neutro retirado da planta *Ryania speciosa* (JONES et al., 1979) que se liga especificamente ao canal de liberação de cálcio do RS (BERS, 2001). Segundo Meissner (1986) e Alderson & Feher (1987), a liberação de cálcio pelo RS é afetada pela presença de rianodina: em concentrações nanomolares trava o canal de cálcio aberto em um estado de subcondutância, e em concentrações de 10  $\mu\text{M}$  ou superiores, fecha completamente o canal, impedindo a saída do cálcio a partir do RS. Em todas as frequências de estimulação testadas, após a adição de rianodina foram verificados prejuízos de cerca de 79 a 84% na Fc para grupo Ct e de 47 a 61% no grupo  $\text{HgCl}_2$  comprovando a importância dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares para o desenvolvimento da Fc em matrinxã.

A contribuição média do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador ao aparato contrátil para o miocárdio de matrinxã sob condições controle é de aproximadamente 81%. Olle (2007) também encontrou uma contribuição do RS em torno de 70% para a espécie sob condições controle. Isso indica que o RS é potencialmente funcional e contribui significativamente para a manutenção da tensão isométrica, exercendo um papel importante no manejo de cálcio quando consideradas as frequências observadas *in vivo*. Devido a esse conspícuo papel do RS no desenvolvimento de Fc, as tiras ventriculares dos matrinxãs dos grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$  que receberam rianodina não atingiram as frequências máximas de estimulação alcançadas pelos seus respectivos controles. Quando considerada a frequência cardíaca obtida *in vivo*, o inotropismo negativo provocado pela rianodina (redução de 82% a 1 Hz) foi muito superior ao efeito desse alcalóide descrito para espécies de peixes que comprovadamente apresentam RS funcional em frequências fisiológicas, como a cavala-do-pacífico, *Scomber japonicus* (redução de 20%; SHIELS & FARREL, 2000), truta arco-íris, *Oncorhynchus myliss* (redução de 15%; HARWOOD et al., 2000), pirambóia, *Lepisosirem paradoxa* (redução de 25%, COSTA et al., 2004) e atum, *Katsuwonus pelamis* (redução de 30%; KEEN et al. 1992).



A redução da Fc promovida pela rianodina das tiras ventriculares de *B. amazonicus* do grupo Ct não foi acompanhada por alteração dos parâmetros tempo-dependentes, semelhante ao descrito por outros autores (HOVE-MADSEN, 1992; OLLE, 2003; ROCHA et al., 2007), onde os valores absolutos de TPT e o THR não apresentam sensibilidade à rianodina em nenhuma das frequências utilizadas. Esses resultados indicam que a ausência de participação do RS como fornecedor e seqüestrador de  $\text{Ca}^{2+}$  não afetou o tempo de disponibilização deste íon ao aparato contrátil, mas, sim, a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível no citosol dos cardiomiócitos. Segundo Rocha et al. (2007), outros mecanismos envolvidos com o fornecimento e extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol, como NCX, canais de cálcio e bomba de cálcio da sarcolema, podem estar sendo suficientemente eficientes em promover um influxo e retirada deste íon da célula, já que a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ciclada a cada batimento é comprovadamente menor, conforme evidenciado pelo inotropismo negativo causado pela rianodina.

Segundo Layland & Kentish (1999), a taxa na qual o RS pode acumular cálcio começa a ser limitada pelo aumento na frequência de estimulação, uma vez que o intervalo entre os batimentos cardíacos é cada vez menor. Ao redor desse ponto, os mecanismos que tendem a reduzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (por exemplo, o tempo reduzido para que os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS se recuperem de seu estado adaptado/inativo) predominariam, causando um declínio na força de contração. Em miócitos ventriculares de truta, incrementos na frequência de estimulação de 0,2 para 1,4 Hz, causaram aumentos significativos na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e diminuição na duração do potencial de ação. Por outro lado, durante a sístole, houve queda na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente, que levou à diminuição da amplitude de contração. Os autores verificaram que o RS contribui com ~15% do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e que houve uma diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  frequência-dependente através dos canais L, mas que a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS não foi afetada pelos aumentos na frequência de estimulação (HARWOOD et al., 2000).

No presente estudo, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  diminuiu a frequência máxima atingida pelas tiras ventriculares de matrinxãs que foi de 1,4 Hz ou 84 bpm. Por outro lado, as tiras ventriculares dos peixes do grupo controle atingiram a frequência máxima de estimulação a 2 Hz ou 120 bpm. Esses resultados permitem inferir que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  reduz a capacidade do miocárdio de matrinxãs em aumentar a força de contração limitando, assim, os ajustes no débito cardíaco. Desta forma, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  compromete a performance e o sucesso da espécie, particularmente em situações nas quais é necessário ajustar o fluxo sanguíneo às circunstâncias que exijam uma atividade elevada, como na piracema. Cabe ressaltar que a incapacidade das tiras ventriculares dos peixes expostos ao  $\text{HgCl}_2$  em atingir a frequência máxima de 120 bpm exibida pelas tiras controles pode estar relacionada à inibição da função do RS pelo metal que será discutida no item 4.3. Adicionalmente, outros fatores não podem ser descartados como o aumento da peroxidação lipídica (LPO) e protéica descritos no capítulo V. A LPO vem sendo

apontada como o maior contribuinte para a perda das funções celulares sob condições de estresse oxidativo (STOREY, 1996).

Para os matrinxãs dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, o TPT e o THR, bem como a taxa de contração (dFc/dT) sofreram reduções significativas em resposta ao aumento na frequência de estimulação, refletindo um menor tempo tanto para o aporte dos íons Ca<sup>2+</sup> às miofibrilas contráteis, quanto para a retomada de cálcio pelo RS e/ou para o meio extracelular. A restituição mecânica descreve a habilidade do músculo cardíaco em produzir força em diferentes intervalos diastólicos (geralmente curtos), sendo estes determinados pelos mecanismos moleculares envolvidos no processo acoplamento E-C do miócito cardíaco. O processo molecular responsável por iniciar o batimento cardíaco necessita de um tempo finito para se recuperar da inativação do batimento precedente para dar início a uma nova contração de igual magnitude (TIITU, 2002).

No grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, as razões TPT/Fc e THR/Fc mostraram-se superiores em todas as frequências de estimulação testadas, evidenciando que o HgCl<sub>2</sub> prejudica tanto os mecanismos que promovem a entrada de Ca<sup>2+</sup> na célula, quanto àqueles que promovem sua extrusão, o que aumentaria o tempo para a contração e/ou levaria a um relaxamento incompleto e, conseqüentemente, à diminuição da força, mesmo a frequências fisiologicamente relevantes. Além disso, somente nos peixes do grupo Ct foram registrados aumentos nas razões TPT/Fc e THR/Fc nas maiores frequências de estimulação alcançadas. Isso provavelmente está relacionado ao fato de que somente essas tiras atingiram frequências tão altas, superiores a 96 bpm. Enquanto existem diversos componentes envolvidos com a promoção e manutenção de frequências cardíacas elevadas (velocidade de condução nervosa, densidade e capacidade de transporte dos canais, trocadores e bombas, etc), um outro fator determinante para a manutenção de elevadas taxas de contração constitui-se na distância de difusão intracelular que o Ca<sup>2+</sup> deve atravessar para ativar os miofilamentos (KEEN et al., 1992) e também na velocidade e eficiência com que este íon deve ser removido do sarcoplasma para promover um relaxamento máximo. Dessa forma, a elevação dessas razões pode ser decorrente de um tempo insuficiente para a difusão do Ca<sup>2+</sup> da superfície do miócito ao aparato contrátil, ocasionado pela diminuição do tempo de contração a elevadas frequências e conduzindo a reduções na Fc de até 67% em relação aos valores iniciais obtidos a 12 bpm elevando as razões TPT/Fc e THR/Fc.

Segundo Shiels & Farrell (1997), em peixes, o relaxamento é um passo crucial para a manutenção da força de contração mediante a elevação da frequência, o que pode ser evidenciado pelo aumento da tensão de repouso (RT). Portanto, a RT resulta da elevação nas concentrações intracelulares de Ca<sup>2+</sup> livre, sendo que aumentos neste parâmetro evidenciam uma dificuldade em reduzir os níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> àqueles observados em repouso. Condições de elevado influxo deste íon através da sarcolema, devido à alta frequência de estimulação, fazem com que o Ca<sup>2+</sup> permaneça disponível ao aparato contrátil mesmo após o

desenvolvimento da tensão. Entretanto, no presente estudo, os valores de RT não sofreram alteração significativa com a elevação da frequência de estimulação, não tendo sido evidenciado um relaxamento incompleto, mesmo nas tiras ventriculares dos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Isso sugere que a exposição ao HgCl<sub>2</sub> não resultou em comprometimento do relaxamento em função da elevação da frequência, ou seja, não houve uma incapacidade significativa da bomba de Ca<sup>2+</sup> do RS em transportar Ca<sup>2+</sup> nem da atividade de extrusão deste íon pela sarcolema nas frequências utilizadas frente a exposição ao HgCl<sub>2</sub>. Isso foi corroborado pela ausência de alteração na taxa de relaxamento (-dFc/dT) das tiras ventriculares desse grupo em resposta aos aumentos sucessivos da frequência de estimulação, o que pode refletir uma capacidade de controle de débito cardíaco através de ajustes cronotrópicos.

Com o aumento frequência de estimulação, as tiras ventriculares dos matrinxãs do grupo controle apresentaram redução significativa dos valores absolutos de THR e TPT a partir de 0,6 Hz, enquanto reduções na taxa de contração ou derivada máxima ocorreram somente acima de 1,2 Hz sem que nenhuma alteração tenha sido registrada para a taxa de relaxamento. Assim, apesar da redução progressiva dos valores absolutos de TPT e THR, a eficiência dos mecanismos contráteis é mantida até 1,2 Hz, o que é corroborado pela redução dos valores de capacidade de bombeamento cardíaco acima dessa frequência de estimulação, conforme discutido posteriormente. Essa redução da derivada máxima se opõe ao aumento nos valores de dF/dT registrados para a cavala, *Scomber japonicus* (SHIELS & FARREL, 2000), um membro da família Scombridae, que inclui espécies com adaptações morfológicas e fisiológicas para uma rápida performance natatória e estilo de vida migratório (LANDEIRA-FERNANDEZ et al., 2004). Tais espécies apresentam uma relação força-frequência positiva e ausência de uma de fase descendente na curva de CBC em altas frequências. Esses resultados mostram que *B. amazonicus* e *S. japonicus* adotam diferentes estratégias para manter o acoplamento excitação contração: os ajustes cronotrópicos mantêm a eficiência da bomba cardíaca em *S. japonicus*, enquanto que a modulação inotrópica para ser mais importante para o *B. amazonicus*.

Em relação aos efeitos da rianodina, ressaltou-se até aqui sua ação em reduzir o desenvolvimento da Fc tanto nas tiras ventriculares do grupo Ct quanto do HgCl<sub>2</sub>. A adição de rianodina também promoveu em ambos os grupos experimentais elevações nas razões TPT/Fc e THR/Fc e concomitantes reduções nas taxas de contração (dFc/dT) e relaxamento (-dFc/dT). Pelo fato da rianodina promover a perda de função do RS e como esta organela fornece uma quantidade significativa do Ca<sup>2+</sup> ativador para o aparato contrátil, tais alterações já eram esperadas lentificando a contração e relaxamento. Por outro lado, apenas no grupo HgCl<sub>2</sub> a adição da rianodina resultou em redução nos valores absolutos de TPT e THR em todas as frequências de estimulação testadas enquanto que no grupo Ct nenhuma diferença foi observada conforme anteriormente discutido.

Como na presença de rianodina, é o influxo transsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  responsável pela contração, parece que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , de alguma forma favorece a atividade da sarcolema, situação não evidenciada quando o RS está funcional e representa o maior contribuidor de  $\text{Ca}^{2+}$  a maquinaria contrátil. A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L e a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  mais acelerada do citosol pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema e/ou do trocador NCX parece ser de alguma forma favorecida pelo  $\text{HgCl}_2$ . Oliveira e colaboradores (1994) também encontraram valores reduzidos de TPT em músculos papilares de ratos submetidos a concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$ . Conforme descrito anteriormente, apesar de algumas evidências apontarem para um efeito do  $\text{HgCl}_2$  em reduzir a entrada e saída de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema, via ação da PKC, o estresse oxidativo e o aumento da produção de ERO também podem acelerar esses mecanismos pelo aumento da atividade do trocador NCX e a intensidade da corrente dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L através da oxidação de resíduos de cisteínas presentes em suas estruturas (BURLANDO et al., 2004; HOOL et al., 2007). Lopes (2009) demonstrou que o bloqueio do trocador NCX pelo lítio em tiras ventriculares de matrinxã não altera os valores de Fc e TPT, porém aumenta significativamente o valor do THR mostrando a importância desse trocador no processo de relaxamento muscular. Dessa forma, o trocador NCX parece ter um importante papel no relaxamento, enquanto que o RS apresenta papel conspícuo na contração do músculo cardíaco dessa espécie.

O índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) é o produto da frequência de estimulação e da força de contração (MATIKAINEN & VORNANEN, 1992), integrando, portanto, os efeitos de mudanças na força isométrica e na frequência de contração. Pode ser utilizada como um índice da performance (“power output”) de preparações musculares isoladas, proporcionando uma forma integrativa de comparação entre frequência e efeitos do Hg na performance ventricular. Além disso, proporciona uma forma de se avaliar a frequência de estimulação na qual a capacidade de bombeamento cardíaco é máxima. De acordo com SHIELS et al. (1999), a análise do pico da CBC *versus* a frequência de estimulação sugere a existência de uma frequência ótima para o desempenho cardíaco.

Para os matrinxãs, os valores máximos da CBC foram obtidos entre 1,2 e 1,8 Hz (72 a 108 bpm) no grupo controle e em 1,6 Hz (96 bpm) no grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  (frequência máxima alcançada pelas tiras ventriculares). Considerando-se que a frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$ ) registrada para matrinxãs controles em normóxia é de aproximadamente 1,0 Hz (65 bpm) e para os matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  é de 73 bpm (para detalhes ver capítulo VIII), é possível sugerir que *in vivo* os miócitos cardíacos não trabalham na sua faixa ótima de frequência cardíaca para ajustes do débito e, portanto, da performance cardíaca. A exposição ao metal deslocou a curva de frequência ótima para baixo, devido seu efeito negativo no desenvolvimento de tensão isométrica, mostrando que a capacidade de bombeamento foi prejudicada pela exposição ao

HgCl<sub>2</sub>. Devido ao importante papel do RS como fonte de Ca<sup>2+</sup> para a contração a presença de rianodina também deslocou para baixo as curvas de CBC tanto no grupo Ct quanto no HgCl<sub>2</sub>.

Cabe ressaltar que no protocolo força frequência não foi adicionado adrenalina em concentrações tônicas e elevadas que podem modificar a curva de CBC. A concentração de adrenalina presente no plasma de uma variedade de peixes sob condições de estresse é da ordem de 10<sup>-6</sup> M, enquanto um nível tônico de adrenalina em torno de 10<sup>-9</sup> M é observado quando estes animais estão em repouso (SHIELS et al., 1998). Entretanto, Olle (2007) verificou que o músculo cardíaco do matrinxã é insensível a doses crescentes de adrenalina de 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-5</sup> M no meio extracelular, ou seja, a adrenalina não exerceu efeito inotrópico positivo em nenhuma das concentrações utilizadas. Além disso, a adrenalina falhou em acelerar os tempos de contração e relaxamento cardíaco nesta espécie.

A capacidade do músculo cardíaco de manter a performance dos batimentos em condições fisiológicas adversas é umas das mais importantes características desenvolvidas pelos vertebrados para a sobrevivência quando submetidos a estresses ambientais (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Conseqüentemente, ajustes eficientes do débito cardíaco em resposta aos xenobióticos, alcançado através de mudanças no volume da contração e/ou no ritmo cardíaco são cruciais. Com uma redução da capacidade de aumentar a performance cardíaca em resposta à presença de um xenobiótico por uma limitação estritamente energética, como inotropismo cardíaco sendo prejudicado e insuficiente para que se desenvolvam elevadas frequências de contração, o animal se torna incapaz de aumentar seu débito cardíaco e desenvolver uma performance cardíaca que pudesse permitir que se afastasse do agente estressor.

A exposição ao Hg afeta amplamente o balanço celular do cálcio, tanto direta quanto indiretamente, ao aumentar a produção das EROs que estão envolvidas na regulação da sinalização do Ca<sup>2+</sup> e na peroxidação lipídica e protéica (HIDALGO & DONOSO, 2008; TAN et al., 1993); ou através da inibição dos canais de Na<sup>+</sup> e de Ca<sup>2+</sup>, da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, da Ca<sup>2+</sup> ATPase, miosina ATPase, entre outras ações do Hg nas vias de transdução de sinal (AHAMMAD-SAHIB et al., 1988; ANNER et al., 1992; HALBACH et al., 1981; HECHENBERG & BEYERSMANN, 1991; HISATOME et al., 2000; OLIVEIRA et al., 1994; REDDY et al., 1988; SALONEN et al., 1995; SOUZA de ASSIS et al., 2003; VASSALO et al., 1996; WANG & HORISBERGER, 1996). Dessa forma, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> acaba modificando a importância relativa de cada componente celular como fornecedor de cálcio para o aparato contrátil, reduzindo a capacidade de bombeamento cardíaco.

O matrinxã, *Brycon amazonicus*, é uma espécie migratória e reofílica que prefere águas limpas e bem oxigenadas, apresentando capacidade de nadar longas distâncias a fim de se reproduzir (ARBELÁEZ-ROJAS & MORAES, 2009; HOWES, 1982; VILLACORTA CORREA, 1987; ZANIBONI FILHO, 1985). Assim essa espécie deve apresentar uma demanda de O<sub>2</sub> e

nutrientes elevada e, portanto, uma alta taxa metabólica. Conforme será detalhado no capítulo VIII, o valor de taxa metabólica do matrinxã em normóxia é de  $\sim 112 \text{ ml O}_2 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . É de se esperar também que a espécie possua em eficiente bomba cardíaca e que explore a possibilidade de elevação da frequência cardíaca como uma forma de ajustar o fluxo sanguíneo às situações que exijam uma atividade maior ainda, como na piracema.

O débito cardíaco deve ser regulado para manter um fluxo sanguíneo apropriado para o músculo em exercício, cérebro e outros tecidos sob uma variedade de condições. Segundo Farrel & Jones (1992), na maioria dos peixes essa regulação do débito cardíaco é mediada por alterações no volume sistólico, ao invés de dar-se, como em mamíferos, através do controle da frequência cardíaca. Isso significa que a modulação da força de contração, nestas espécies, é a principal responsável pelos ajustes do débito cardíaco. A força de contração pode ser modulada por mudanças nas propriedades de ligação das proteínas contráteis ao cálcio e alterações na disponibilidade e na concentração de cálcio para a contração. Um dos principais mecanismos de toxicidade do mercúrio está associado à homeostasia do cálcio (ERCAL et al., 2001), tanto em relação ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  como a manutenção da sua concentração no interior das células, motivo pelo qual se torna importante o conhecimento dos efeitos do Hg sobre o acoplamento E-C no miocárdio de peixes brasileiros, que enfrentam diferentes demandas e apresentam diferentes estratégias fisiológicas frente aos diferentes regimes a que são impostos.

Por tudo o que foi que foi discutido até o momento, as reduções no desenvolvimento de força, nas taxas de contração e relaxamento, na frequência de contração máxima e na capacidade de bombeamento cardíaco causadas pela exposição ao  $\text{HgCl}_2$  em matrinxã evidenciaram prejuízos no desempenho cardíaco normal. Tais efeitos, em condições naturais, podem afetar significativamente o sucesso e a sobrevivência da espécie em questão. Considerando que, no ambiente, a presença deste metal pode ocorrer concomitantemente com alterações em outros parâmetros ambientais como, por exemplo, uma reduzida disponibilidade de  $\text{O}_2$ , o que imporá uma demanda ainda maior ao coração destes peixes, cujo funcionamento já estaria comprometido pelos efeitos do Hg acima discutidos.

### 4.3 Tensão pós-reposo

Estudos utilizando microscopia eletrônica mostraram a existência de grandes diferenças no grau de desenvolvimento do retículo sarcoplasmático (RS) do músculo cardíaco de diferentes espécies de peixes (SANTER, 1985). Apesar dessas diferenças, o RS cardíaco de peixes é em geral menos desenvolvido anatomicamente e menos importante para o acoplamento

E-C do que o RS de mamíferos. Em bacalhau, *Gadus virens*, por exemplo, o RS corresponde a 0,6% do volume do miócito, enquanto que em mamíferos estes valores variam de 3,5% a 7% do volume do miócito (HELLE, 1983; LEKNES, 1984).

O desenvolvimento de força do primeiro batimento após um período de repouso está relacionado com o preenchimento das reservas intracelulares de cálcio, especialmente do RS, durante uma pausa diastólica prolongada e não-fisiológica (COSTA et al., 2002). A utilização do RS como armazenador e fornecedor de cálcio para o aparato contrátil varia grandemente entre as classes de vertebrados, entre diferentes espécies de um mesmo grupo filogenético e até mesmo entre as fases do desenvolvimento ontogenético de um indivíduo (BERS, 2001).

Na maioria das espécies de teleósteos já estudados, principalmente de ambientes temperados, a corrente de cálcio através dos canais tipo L da sarcolema contribui com a maior parte do cálcio ativador da contração (TIBBITS et al., 1992; VORNANEN, 1997; 1998). Esta afirmação encontra-se fundamentada em algumas características do tecido cardíaco de peixes, como: 1) miócitos de pequeno diâmetro, facilitando a ativação dos miofilamentos pelo influxo transsarcolemal de  $Ca^{2+}$  e 2) ausência de sensibilidade à rianodina (conhecida por seu efeito inibidor da função do RS) sobre a contração cardíaca, tanto *in situ* quanto em preparações multicelulares (DRIEDZIC & GESSER, 1988; 1994; HOVE-MADSEN, 1992; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992). Entretanto, em algumas espécies de peixes como o atum e o pacu, o RS, sob determinadas condições (temperaturas supra-fisiológicas e frequência de estimulação sub-fisiológica), pode atuar como a principal fonte de  $Ca^{2+}$  sistólico (KEEN et al., 1992; SHIELS et al., 1999; SHIELS & FARRELL, 2000; ANELLI-Jr. et al., 2004). Isso sugere que, em peixes, à medida que a velocidade de contração aumenta, o RS é mais necessário e importante fornecedor de  $Ca^{2+}$  ao aparato contrátil que a difusão do íon pela sarcolema.

A rianodina tem sido utilizada em estudos sobre a funcionalidade do RS como fornecedor de  $Ca^{2+}$  ao aparato contrátil por bloquear a função do RS mantendo aberto ou fechando completamente os canais de  $Ca^{2+}$  dessa organela também denominados receptores de rianodina (RyR). A musculatura cardíaca de várias espécies de peixes como a carpa cruciana, *Carassius carassius* (VORNANEN, 1989), o “sea-raven”, *Hemitripterus americanus*, o bacalhau, *Gadus morhua* (DRIEDZIC & GESSER, 1988), a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (COSTA et al., 2000), e o amborê de poças de maré, *Bathygobius soporator* (RANTIN et al., 1998), têm sido descritas como insensíveis à rianodina. Por outro lado, em espécies ativas, a rianodina reduziu o desenvolvimento de força em 20% na cavala do pacífico, *Scomber japonicus* (SHIELS & FARRELL, 2000), em 30% no atum “skipjack”, *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al., 1992), em 25% no muçum, *Synbranchus marmoratus* (ROCHA et al., 2007) e em 40% no atum “yellowfin”, *Thunnus albacares* (SHIELS et al., 1999) e no pacu, *Piaractus mesopotamicus* (ANELLI-Jr. et al., 2004). Hove-Madsen et al. (1998) e Hove-Madsen & Tort (1998) trabalhando com células isoladas

do músculo ventricular de truta, observaram que a corrente através dos canais de cálcio do tipo L é insuficiente para ativar completamente a contração e que o RS é capaz de participar da regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico durante o acoplamento EC na temperatura de aclimação.

Olle (2007) também demonstrou que a contração ventricular de *B. amazonicus* é dependente dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  uma vez que foi observado o desaparecimento da potenciação pós-pausa da tensão isométrica ao utilizar-se a rianodina. A evidência de um RS funcional também foi descrita para tiras ventriculares do pacu (ANELLI-Jr. et al., 2004), do curimatá e do cascudo (RIVAROLI et al., 2006) e do muçum (ROCHA et al., 2007), espécies tipicamente neotropicais. Assumindo que, como em mamíferos, a mitocôndria não seja importante para suplementar o  $\text{Ca}^{2+}$  ativador do aparato contrátil e que as características de ligação da rianodina sejam similares em mamíferos e em peixes, o  $\text{Ca}^{2+}$  responsável pela ativação da contração no coração de *B. amazonicus*, assim como no atum, pacu, muçum, curimatá e cascudo, deve vir de pelo menos duas fontes: o meio extracelular e o RS. Evidências recentes indicam que a contribuição do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil é variável e, em alguns casos, pode tornar-se a principal fonte de cálcio ativador no miócito cardíaco de peixes (VORNANEN et al., 2002).

A caracterização da potenciação pós-pausa pode fornecer informações úteis sobre os mecanismos básicos de controle da contração do músculo cardíaco tais como: o grau de participação dos estoques intracelulares como fornecedores do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador durante a contração, e a atividade do NCX (VASSALO et al., 1990). A potencialização da primeira contração após uma pausa depende, basicamente, da maior quantidade de cálcio armazenada no RS, permitindo, assim, uma avaliação indireta da funcionalidade desta organela (MILL et al., 1992; VASSALO et al., 1990). Como já discutido anteriormente, existem proeminentes diferenças espécie-específicas no processo de AEC e no papel relativo das fontes intra e extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  entre peixes teleósteos. Em algumas espécies de peixes, o RS de miócitos ventriculares e/ou atriais sob certas circunstâncias pode representar a maior fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico. Estas diferenças interespecíficas constituem uma estratégia evolucionária para a adaptação a diferentes habitats e a diferentes modos de vida. Existem também diferenças interespecíficas na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$ -induzida, dependendo das mudanças crônicas ou agudas da temperatura (TIITU, 2002).

Durante a pausa, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser bombeado para fora da célula pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  transsarcolemal ou pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) ou, ainda, ser estocado em compartimentos intracelulares como o RS. Quando tiras ventriculares e músculos papilares de ratos são submetidos a pausas diastólicas, o RS armazena  $\text{Ca}^{2+}$  suficiente para potencializar a primeira contração pós-pausa, sendo que esta potenciação perdura geralmente pelas próximas 15 contrações (VASSALO et al., 1996). Apesar da maioria dos estudos utilizarem pausas diastólicas

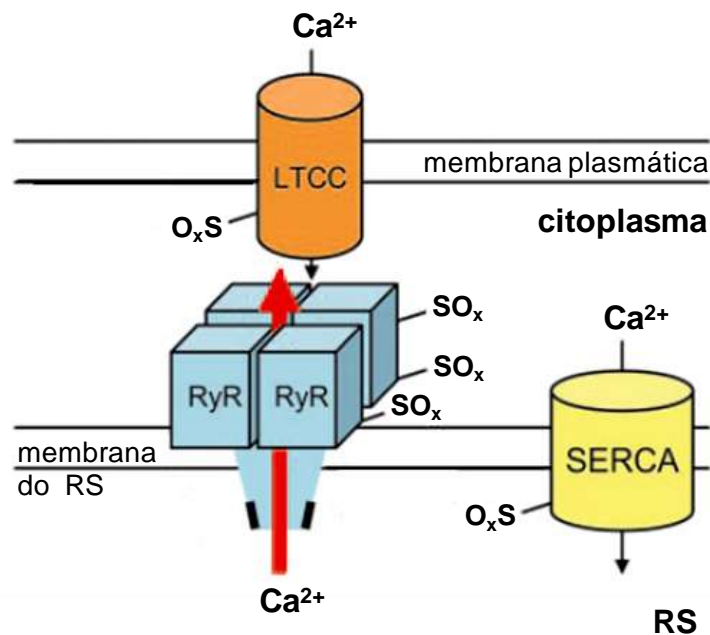


prolongadas e, portanto, não fisiológicas, esse fenômeno tem sido uma ferramenta útil para a verificação da funcionalidade do RS sob diferentes circunstâncias.

No presente estudo, tanto a pausa prolongada de 5 min como as pausas de 10, 30 e 60 segundos promoveram um significativo aumento na tensão isométrica das tiras ventriculares de matrinxã, tanto dos grupos controle quanto dos expostos ao HgCl<sub>2</sub>. A potenciação mais pronunciada, de aproximadamente 30%, foi registrada após a pausa de 300 segundos nas tiras ventriculares dos matrinxãs do grupo controle. A exposição ao HgCl<sub>2</sub> não aboliu totalmente a potenciação pós-pausa, mas a reduziu significativamente após pausas de 30, 60 e 300 segundos o que sugere uma provável redução da atividade da SERCA. Uma vez que as contrações obtidas após pausas diastólicas têm maior dependência da liberação de Ca<sup>2+</sup> pelos seus estoques intracelulares do que pelo influxo deste íon pela sarcolema, depreende-se que o RS parece ser funcionalmente importante para o manejo de Ca<sup>2+</sup> no acoplamento E-C do músculo cardíaco de *B. amazonicus* mesmo após a exposição aguda ao HgCl<sub>2</sub>. Em miocárdio e em músculo papilar de ratos, o HgCl<sub>2</sub> também induziu uma redução da potenciação pós-pausa de maneira dose-dependente (OLIVEIRA et al. 1994; VASSALO et al., 1996). Essa redução progressiva da potenciação pós-pausa com o aumento da concentração do metal sugere que a captação de Ca<sup>2+</sup> pelo RS está reduzida. Essa pequena diminuição na atividade da bomba de Ca<sup>2+</sup> do RS diminui a quantidade de cálcio ativador disponível para a liberação pelo RS na próxima contração. Brunder et al. (1998) também verificaram que o HgCl<sub>2</sub>, agudamente e em altas concentrações, foi capaz de bloquear a liberação de Ca<sup>2+</sup> - Ca<sup>2+</sup> induzida pelo RS e inibir a SERCA.

Alguns estudos sugerem que o Hg age nos canais de Ca<sup>2+</sup> do RS (canais de rianodina) que se abrem na dependência de radicais -SH, aumentando a liberação de cálcio quando afetados pelo metal (ABRAMSON & SALAMA, 1989; AOKI et al., 1985; PRABHU & SALAMA, 1990). O Hg teria, então, um duplo efeito sobre o RS, aumentando a velocidade de liberação de Ca<sup>2+</sup> e reduzindo a captação de Ca<sup>2+</sup> pela inibição da SERCA. Isso explicaria o fato da exposição ao HgCl<sub>2</sub> não abolir a potenciação pós-pausa no presente trabalho. Assim, ao mesmo tempo em que o HgCl<sub>2</sub> inibiria a SERCA diminuindo a potenciação, aumentaria a velocidade de liberação de Ca<sup>2+</sup> pelo RS, não a abolindo completamente.

Outra hipótese é que o HgCl<sub>2</sub> poderia contribuir para um vazamento de Ca<sup>2+</sup> do RS pela indução de estresse oxidativo. Segundo Zimmet & Hare (2006) e conforme mostrado na figura 18, a oxidação de múltiplos resíduos de cisteína dos receptores de rianodina (RyR) do RS leva a ativação irreversível do canal, situação que favorece o vazamento de Ca<sup>2+</sup> do RS e sua depleção conduzindo a uma perda da capacidade do controle regulatório. O tetrâmero do receptor de rianodina tem 84 resíduos de cisteína livres, 21 por subunidade (MEISSNER, 2004). Adicionalmente, os canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L e a SERCA também são regulados por mecanismos-redox nos grupamentos tióis (-SH) dos resíduos de cisteínas dessas estruturas. A oxidação



irreversível de resíduos de cisteínas da estrutura protéica da SERCA pode levar a sua inativação (DREMINA et al., 2007).

**Figura 18** – Esquema ilustrando o excesso da oxidação nos múltiplos grupamentos tióis (-SH) dos receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático o que leva a ativação irreversível do canal e vazamento do  $\text{Ca}^{2+}$ . RS: retículo sarcoplasmático; RyR: receptor de rianodina do RS; SERCA:  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RS; LTCC: canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L da membrana plasmática;  $\text{SO}_x$ : grupos tióis oxidados. Adaptado de Zimmet & Hare (2006).

No miocárdio, a grande maioria desses grupos tióis é mantida no seu estado reduzido, pois as células mantêm um ambiente redutor através da ação de agentes redutores como a GSH e o NADH (MORAD & SUZUKI, 2000). Condições oxidantes estimulam a oxidação da GSH e formação da GSSG, afetando a sensibilidade dos RyR ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a sua afinidade a calmodulina (BALSHAW et al., 2001). No presente trabalho, como o  $\text{HgCl}_2$  induziu estresse oxidativo no miocárdio de matrinxã com aumento nos níveis de peroxidação lipídica e protéica e no conteúdo de GSSG e tendência de redução da razão GSH:GSSG, esse vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS pela oxidação de grupamentos -SH nos receptores de rianodina pode ser uma das causas da menor potenciação pós-pausa exibida pelas tiras ventriculares dos peixes expostos ao metal. Assim, essa ativação irreversível dos RyR induzida pelo  $\text{HgCl}_2$  via estresse oxidativo levaria a uma restauração incompleta dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior do RS durante as pausas diastólicas aplicadas, fazendo com que a potenciação da Fc pós-pausa fosse inferior àquela exibida pelas tiras ventriculares do grupo Ct devido a uma menor liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS imediatamente

após a primeira estimulação elétrica. A própria oxidação das cisteínas da SERCA levando a redução da sua atividade também não pode ter contribuído para a menor potenciação pós-pausa no miocárdio dos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> e, portanto, sob estresse oxidativo.

Portanto, a menor potenciação pós-pausa da Fc após a exposição ao HgCl<sub>2</sub> parece ser decorrente da menor capacidade de transporte dos mecanismos responsáveis pela liberação e retirada de Ca<sup>2+</sup>, diminuindo, assim, o Ca<sup>2+</sup> acumulado no RS. Os resultados obtidos são indicativos de que a espécie apresenta um RS bem desenvolvido e/ou funcional podendo, potencialmente, contribuir para o manejo de Ca<sup>2+</sup> no seu músculo cardíaco em termos de acumulação e liberação deste íon, reduzindo assim as distâncias difusionais mesmo em situações de estresse, como a exposição ao HgCl<sub>2</sub>, nas quais este animal pode enfrentar em seu habitat. No entanto, a presença de um RS funcional a frequências de estimulação sub-fisiológicas, conforme demonstrado pelo aumento da sua contribuição para o desenvolvimento de força após aumentos da duração da pausa diastólica, não implica necessariamente que esta organela contribua para a geração de força nas frequências observadas *in vivo*, condição esta que será analisada a seguir.

As mensurações das potenciações pós-pausa visam avaliar a atividade do RS, tanto a magnitude da liberação de cálcio ativador quanto, juntamente com os dados obtidos de tempo de relaxamento, a capacidade de recaptar cálcio (MILL et al., 1994). No presente estudo, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> induziu uma reduções significativas nas taxas de contração e relaxamento da primeira contração após as pausas diastólicas testadas sem alterar os valores absolutos de TPT e THR, semelhante aos resultados observados nos protocolos de efeito do tempo e força-frequência. Dessa forma, o HgCl<sub>2</sub> não só reduziu a potenciação pós-pausa como também lentificou a ciclagem do Ca<sup>2+</sup> ativador corroborando a hipótese de que o metal age sobre o RS promovendo um vazamento de Ca<sup>2+</sup> e/ou reduzindo a atividade da SERCA. Embora a exposição ao HgCl<sub>2</sub> tenha reduzido a Fc desenvolvida pelo miocárdio de matrinxã e reduzido a potenciação pós-pausa, não se pode afirmar que o HgCl<sub>2</sub> tenha seu efeito principal no RS, pois o mesmo pode afetar grandemente o balanço celular do cálcio, tanto diretamente quanto indiretamente, por sua ação sobre a Ca<sup>2+</sup>-ATPase da membrana celular, a bomba de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase, ATPase miosina, além de promover estresse oxidativo, entre outros múltiplos efeitos anteriormente discutidos.

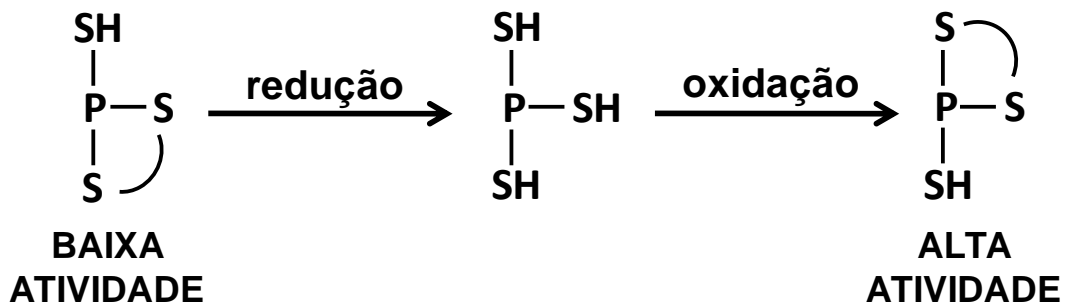
Para melhor avaliar a influencia do HgCl<sub>2</sub> sobre a função do RS, foram realizados experimentos utilizando o alcalóide rianodina, capaz de bloquear o RS e fornecer, assim, uma medida indireta da importância funcional no acoplamento E-C. A adição da rianodina aboliu completamente e igualmente a potenciação pós-pausa tanto no grupo Ct quanto no HgCl<sub>2</sub>, não havendo diferenças entre os grupos. Uma vez que o desenvolvimento de um aumento da força no primeiro batimento após um período de repouso está relacionado com o preenchimento das reservas intracelulares de Ca<sup>2+</sup> durante uma pausa diastólica não fisiológica e prolongada, depreende-se que o RS parece ser funcionalmente importante para o manejo de Ca<sup>2+</sup> no

acoplamento E-C do músculo cardíaco de *B. amazonicus* mesmo após a exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$ . A sensibilidade a rianodina pode ser frequência-dependente, como na truta arco-íris, sendo mais elevada em frequências sub-fisiológicas (HOVE-MADSEN et al., 1998). Entretanto, isso não foi observado no presente estudo, pois a relação força-frequência, discutida no item anterior, mostrou que a rianodina diminui a Fc no grupo Ct de maneira aproximadamente igual (de 16 a 21%) em todas as frequências de estimulação testadas.

A adição de rianodina diminuiu as derivadas máximas e mínimas das ondas de contração isométrica obtidas após pausas diastólicas de 10 a 300 s provavelmente devido à inibição do RS. Como uma grande porção do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador provém dos estoques intracelulares nesta espécie, é de se esperar que a rianodina diminua as taxas de contração e relaxamento tanto no grupo Ct quanto no  $\text{HgCl}_2$ . Entretanto, no grupo  $\text{HgCl}_2$ , a adição de rianodina também reduziu os valores de THR das contrações pós-pausas, ou seja, o tempo para 50% do relaxamento nessas tiras ventriculares foi menor do que aquele exibido pelas tiras controles sob as mesmas condições. Na presença de rianodina, a primeira contração após pausas diastólicas depende principalmente do influxo transsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que o alcalóide depleta os estoques intracelulares do íon por se ligar aos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Dessa forma, a presença do  $\text{HgCl}_2$  parece favorecer a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema quando a contração depende exclusivamente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, apesar da presença da rianodina promover reduções nas taxas de contração e relaxamento no pós-pausa. A retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  mais acelerada do citosol pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema e/ou do trocador NCX parece ser de alguma forma favorecida pela exposição ao  $\text{HgCl}_2$ .

Burlando e colaboradores (2004) mostraram que no mexilhão, *Mytilus galloprovincialis*, a exposição a 1,3  $\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  aumentou a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática da glândula digestiva com atividade máxima em 96 horas de exposição. Por outro lado, o trocador NCX parece exibir uma regulação redox-sensível (HIDALGO & DONOSO, 2008). Goldhaber (1996), utilizando a técnica de “patch-clamp”, demonstrou que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o ânion superóxido gerado pela xantina oxidase também foram capazes de aumentar a atividade do NCX em miócitos ventriculares isolados de coelho.

Em músculo cardíaco, a atividade do trocador aumenta após a exposição de vesículas sarcolemas isoladas a GSH+GSSG, sugerindo que o intercâmbio tiol-dissulfeto ativa a proteína (REEVES et al., 1996). De acordo com esses autores, esse intercâmbio poderia alterar a conformação do carreador do trocador NCX de uma forma menos ativa para uma forma mais ativa conforme exibido pela figura 19. De acordo com Santacruz-Tolosa et al. (2000), a estimulação redox do trocador NCX acontece pelo deslocamento da ligação dissulfeto entre a cisteína de posição 792 e outra cisteína de posição 14 ou 20.



**Figura 19** – Esquema evidenciando a alteração da atividade do trocador NCX através do intercâmbio tiol-dissulfeto pela modulação redox. P representa a proteína carreadora do trocador. Adaptado de Reeves et al. (1996).

O fato do  $\text{HgCl}_2$  favorecer a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema quando a contração depende exclusivamente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, não aparece nos demais protocolos provavelmente em decorrência da grande importância do RS para a contração discutida a seguir. Parece que a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada pelo RS durante cada contração se sobrepõe ao influxo transsarcolemal deste íon e parece encobrir o efeito do  $\text{HgCl}_2$  na sarcolema. Adicionalmente, o próprio aumento da peroxidação lipídica induzida pelo  $\text{HgCl}_2$  no miocárdio dos matrinxãs poderia acelerar o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , reduzindo o THR no pós pausa, por alterar a permeabilidade/seletividade da membrana.

#### 4.4 Papel do RS

O tempo e a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ciclado a cada batimento dependem diretamente da atividade dos mecanismos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , que variam entre a espécie (GWATHMEY & MORGAN, 1991; VORNANEN, 1998). De fato, diversas diferenças fisiológicas existem, e entre elas, os mecanismos responsáveis pela ciclagem de  $\text{Ca}^{2+}$  é que determinarão o padrão das respostas inotrópicas de cada espécie.

A representação gráfica (fig. 16) da contribuição relativa do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado no RS para geração de Fc e CBC em função das diferentes frequências de estimulação testadas revela que no ventrículo de matrinxã, há uma contribuição significativa do RS para o fornecimento do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador que supera a participação dos mecanismos sarcolemais como canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do

tipo L e trocador NCX atuando no modo reverso. Nos matrinxãs controles, na frequência cardíaca registrada *in vivo* para esses animais de aproximadamente 65 bpm, o RS representa uma contribuição relativa de cerca de 80% do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador reponsável pelo desenvolvimento da Fc e da CBC. Já para os matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , na frequência cardíaca registrada *in vivo* de aproximadamente 73 bpm, essa contribuição relativa do RS foi de cerca de 60%.

Assim, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  reduziu significativamente essa contribuição do RS tornando-a semelhante a contribuição do influxo sarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  a frequências de estimulação abaixo de 60 bpm para o desenvolvimento da Fc e abaixo de 48 bpm para a manutenção da CBC. Acima de tais frequências, o papel do RS parece se sobrepor à entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema, porém ainda a um nível proporcionalmente muito menor que aquele observado para os matrinxãs controles.

Dessa forma, os resultados observados no presente estudo permitem sugerir que o  $\text{HgCl}_2$  impacta negativamente o RS podendo provocar vazamento do  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais de rianodina e/ou redução da atividade da SERCA conforme anteriormente discutido. O RS parece já ter perdido sua importância na presença do  $\text{HgCl}_2$ , pois a adição de rianodina não resultou em um prejuízo ainda mais acentuado da Fc e da CBC em relação as tiras ventriculares do grupo Ct que também foram tratadas com o alcalóide. Isso permite sugerir que o efeito negativo do  $\text{HgCl}_2$  sobre o RS parece ser um mecanismo importante para seu o efeito inotrópico negativo, reduzindo a contratilidade miocárdica. Cabe ressaltar que o matrinxã é uma espécie muito ativa e a presença de um RS funcional justificaria a capacidade de manter adequadas taxas de força e frequência de contração cardíacas durante o exercício intenso, principalmente durante a piracema.

#### 4.5 Massa ventricular relativa (MVR)

A exposição por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$  não foi capaz de promover alterações na MVR dos matrinxãs e também não foi detectada diferença na massa das tiras ventriculares utilizadas nos diferentes protocolos experimentais. Alguns trabalhos na literatura mostram que, em ratos, tanto o mercúrio orgânico como o inorgânico são capazes de alterar o peso do coração. Ratos expostos a doses diárias de metilmercúrio por 21 dias (1; 2,5 e 5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ), iniciando-se o tratamento no primeiro dia após o nascimento, apresentaram um rápido crescimento e desenvolvimento tecidual do coração, acompanhado por hipertrofia cardíaca quando adultos (BARTOLOME et al., 1982). Já o cloreto de mercúrio (0,5; 1 e 2,5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) provocou um aumento inicial do peso do coração com subsequente diminuição a valores menores que de ratos controles (BARTOLOME et al., 1984).

No presente estudo, a ausência de alteração da MVR pode estar relacionada ao tempo de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ . Quando se tornam necessários aumentos da performance cardíaca em função da exposição a xenobióticos, muitas vezes acaba-se por observar uma hipertrofia cardíaca, evidente após a exposição crônica a poluentes (CALORE et al., 2007), resultando em um aumento do volume sistólico. Dessa forma, a ausência de diferenças entre os valores da massa ventricular relativa observada no presente estudo não é surpreendente, tendo-se em vista a que exposição ao  $\text{HgCl}_2$  foi realizada de forma aguda (96 h). A MVR aqui observada foi semelhante àquela descrita para diversas espécies de peixes, como o marlin azul do Pacífico, *Makaira mazara* (0,09%; DAVIE, 1987), a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (0,08%; FARRELL et al., 1988).

Por outro lado, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  diminuiu o comprimento máximo de estiramento para se atingir pico de tensão. O mecanismo de auto-regulação heterométrica do coração é mais comumente conhecido como lei de Frank-Starling, que é a modulação da força de contração pelo estiramento dos sarcômeros, proporcionando ao coração gênese de força suficiente para bombear mais sangue em resposta ao aumento do retorno venoso e da pressão diastólica final do ventrículo (KONHILAS et al., 2002). O estiramento promove melhor interação entre os miofilamentos e compressão lateral dos filamentos transversos, aumentando a interação acto-miosínica.

Outra hipótese é que o efeito inotrópico promovido pelo estiramento pode ser devido a uma maior liberação mioplasmática de cálcio e ao aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (SCHNEIDER et al., 2006). O menor comprimento atingido pelas tiras ventriculares do grupo  $\text{HgCl}_2$  provavelmente está relacionado ao menor valor de RT exibido por essas tiras, o que indica uma redução da sensibilidade dos miofilamentos ao íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Conforme anteriormente discutido, o desenvolvimento da Fc é modulado pelas interações das pontes cruzadas e pela cooperatividade entre a formação dessas pontes. Assim, uma diminuição na RT indica uma alteração na relação comprimento-tensão do sarcômero implicando em alteração da responsividade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  seja pela alteração no complexo troponina ou na proteína titina (SCHNEIDER et al., 2006).

Adicionalmente, as tiras cardíacas do grupo  $\text{HgCl}_2$  necessitaram de um período maior para a estabilização e apresentaram muitas contrações espontâneas quando estimuladas numa frequência sub-fisiológica o que aponta para um possível efeito do metal nas células marcapasso espalhadas pelo ventrículo alterando o limiar do potencial das mesmas. Segundo Jungwirth et al. (1991) o Hg aumenta a condutância da membrana celular ao íon  $\text{K}^+$ , o que pode causar as contrações espontâneas aqui observadas.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, sobre os efeitos do  $\text{HgCl}_2$  no acoplamento E-C de *B. amazonicus* são sumarizados no esquema proposto na figura 20.

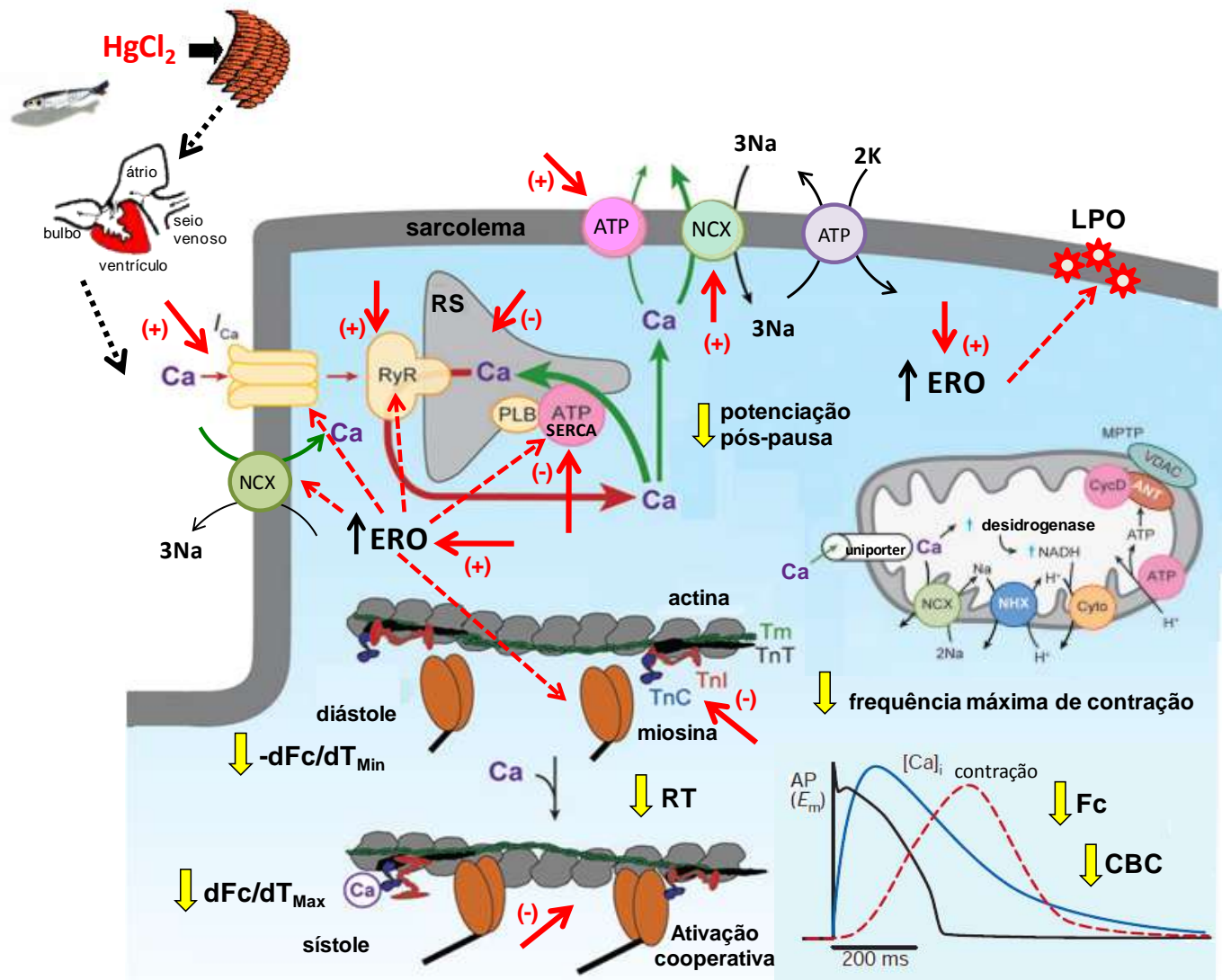
Os resultados evidenciaram que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  limitou a manutenção da performance cardíaca de matrinxã, mesmo na frequência cardíaca fisiológica, prejudicando o acoplamento E-C ao promover: redução da força de contração, uma ciclagem de cálcio mais lenta no interior dos miócitos levando a um déficit nas taxas de contração e relaxamento, redução da contribuição do RS como principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador ao aparato contrátil, diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, redução da CBC e da frequência de contração máxima atingida pelas tiras ventriculares deslocando as curvas de frequência ótima para baixo e para a esquerda, respectivamente.

O não funcionamento adequado do coração provocado pela presença do  $\text{HgCl}_2$ , em condições naturais, pode afetar significativamente o sucesso e a sobrevivência da espécie em questão, o que pode vir a ameaçar seu desenvolvimento e reprodução, comprometendo o estabelecimento de suas populações. Considerando que, no ambiente, a presença do  $\text{HgCl}_2$  pode ocorrer concomitantemente com alterações em outros parâmetros ambientais como, por exemplo, uma reduzida disponibilidade de oxigênio, pois tal situação imporia uma demanda ainda maior ao coração destes peixes, cujo funcionamento já estaria comprometido pelos efeitos do metal.

Os desvios na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  nos miócitos, como os induzidas pela exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , podem afetar a capacidade celular de manter e modular a sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  depois de um período de tempo, o que implicaria na perda da capacidade de regular o débito cardíaco por meio de ajustes inotrópicos, prejudicando o desempenho cardíaco normal. O débito cardíaco deve ser bem regulado a fim de manter um fluxo sanguíneo adequado, garantindo a distribuição de nutrientes essenciais, metabólitos, gases e outras substâncias de e para os diversos tecidos corporais como o músculo em exercício, cérebro e outros tecidos sob uma variedade de condições. Independentemente do fator determinante para a obtenção do débito cardíaco final, são necessários ajustes eficientes entre o volume sistólico e a frequência cardíaca a fim de que um animal poiquilotérmico possa apresentar uma resposta cardíaca adequada à sua sobrevivência no ambiente em questão.

Considerando-se que o fluxo sanguíneo é completamente diferente na condição de repouso, comparada às condições de exercício submáximo e máximo, um prejuízo no débito cardíaco induzido pelo  $\text{HgCl}_2$  torna-se ainda mais significativo para o matrinxã que é uma espécie considerada muito ativa e migratória pois durante atividade natatória intensa, a redistribuição do fluxo sanguíneo deve ser ajustada, de modo que os músculos em atividade recebam a maior proporção do débito cardíaco.

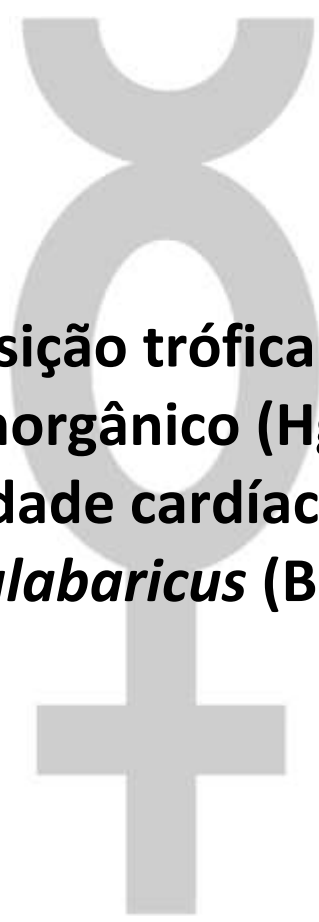




**Figura 20** - Diagrama ilustrativo dos possíveis efeitos de 96 horas de exposição a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  no acoplamento E-C (setas em vermelho) no miocárdio de matrinxã, *B. amazonicus* (Adaptado de BERS, 2002; 2008). As setas amarelas representam as alterações induzidas pelo  $\text{HgCl}_2$  nos parâmetros analisados.

## CAPÍTULO VII

**Efeitos da exposição trófica e sub-crônica ao  
mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre a  
contratilidade cardíaca da traíra,  
*Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**



## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao mercúrio (Hg), por via trófica, sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração (E-C) do miocárdio isolado de traíra, *Hoplias malabaricus*. Exemplares adultos de ambos os sexos, foram divididos em 2 grupos (n = 12). Um dos grupos foi utilizado como controle (Ct) e o outro foi exposto ao Hg via alimento (Hg). A exposição ao Hg, foi realizada por meio de uma dieta contendo exemplares vivos de alevinos (~ 6 g) de matrinxãs (*Brycon amazonicus*) que foram expostos por 96 h a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> em sistema estático. A contaminação trófica foi realizada durante um período de 30 dias, correspondendo a 10 doses (4 matrinxãs/traíra a cada 96 h, correspondendo a 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup>). Os animais controle foram alimentados na mesma proporção com alevinos de matrinxãs não expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Após o sacrifício, tiras ventriculares dos peixes de ambos os grupos experimentais foram preparadas para o registro da força de contração isométrica (Fc), tensão de repouso (RT), dos parâmetros tempo-dependentes (tempos para o pico máximo de tensão - TPT e para 50% de relaxamento - THR), das taxas de contração (dFc/dT) e relaxamento (-dFc/dT), da relação força-frequência, da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) e da potenciação pós-pausa, sendo todos os protocolos realizados na presença ou na ausência de 10 μM de rianodina (RIAN). A massa ventricular relativa (MVR) também foi avaliada nos peixes dos grupos Ct e Hg. A exposição trófica ao Hg causou redução significativa (p<0,05) na MVR (28%), na Fc (~20%), na dFc/dT (~35%) e na -dFc/dT (~32%) e na potenciação após pausa 300 s (~21%). Simultaneamente, o Hg elevou significativamente os valores absolutos de TPT (21%) sem alterar os valores de THR, além de aumentar significativamente os valores das razões TPT/Fc e THR/Fc devido ao seu efeito inotrópico negativo. O Hg, via dieta, ainda reduziu a CBC (~ 32%) e a frequência de contração máxima atingida pelas tiras ventriculares (frequência máxima de 96 bpm no grupo Hg e de 120 bpm no grupo Ct). O tratamento com RIAN provocou diminuição da Fc, reduziu frequência de contração máxima, a CBC e aboliu completamente a potenciação pós-pausa em ambos os grupos experimentais. A adição deste alcalóide permitiu inferir que o há uma contribuição significativa do retículo sarcoplasmático (RS) para o fornecimento do Ca<sup>2+</sup> ativador que supera a participação dos mecanismos transsarcolemais como canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L e trocador NCX atuando no modo reverso. No miocárdio das traíras do grupo Ct, na frequência cardíaca *in vivo*, o RS representa uma contribuição relativa de cerca de 70% do Ca<sup>2+</sup> ativador responsável pelo desenvolvimento da Fc e da CBC. Já para os miócitos das traíras expostas ao Hg essa contribuição relativa foi de cerca de 53%. Assim, a exposição ao Hg reduziu significativamente o papel do RS como fornecedor de Ca<sup>2+</sup> para a contração tornando-o semelhante ao do influxo sarcolemal de Ca<sup>2+</sup>. Apenas no grupo Hg a adição da rianodina resultou em redução nos valores absolutos de TPT em todas as frequências de estimulação testadas e do THR a 0,2 Hz ou 12 bpm enquanto que no grupo Ct nenhuma diferença foi observada sugerindo que o metal, de alguma forma favorece a atividade da sarcolema, situação não evidenciada quando o RS está funcional e representa o maior contribuidor de Ca<sup>2+</sup> a maquinaria contrátil. Os resultados evidenciaram que a exposição ao Hg limitou a manutenção da performance cardíaca mesmo na frequência cardíaca fisiológica, reduzindo a Fc, promovendo uma ciclagem de cálcio mais lenta no interior dos miócitos e prejudicando a função do retículo. O Hg parece ainda apresentar um duplo efeito: a) no RS atua negativamente provocando um vazamento do Ca<sup>2+</sup> pelos canais de rianodina e/ou redução da atividade da SERCA podendo ser este o principal mecanismo responsável pelo efeito inotrópico negativo do metal; b) na sarcolema atua positivamente, favorecendo a entrada de Ca<sup>2+</sup> pelos canais do tipo L e a retirada do Ca<sup>2+</sup> mais acelerada do citosol pela Ca<sup>2+</sup>-ATPase da sarcolema e/ou do trocador NCX. As alterações encontradas no presente estudo associadas a uma pronunciada bradicardia podem conduzir a falhas nos ajustes do débito cardíaco, o que pode ser crítico durante condições hipóxicas, comumente enfrentadas por esta espécie na natureza ou ainda, por ser uma espécie piscívora e muito voraz, comprometer a desempenho da predação e, conseqüentemente, sua sobrevivência, podendo tornar as populações mais vulneráveis.

## 1 INTRODUÇÃO

Oriundos de fontes naturais ou antrópicas, os metais pesados como o Hg continuamente entram no ecossistema aquático e constituem séria ameaça por sua toxicidade, longa persistência, bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. As concentrações de Hg nos organismos são fortemente correlacionadas à estrutura da cadeia alimentar, sendo que os predadores de topo geralmente apresentam um conteúdo de mercúrio muito mais elevado do que os níveis tróficos mais baixos (CANABA et al., 1994). Nos ambientes aquáticos, os peixes representam um dos maiores níveis tróficos e os carnívoros apresentam maiores concentrações de Hg. A literatura descreve teores elevados de mercúrio total em traíra, *Hoplias malabaricus*, coletadas de diferentes rios brasileiros: 2,77 mg.kg<sup>-1</sup> na represa Billings-SP (ROCHA et al., 1985); 0,62 mg.kg<sup>-1</sup> no rio Piracicaba-SP (CETESB, 1986); 7,92 mg.kg<sup>-1</sup> no rio Bento Gomes-MT (VIEIRA et al., 1991); 0,91 mg.kg<sup>-1</sup> no rio Itacaiúnas-Parauapebas-PA (LACERDA et al., 1994) e 1,59 mg.kg<sup>-1</sup> no rio Negro-AM (BARBOSA et al., 2003). O peixe tem sido apontado como a principal via de intoxicação do ser humano por Hg (MORGANO et al., 2005).

Os efeitos dos metais pesados nos ecossistemas aquáticos se caracterizam por uma discreta redução nas taxas de crescimento e de reprodução, aumento da taxa de mortalidade e até a eliminação completa da biota (MAZON et al., 2002). Entre os possíveis mecanismos de toxicidade do Hg podemos enumerar a inativação de enzimas, proteínas estruturais e de transporte ou alteração da permeabilidade da membrana celular (STOHS & BAGCHI, 1995). Seus efeitos também incluem a quebra da homeostasia intracelular do Ca<sup>2+</sup> e a oxidação de tióis que resultam em uma interação sinérgica que culmina no estresse oxidativo caracterizando a citotoxicidade do metal nos órgãos. Em geral a lesão oxidativa a lipídeos e proteínas de membrana resultam em uma diminuição de fluidez membranal, inativação de enzimas como a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, intensificação da perda de potencial de membrana e da homeostase iônica (PORTO, 2001).

Todas essas alterações induzidas pelo mercúrio podem acarretar prejuízos no funcionamento do coração. A maioria dos estudos mostra os efeitos cardiovasculares da exposição aguda a diferentes concentrações do mercúrio em mamíferos. Entretanto, poucos estudos retratam os efeitos cardiovasculares do mercúrio após exposições crônicas e/ou sub-crônicas a pequenas concentrações e não há estudos que retratem os efeitos do metal no coração de peixes brasileiros. Devido à carência dessas investigações, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da exposição trófica e sub-crônica a doses sub-letais de Hg inorgânico sobre a função contrátil do miocárdio isolado de traíra, espécie com ampla distribuição geográfica, abrangendo todas as bacias hidrográficas da América do Sul e que exhibe grande plasticidade ecológica e ocupa níveis tróficos superiores da cadeia alimentar.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Exemplares adultos e de ambos os sexos de traíra, *Hoplias malabaricus*, foram obtidos da piscicultura Parque do Lago, Dourado, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 500 L com recirculação de água de clorada (pH 7,0-7,5; DO<sub>2</sub> 6,5-7,3 mg.L<sup>-1</sup>; dureza 48-56 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade 40-43 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e condutividade 120-128 µS.cm<sup>-1</sup>), aeração constante (P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 45 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante o período de aclimação, as traíras foram alimentadas com juvenis de matrinxãs (4-6 cm), *Brycon amazonicus*, uma vez por semana, na proporção de 2% da biomassa.

### 2.2 Desenho Experimental

Antes do início do experimento, as traíras foram pesadas ( $W_T = 230,2 \pm 23,5$  g;  $L = 26,2 \pm 0,9$  cm) e aleatoriamente divididas em dois grupos de doze peixes cada um. Um grupo foi utilizado como controle (Ct) e o outro foi exposto ao mercúrio via alimento (Hg). A exposição sub-crônica das traíras ao Hg foi realizada durante um período de 30 dias, via dieta consistindo de matrinxãs vivos expostos por 96 h a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> (10 doses de 4 matrinxãs/traíra a cada 96 h, correspondendo a 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup>). Os peixes do grupo Ct foram alimentados com a mesma espécie e sob tais condições, porém com exemplares não expostos ao HgCl<sub>2</sub>, totalizando o uso de cerca de 960 exemplares vivos de pequenos matrinxãs para ambos os grupos experimentais ao longo dos 30 dias. Os detalhes da exposição foram descritos no Capítulo III.

### 2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais, Protocolos Experimentais e Análise dos Resultados

Todos os procedimentos e protocolos experimentais bem como a análise dos dados encontram-se detalhadamente descritos no capítulo anterior (Capítulo VI).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito do tempo

Os valores médios da Fc desenvolvida pelas tiras ventriculares do músculo cardíaco isolado de *H. malbaricus*, estimuladas a 12 bpm ao longo do tempo experimental, nos grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN são mostrados na Tabela 1. Nesta tabela também estão apresentados os valores de TPT, THR, TPT/Fc, THR/Fc, RT, dFc/dT e -dFc/dT para os respectivos grupos no período de 40 minutos.

Não foi observada deterioração da Fc e da RT ao longo do período experimental de 40 minutos em ambos os grupos experimentais. A análise estatística dos resultados também indicou que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros tempo-dependentes.

Em relação ao grupo controle, a exposição ao Hg reduziu a Fc das tiras ventriculares em aproximadamente 20% em todos os tempos analisados. A adição de rianodina também reduziu a Fc em aproximadamente 66% no grupo Ct e em aproximadamente 53% no grupo Hg, não havendo diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de RT entre os grupos experimentais.

Os valores absolutos de THR não apresentaram diferenças significativas entre os grupos Ct e Hg. Por outro lado, a exposição ao Hg elevou significativamente os valores de TPT em aproximadamente 21%. Ao se compararem os valores das razões entre TPT/Fc ou THR/Fc, foram observados aumentos significativos em tais razões no grupo Hg (elevações médias de 43 e 87%, respectivamente). A rianodina aumentou significativamente o TPT/Fc e THR/Fc nos grupos Ct e Hg não havendo diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN. Por outro lado, a rianodina reduziu significativamente o TPT e o THR apenas no grupo Hg sem que nenhuma alteração tenha sido verificada entre os grupos Ct e Ct+RIAN.

Tanto a exposição ao Hg e como a adição de rianodina reduziram as taxas de contração (35%) e de relaxamento (32%) as tiras ventriculares em todos os tempos analisados sendo que entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN diferenças significativas não foram observadas para tais parâmetros.

**Tabela 1:** Valores absolutos da Fc e RT, do TPT e THR, das relações TPT/FC e THR/FC e das taxas dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas a 40 min de estimulação à frequência de 12 bpm, na ausência ou na presença de 10 µM de rianodina. Valores são médias ± E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e Hg # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.

Tempo (min)	Grupos Experimentais			
	Ct	Hg	Ct+RIAN	Hg+RIAN
<b>Fc (mN.mm<sup>-2</sup>)</b>				
<b>0</b>	5,48 ± 0,32	4,29 ± 0,38 *	1,92 ± 0,29 #	2,11 ± 0,14 @
<b>10</b>	5,46 ± 0,31	4,35 ± 0,38 *	1,84 ± 0,27 #	1,99 ± 0,13 @
<b>20</b>	5,35 ± 0,31	4,26 ± 0,36 *	1,79 ± 0,25 #	1,95 ± 0,13 @
<b>30</b>	5,22 ± 0,31	3,99 ± 0,30 *	1,75 ± 0,23 #	1,95 ± 0,17 @
<b>40</b>	5,13 ± 0,28	3,97 ± 0,29 *	1,73 ± 0,24 #	1,75 ± 0,13 @
<b>RT (mN.mm<sup>-2</sup>)</b>				
<b>0</b>	4,93 ± 0,62	4,57 ± 0,31	5,65 ± 0,67	4,29 ± 0,49
<b>10</b>	4,86 ± 0,60	4,48 ± 0,29	5,60 ± 0,70	3,68 ± 0,50
<b>20</b>	4,70 ± 0,61	4,36 ± 0,28	5,50 ± 0,68	3,69 ± 0,50
<b>30</b>	4,63 ± 0,60	4,24 ± 0,27	5,45 ± 0,67	3,75 ± 0,48
<b>40</b>	4,56 ± 0,58	4,12 ± 0,26	5,36 ± 0,66	3,66 ± 0,49
<b>TPT (ms)</b>				
<b>0</b>	472,20 ± 13,81	585,63 ± 37,60 *	503,85 ± 28,55	486,60 ± 22,14 @
<b>10</b>	466,92 ± 9,84	576,68 ± 30,54 *	481,44 ± 34,14	474,56 ± 23,56 @
<b>20</b>	465,18 ± 12,86	590,31 ± 30,03 *	486,15 ± 37,36	474,52 ± 21,62 @
<b>30</b>	482,83 ± 14,20	561,23 ± 18,01 *	480,82 ± 40,83	480,32 ± 24,68 @
<b>40</b>	483,84 ± 11,57	555,37 ± 19,16 *	456,67 ± 24,06	460,70 ± 22,99 @
<b>THR (ms)</b>				
<b>0</b>	321,53 ± 21,25	376,32 ± 24,08	339,44 ± 32,33	279,76 ± 13,31 @
<b>10</b>	315,32 ± 20,77	370,34 ± 23,95	335,92 ± 31,05	273,30 ± 13,13 @
<b>20</b>	312,01 ± 19,77	357,93 ± 22,81	332,81 ± 31,43	271,14 ± 12,27 @
<b>30</b>	311,60 ± 19,14	323,84 ± 16,68	321,17 ± 29,26	272,57 ± 11,82 @
<b>40</b>	305,90 ± 20,60	319,67 ± 16,26	314,52 ± 30,04	271,67 ± 12,46 @
<b>TPT/Fc (ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>)</b>				
<b>0</b>	88,85 ± 4,98	134,43 ± 16,50 *	255,64 ± 38,34 #	242,93 ± 21,84 @
<b>10</b>	89,98 ± 4,86	123,33 ± 8,68 *	243,84 ± 33,14 #	247,94 ± 19,64 @
<b>20</b>	91,30 ± 5,02	132,57 ± 9,18 *	246,46 ± 29,88 #	255,75 ± 21,65 @
<b>30</b>	95,76 ± 4,60	137,83 ± 10,27 *	250,25 ± 29,47 #	264,76 ± 25,87 @
<b>40</b>	97,25 ± 4,02	136,08 ± 8,98 *	245,04 ± 29,60 #	279,37 ± 25,72 @
<b>THR/Fc (ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>)</b>				
<b>0</b>	41,39 ± 5,54	82,84 ± 7,98 *	129,36 ± 21,12 #	141,34 ± 12,63 @
<b>10</b>	40,75 ± 5,28	79,42 ± 6,62 *	135,25 ± 21,14 #	141,72 ± 11,60 @
<b>20</b>	42,15 ± 5,50	79,80 ± 6,70 *	135,11 ± 16,80 #	145,50 ± 11,60 @
<b>30</b>	43,83 ± 5,84	77,20 ± 5,60 *	134,98 ± 15,64 #	151,04 ± 15,42 @
<b>40</b>	44,07 ± 5,96	77,16 ± 5,43 *	132,54 ± 13,61 #	164,35 ± 14,51 @
<b>dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>				
<b>0</b>	0,0210 ± 0,0011	0,0136 ± 0,0012 *	0,0068 ± 0,0009 #	0,0069 ± 0,0005 @
<b>10</b>	0,0212 ± 0,0013	0,0137 ± 0,0013 *	0,0065 ± 0,0009 #	0,0067 ± 0,0005 @
<b>20</b>	0,0202 ± 0,0012	0,0130 ± 0,0011 *	0,0064 ± 0,0009 #	0,0065 ± 0,0004 @
<b>30</b>	0,0191 ± 0,0011	0,0124 ± 0,0010 *	0,0064 ± 0,0008 #	0,0068 ± 0,0006 @
<b>40</b>	0,0188 ± 0,0010	0,0122 ± 0,0010 *	0,0065 ± 0,0009 #	0,0061 ± 0,0004 @
<b>-dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>				
<b>0</b>	-0,0158 ± 0,0012	-0,0103 ± 0,0010 *	-0,0050 ± 0,0010 #	-0,0062 ± 0,0004 @
<b>10</b>	-0,0162 ± 0,0015	-0,0104 ± 0,0010 *	-0,0048 ± 0,0009 #	-0,0058 ± 0,0004 @
<b>20</b>	-0,0154 ± 0,0013	-0,0106 ± 0,0009 *	-0,0047 ± 0,0009 #	-0,0055 ± 0,0003 @
<b>30</b>	-0,0153 ± 0,0013	-0,0104 ± 0,0009 *	-0,0047 ± 0,0008 #	-0,0056 ± 0,0004 @
<b>40</b>	-0,0150 ± 0,0013	-0,0107 ± 0,0008 *	-0,0049 ± 0,0008 #	-0,0049 ± 0,0003 @

### 3.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequência) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC)

A Figura 1 apresenta os valores médios da Fc das tiras ventriculares de traíras dos grupos Ct e Hg, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação tanto na ausência quanto na presença de 10  $\mu\text{M}$  de rianodina.

Tanto para o grupo Ct como para o Hg, houve uma redução significativa e progressiva da Fc em relação aos valores iniciais (12 bpm), a partir da frequência de estimulação de 1,0 Hz ou 60 bpm atingindo o valores mínimo de  $2,03 \pm 0,30$  e  $1,79 \pm 0,30$   $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ , respectivamente, na frequência de 2,0 Hz ou 120 bpm, acima da qual os registros tornaram-se irregulares. Adicionalmente, as tiras ventriculares das traíras expostas ao Hg apresentaram valores de Fc significativamente inferiores (aproximadamente 20%) quando comparados aos valores apresentados pelo grupo Ct, em todas as frequências de estimulação analisadas (Fig. 1A).

No grupo Ct+RIAN houve redução significativa da Fc a partir da frequência de estimulação de 1,2 Hz ou 72 bpm atingindo o valor mínimo de  $0,91 \pm 0,15$   $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ , na frequência de 2,0 Hz ou 120 bpm (Fig. 1B). No grupo Hg+RIAN, a Fc sofreu redução significativa em seu valor acima da frequência de estimulação de 0,4 Hz (Fig. 1C). A presença da rianodina reduziu significativamente a Fc tanto no grupo Ct quanto no Hg não havendo, entretanto, diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN (Fig 1D).

A Figura 2 e 3 apresentam os valores médios do TPT e THR, respectivamente, das tiras ventriculares das traíras dos grupos Ct e Hg, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação tanto na ausência quanto na presença de 10  $\mu\text{M}$  de rianodina.

Em relação aos valores iniciais (12 bpm), as médias dos valores absolutos de TPT sofreram reduções significativas a partir de 36 bpm no grupo Ct e de 24 bpm no grupo Hg. Por outro lado, os valores de THR obtidos a partir de 36 bpm foram significativamente inferiores aos valores iniciais tanto para o grupo Ct quanto para o Hg. O TPT chegou ao valor mínimo de 215 ms na frequência de 120 bpm, no grupo Ct e 273 ms no grupo Hg, na frequência de 96 bpm. Já, o THR chegou ao valor mínimo de 166 ms na frequência de 120 bpm, no grupo Ct, e 175 ms, aos 96 bpm, no grupo Hg. Em todas as frequências de estimulação analisadas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Ct e Hg nos valores de THR, porém os valores de TPT no grupo Hg foram significativamente superiores (Figs. 2A e 3A).

No grupo Ct+RIAN houve redução significativa do TPT a partir 36 bpm e do THR a partir de 48 bpm (Fig. 2B e 3B). No grupo Hg+RIAN, os valores de TPT e THR sofreram redução significativa a partir da frequência de 0,8 Hz ou 48 bpm (Figs. 2C e 3C). Em todas as frequências

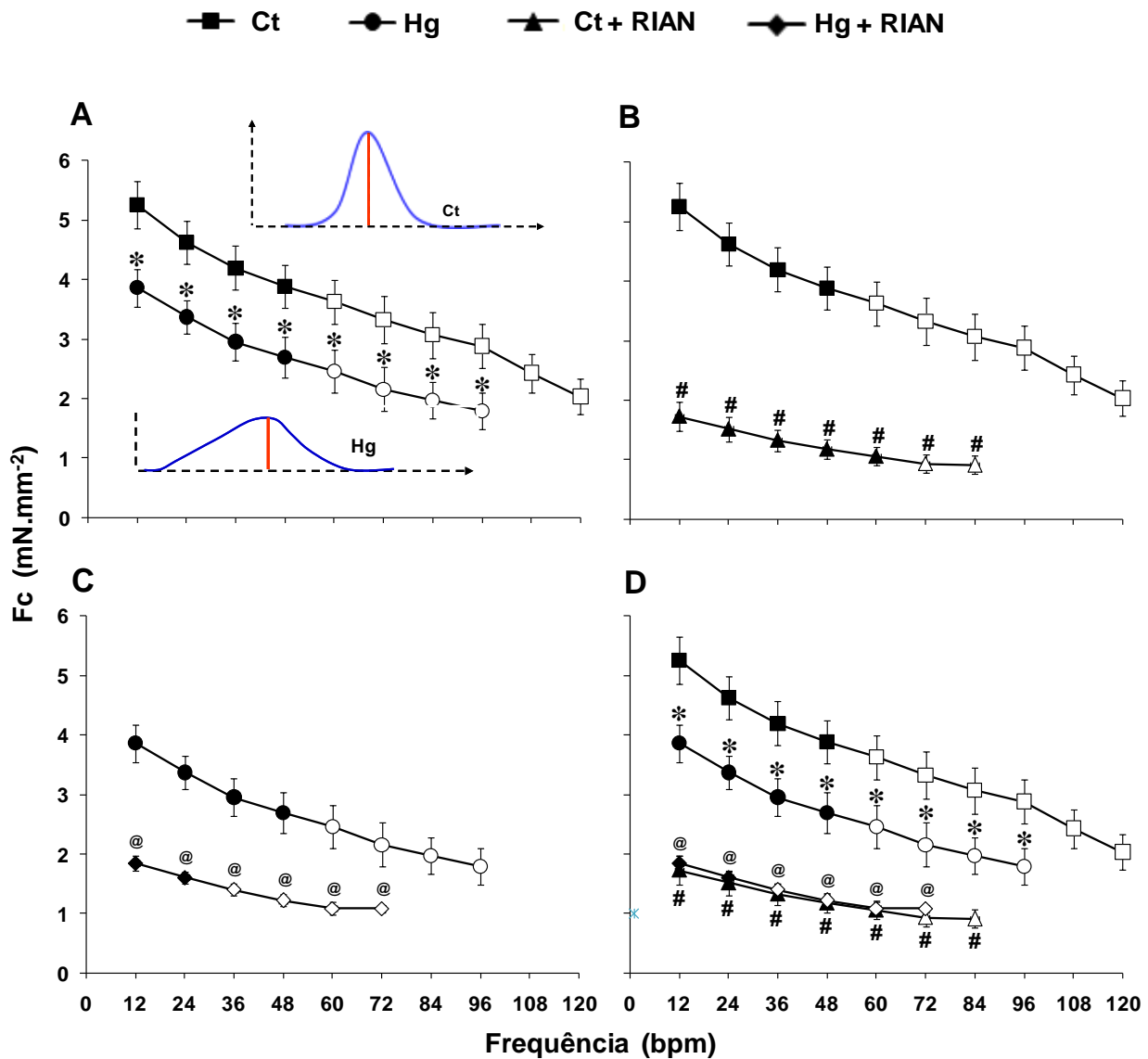


de estimulação, a presença da rianodina reduziu significativamente o TPT apenas no grupo Hg não sendo identificadas diferenças neste parâmetro no grupo Ct. O tratamento com rianodina também promoveu redução do THR somente no grupo Hg, mas apenas na frequência de estimulação de 0,2 Hz. Não foram observadas diferenças significativas em tais parâmetros entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN (Figs. 2D e 3D).

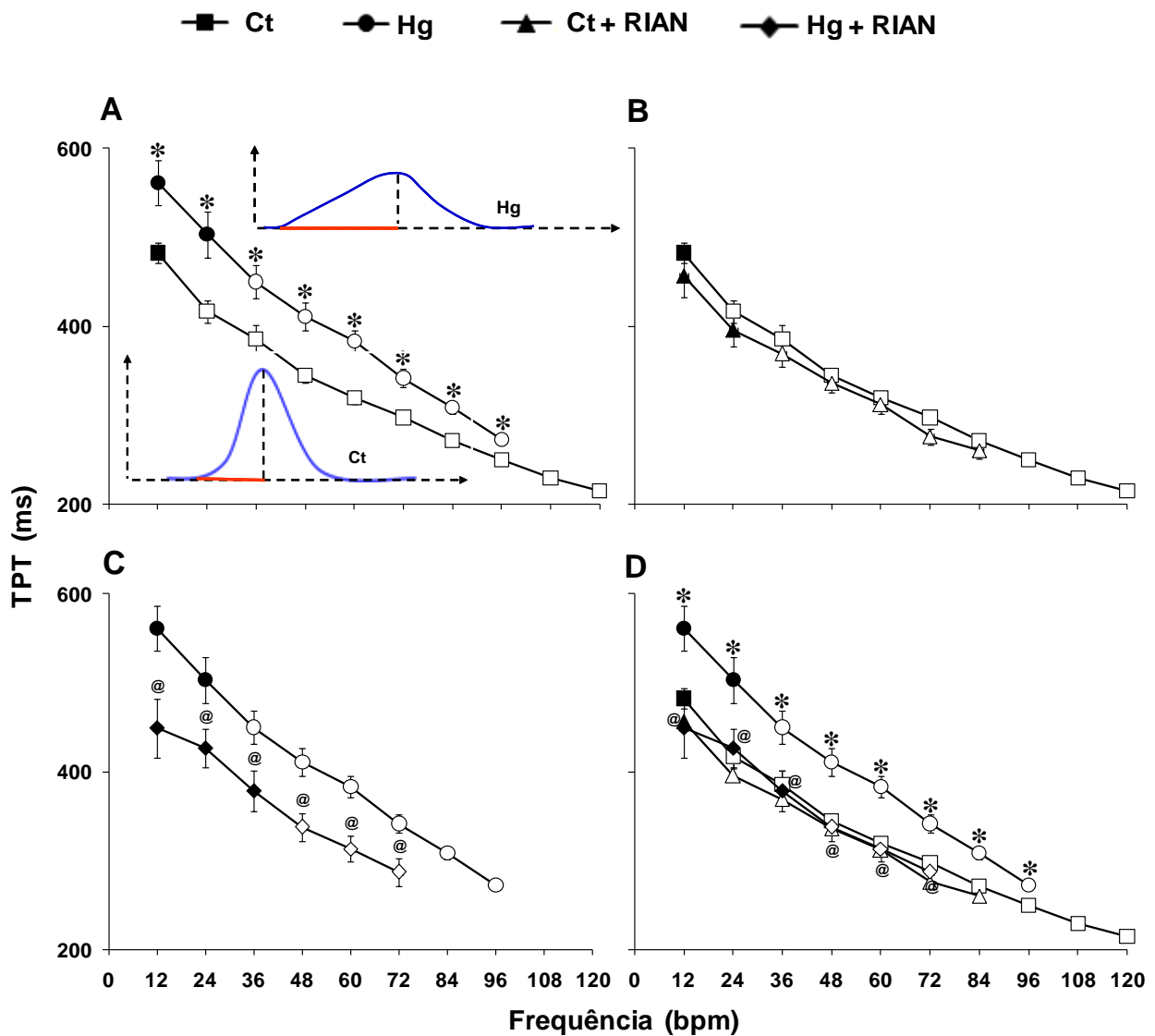
As Figuras 4 e 5 mostram os valores das relações TPT/Fc e THR/Fc para os grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Foram observados aumentos significativos em tais razões no grupo Hg em relação ao grupo Ct, em todas as frequências de estimulação (Figs. 4A e 5A). A rianodina também aumentou significativamente tais razões tanto no grupo Ct como no Hg sem que fossem produzidas diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN (Fig 4D e 5D). Os valores de TPT/Fc e THR/Fc não sofreram alteração com os incrementos na frequência de estimulação em relação aos valores iniciais (12 bpm), mantendo-se constantes até as frequências máximas atingidas em cada um dos grupos experimentais (Figs. 4B, 4C, 5B e 5C).

O efeito de incrementos sucessivos de 12 bpm na frequência de estimulação sobre valores médios da RT das tiras ventriculares de matrinxã do grupo Ct e Hg está representado graficamente na Figura 6.

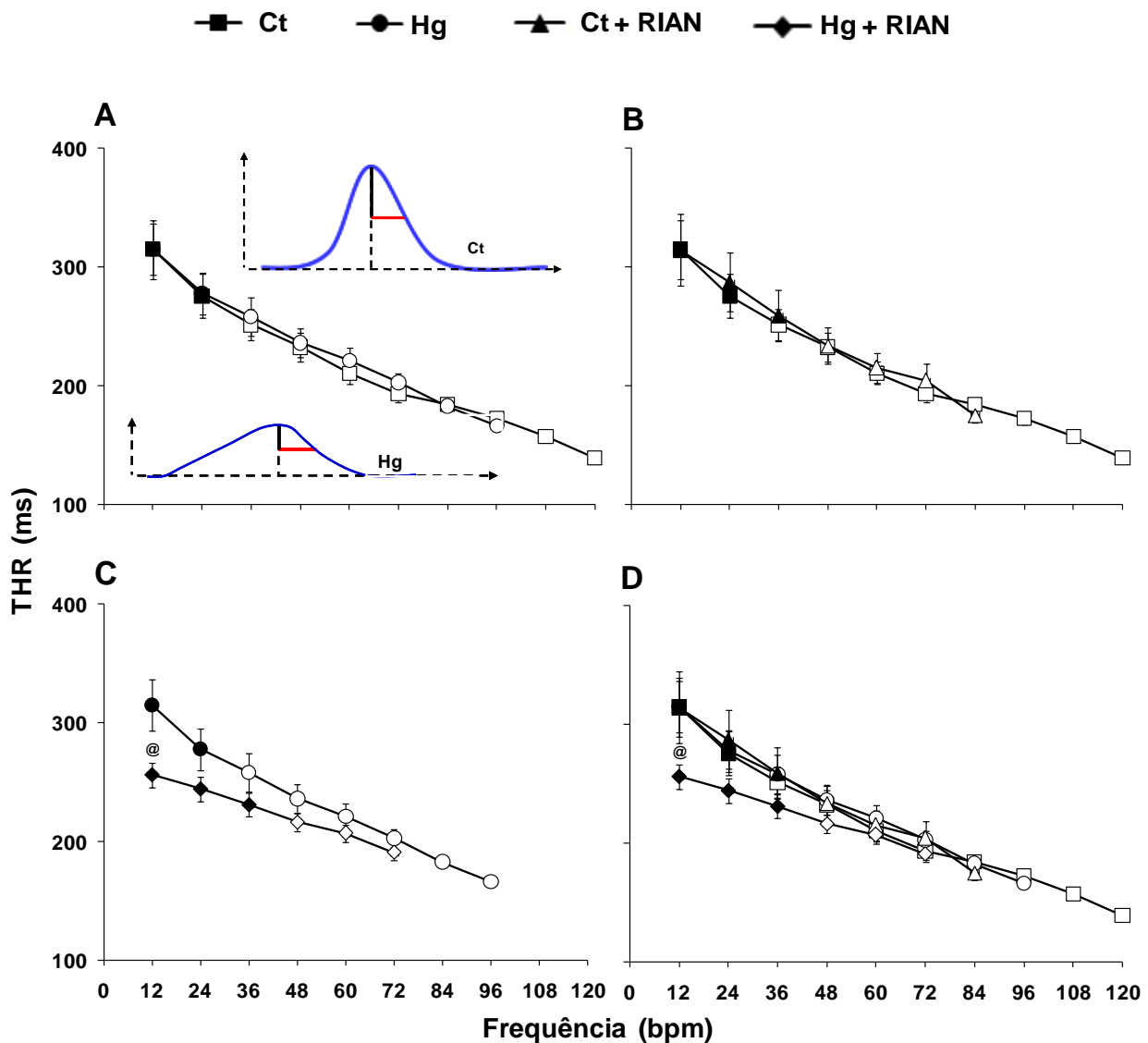
Dentro de cada um dos grupos experimentais, os valores da RT não sofreram alterações com incrementos progressivos da frequência de estimulação. A exposição ao Hg e o tratamento com rianodina também não induziram qualquer alteração significativa nos valores de RT em todas as frequências de estimulação analisadas (Figs. 6B, 6C e 6D).



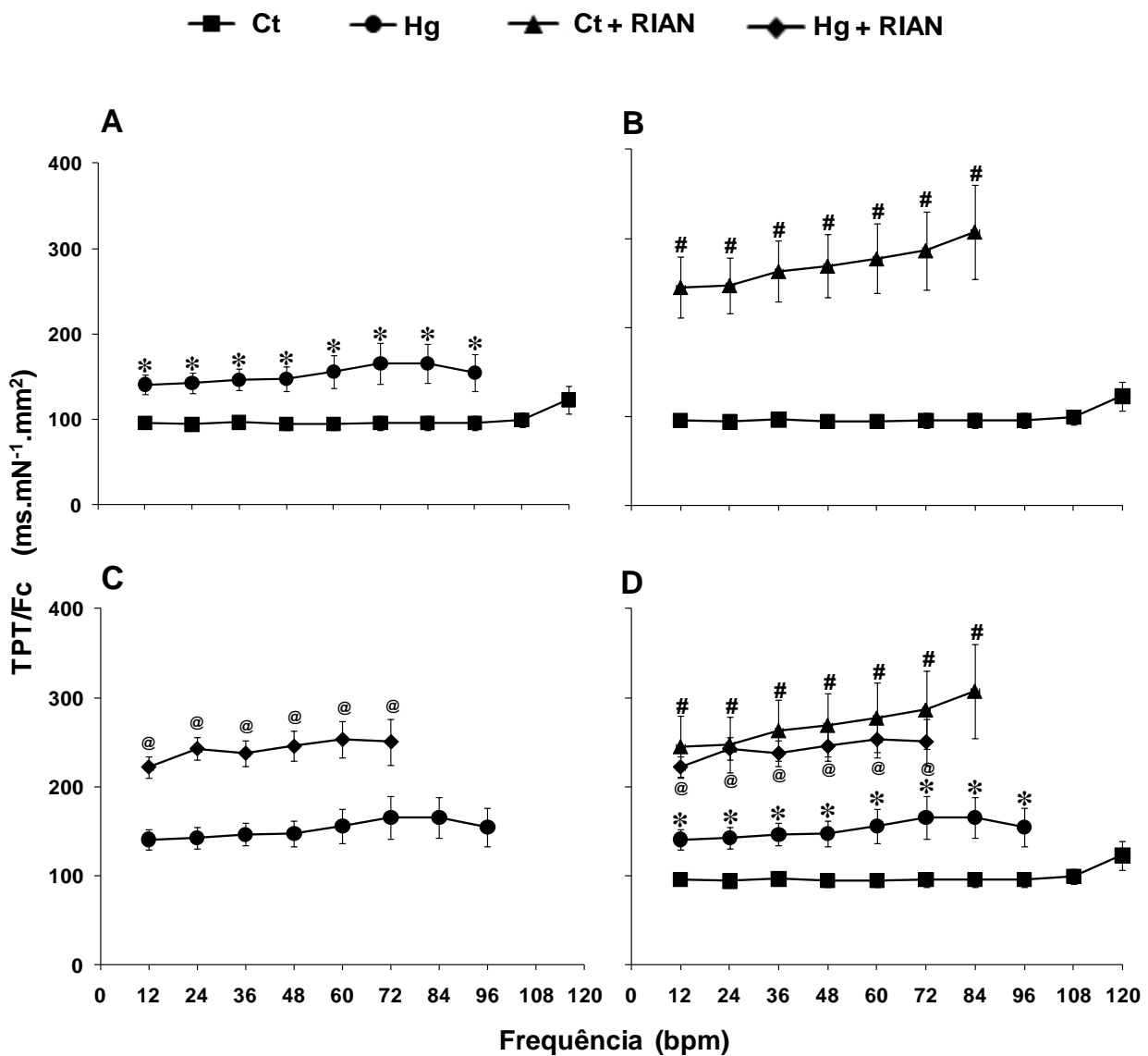
**Figura 1** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração isométrica ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\% \text{ biomassa} \cdot \text{dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



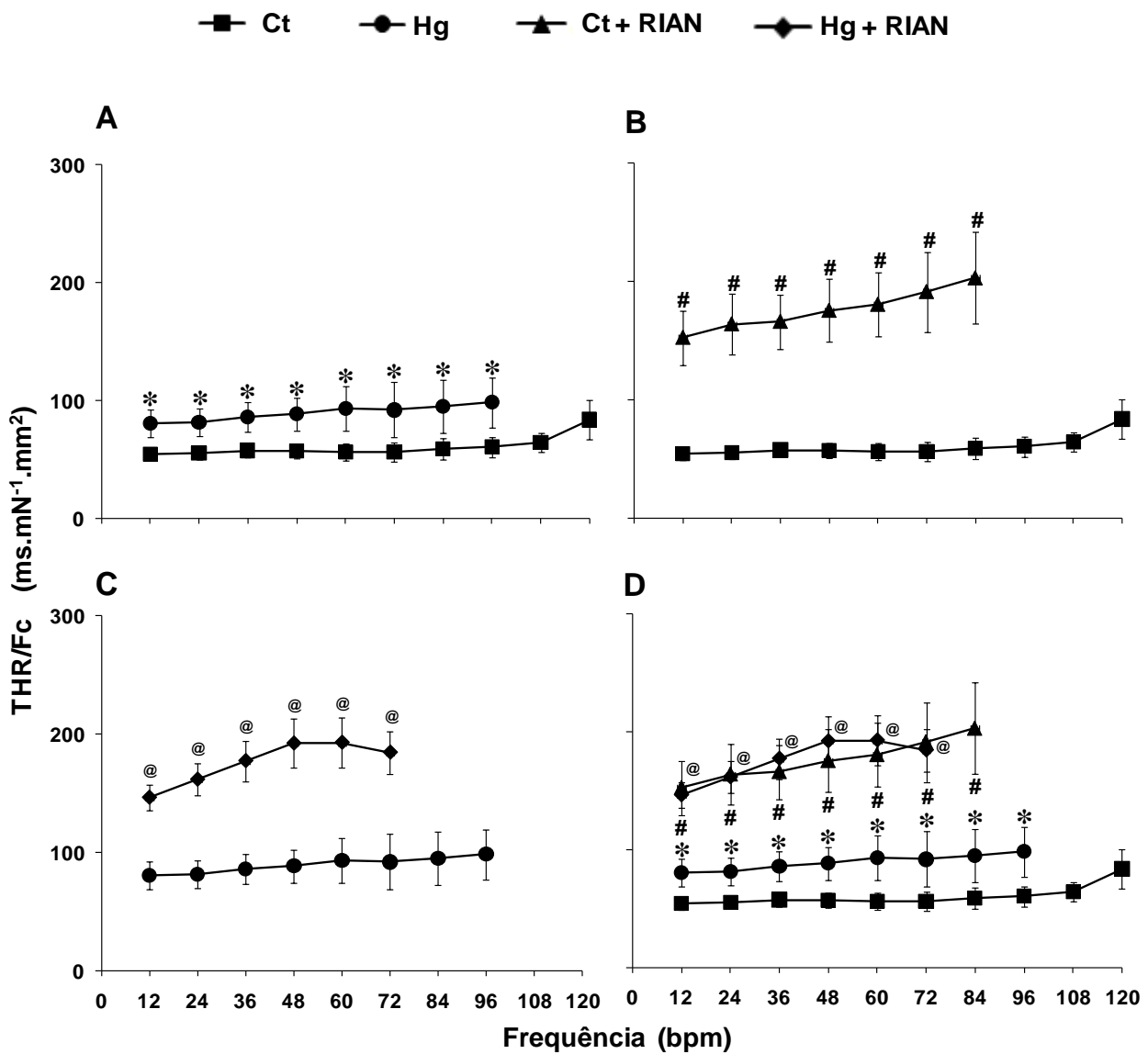
**Figura 2** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão isométrica (TPT - ms) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



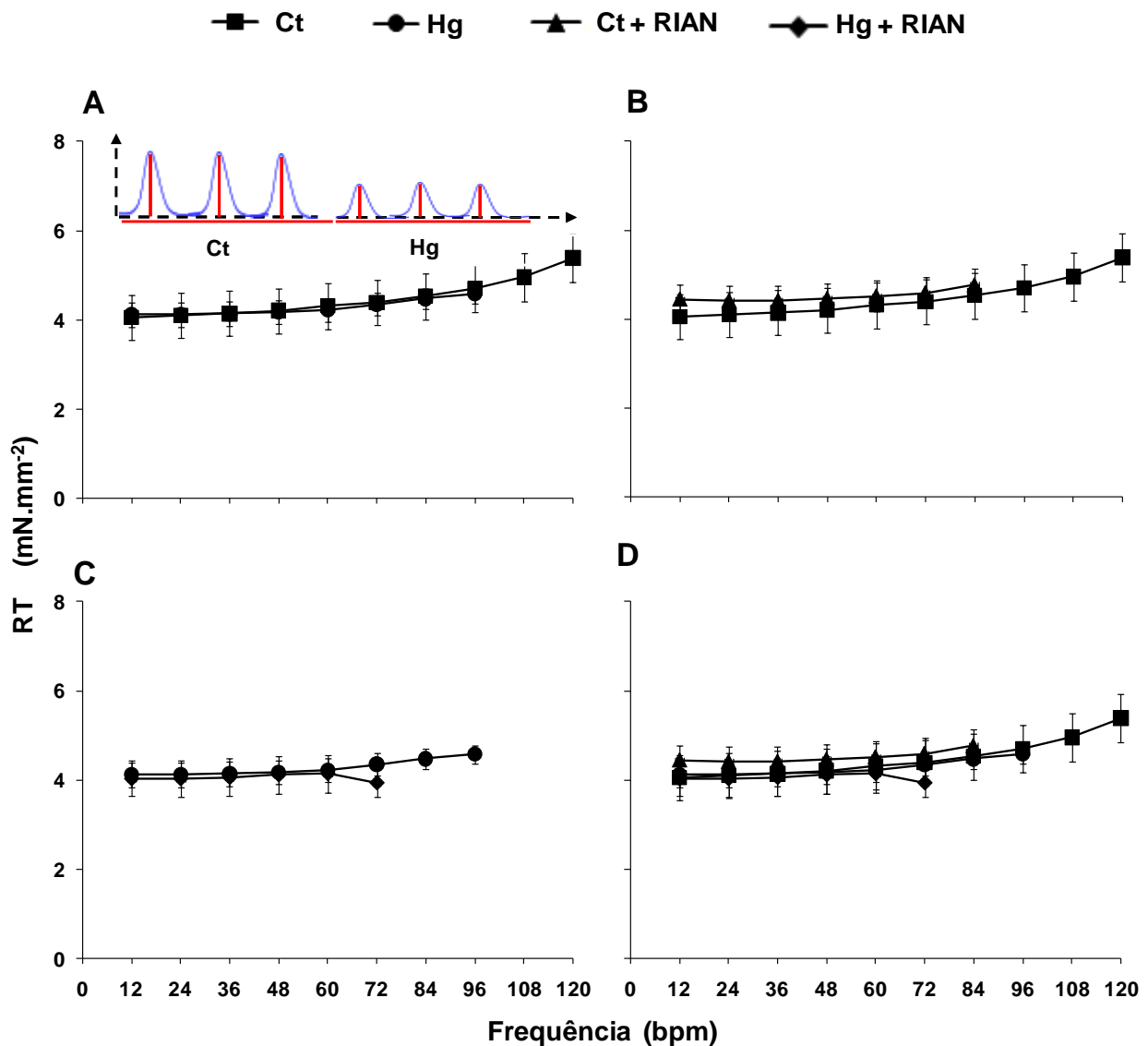
**Figura 3** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias ( $\sim 2\% \text{ biomassa.dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



**Figura 4** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para o pico de tensão e a força de contração isométrica (TPT/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



**Figura 5** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a relação entre o tempo para 50% do relaxamento e a força de contração isométrica (THR/Fc - ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



**Figura 6** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a tensão de repouso (RT -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\% \text{ biomassa}\cdot\text{dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.

As figuras 7 e 8 mostram, respectivamente, as taxas de contração ( $dF_c/dT$ ) e de relaxamento ( $-dF_c/dT$ ) desenvolvidas pelas tiras ventriculares das traíras nas diferentes frequências de estimulação, dos grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN.

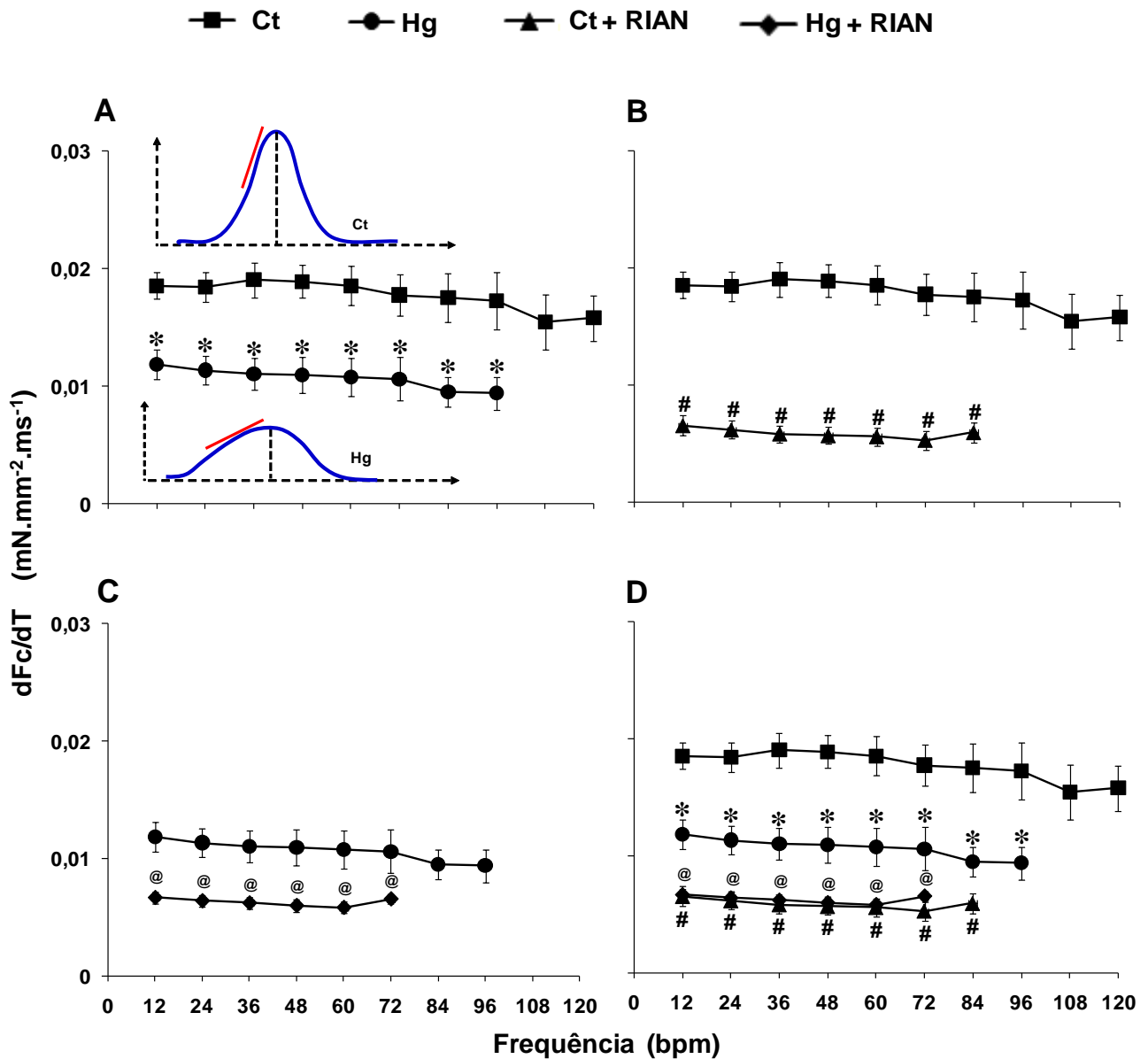
As tiras ventriculares do grupo Ct e Hg mantiveram suas taxas de contração e de relaxamento constantes até as frequências máximas de estimulação atingidas. A exposição ao Hg reduziu significativamente tanto a taxa de contração como a de relaxamento das tiras ventriculares em todas as frequências de estimulação testadas (Figs 7A e 8A).

Nos grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN não foram observadas alterações tanto na  $dF_c/dT$  como na  $-dF_c/dT$  com aumentos sucessivos da frequência de estimulação. A presença da rianodina reduziu significativamente a  $dF_c/dT$  e a  $-dF_c/dT$  dos grupos Ct e Hg de forma a não produzir diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN (Figs. 7D e 8D).

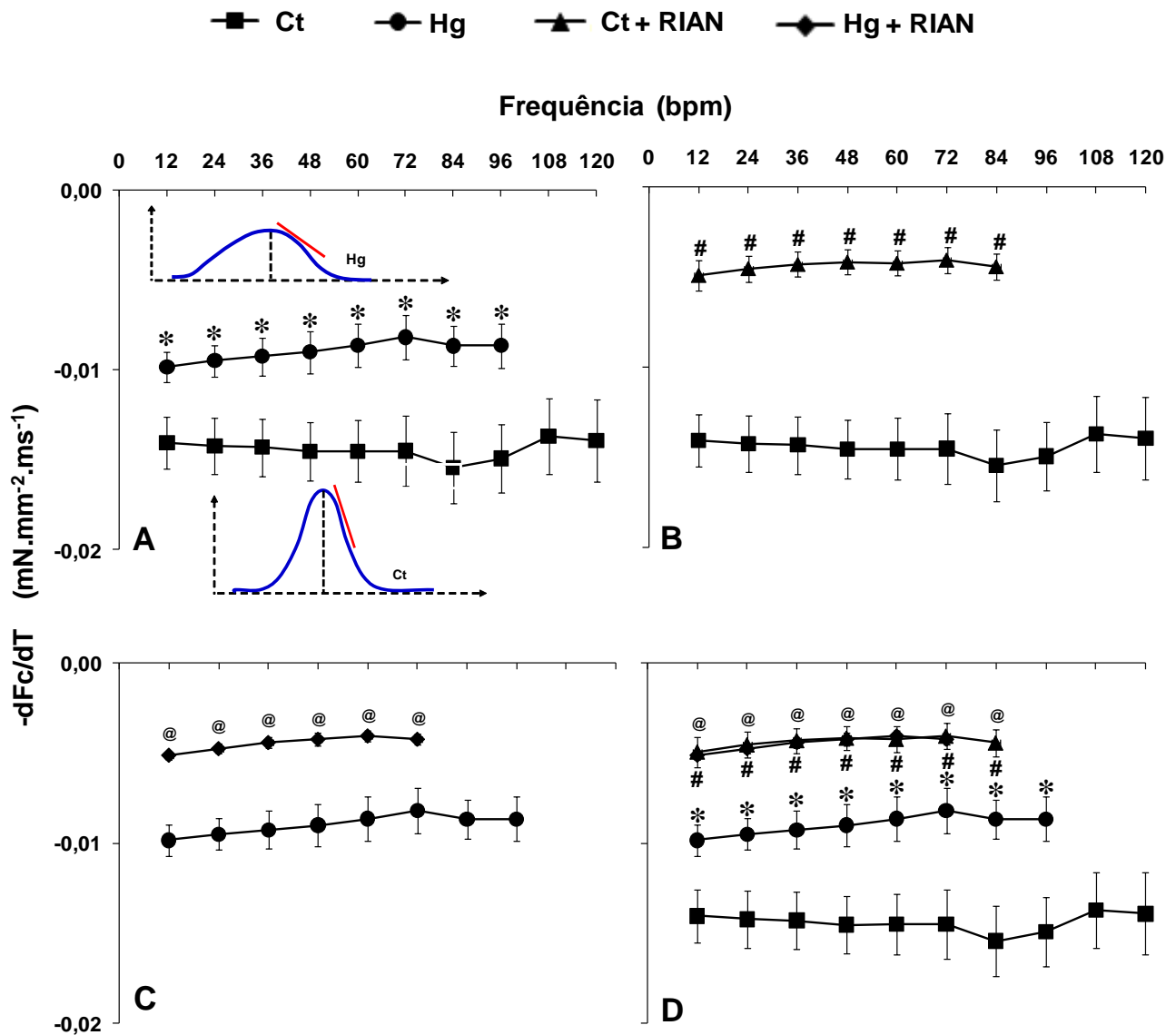
A figura 9 apresenta o produto da frequência de estimulação pelo pico da tensão isométrica – a capacidade de bombeamento cardíaco (CBC). No grupo Ct, a CBC aumentou significativamente a partir da frequência de 0,8 Hz (48 bpm) em relação aos valores iniciais de 0,2 Hz (12 bpm). No grupo Hg aumentos na CBC foram registrados a partir de 0,6 Hz ou 36 bpm. Os valores máximos da CBC foram obtidos entre 84 e 108 bpm para o grupo Ct e em 96 bpm para o grupo exposto ao Hg (frequência máxima alcançada pelas tiras ventriculares dos matrinxãs deste grupo). Os valores da CBC do grupo Ct foram significativamente superiores (aproximadamente 32%) aos do grupo exposto ao Hg em todas as frequências de estimulação testadas (Fig. 9A).

No grupo Ct+RIAN houve aumento significativo da CBC a partir da frequência de estimulação de 0,8 Hz ou 48 bpm a partir da qual a CBC se manteve constante (Fig. 9B). No grupo Hg+RIAN, a CBC aumentou significativamente a partir da frequência de estimulação de 0,4 Hz (24 bpm), a partir da qual também se manteve constante (Fig. 9C). A adição de rianodina reduziu significativamente a CBC tanto no grupo Ct quanto no Hg não havendo, entretanto, diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN (Fig. 9D).

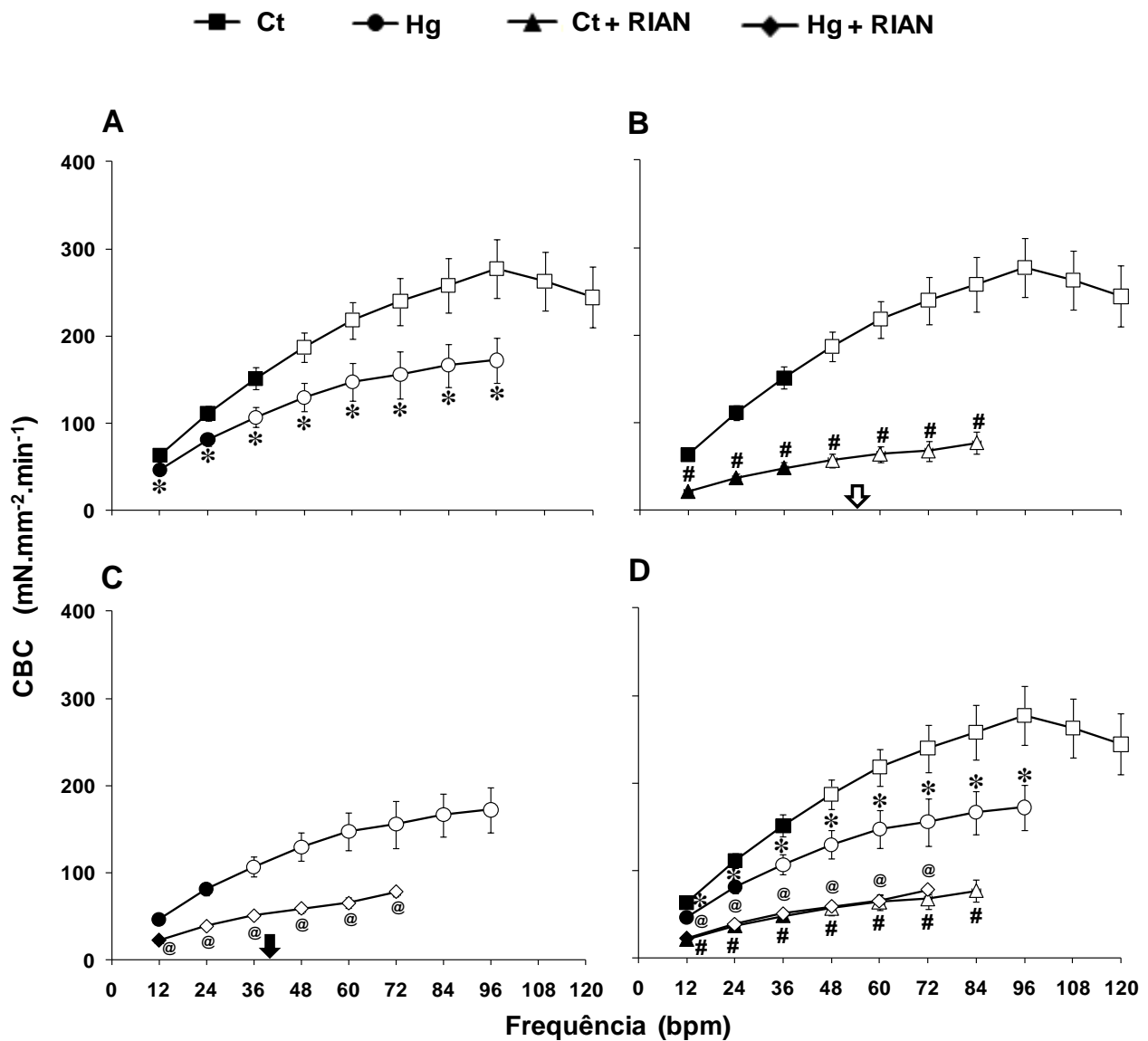




**Figura 7** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de contração ( $dFc/dT$  -  $mN.mm^{-2}.ms^{-1}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostas a  $0,15 mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa. $dia^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



**Figura 8** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a taxa de relaxamento ( $dF_c/dT$  -  $mN \cdot mm^{-2} \cdot ms^{-1}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\% \text{ biomassa} \cdot \text{dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu M$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg e os efeitos do Hg (em vermelho) nas ondas de contração isométrica; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais ( $0,2 \text{ Hz}$  ou  $12 \text{ bpm}$ ). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e  $HgCl_2$ . # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



**Figura 9** - Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias ( $\sim 2\%$  biomassa. $\text{dia}^{-1}$ ) na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (0,2 Hz ou 12 bpm). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e Hg. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN. A seta branca em **B** representa a frequência cardíaca *in vivo* obtida para o grupo Ct. A seta preta em **C** representa a frequência cardíaca *in vivo* obtida para o grupo Hg (para detalhes, ver capítulo VII).

### 3.3 Tensão pós-repouso

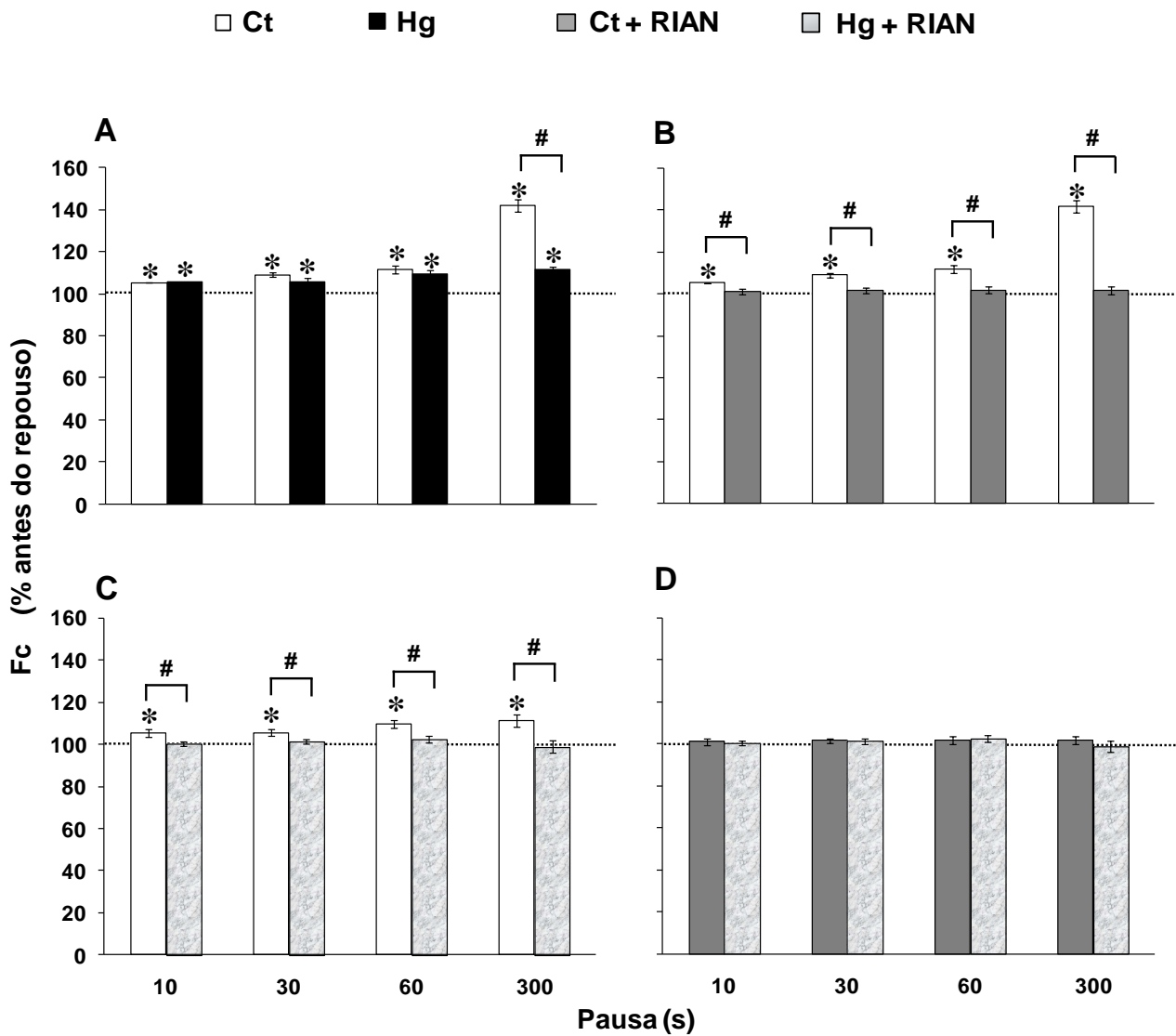
Os valores médios da força de contração (porcentagem dos valores observados na última contração precedente ao período de repouso) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. malabaricus* em resposta a pausas diastólicas variando de 10 a 300 s nos grupos Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN são mostrados na Figura 10.

Houve resposta inotrópica positiva na tensão pós-repouso (ou potenciação pós-pausa) do grupo controle em todas as pausas diastólicas utilizadas no experimento. Quando comparados os valores de Fc pós-repouso e os observados imediatamente antes da pausa, a potenciação máxima foi de ~42 %, para a maior pausa diastólica (300 s) (Fig. 10A). Também houve resposta inotrópica positiva na tensão pós-repouso do grupo exposto ao Hg, para todas as pausas diastólicas utilizadas, com uma potenciação máxima de ~12 %, na maior pausa diastólica (300 s) (Fig. 10B). A comparação dos efeitos das pausas diastólicas sobre a Fc das tiras ventriculares de matrinxãs dos grupos Ct e Hg, revela que houve diferenças significativas nas potenciações pós-pausa entre os grupos experimentais. A exposição ao Hg reduziu em aproximadamente 21% o valor da potenciação após a pausa diastólica de 300 s.

O tratamento com rianodina aboliu completamente a potenciação pós-pausa exibida pelas tiras ventriculares das traíras dos grupos Ct e Hg (Figs. 10B e C), não havendo diferenças entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN (Fig. 10D).

Os valores médios de TPT, THR, dFc/dT e -dFc/dT das tiras ventriculares de *H. malabaricus* após pausas diastólicas variando de 10 a 300 s na ausência ou na presença de 10  $\mu$ M de rianodina estão apresentados na Tabela 2.

Em todas as pausas testadas, a exposição ao Hg elevou os valores de TPT nas potenciações pós-repouso, enquanto que o tratamento com rianodina não alterou este parâmetro tanto no grupo Ct como no Hg. Em todos os grupos experimentais, nenhuma alteração foi observada nos valores de THR após todos os períodos de pausas testados. Tanto a exposição ao Hg quanto o tratamento com 10  $\mu$ M de rianodina reduziram significativamente tanto a taxa de contração como a de relaxamento das tiras ventriculares após as pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 s. Entretanto, as tiras ventriculares dos matrinxãs do grupo Hg tratadas com 10  $\mu$ M de rianodina exibiram valores de dFc/dT e -dFc/dT significativamente superiores de maneira a se observar diferenças significativas entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.



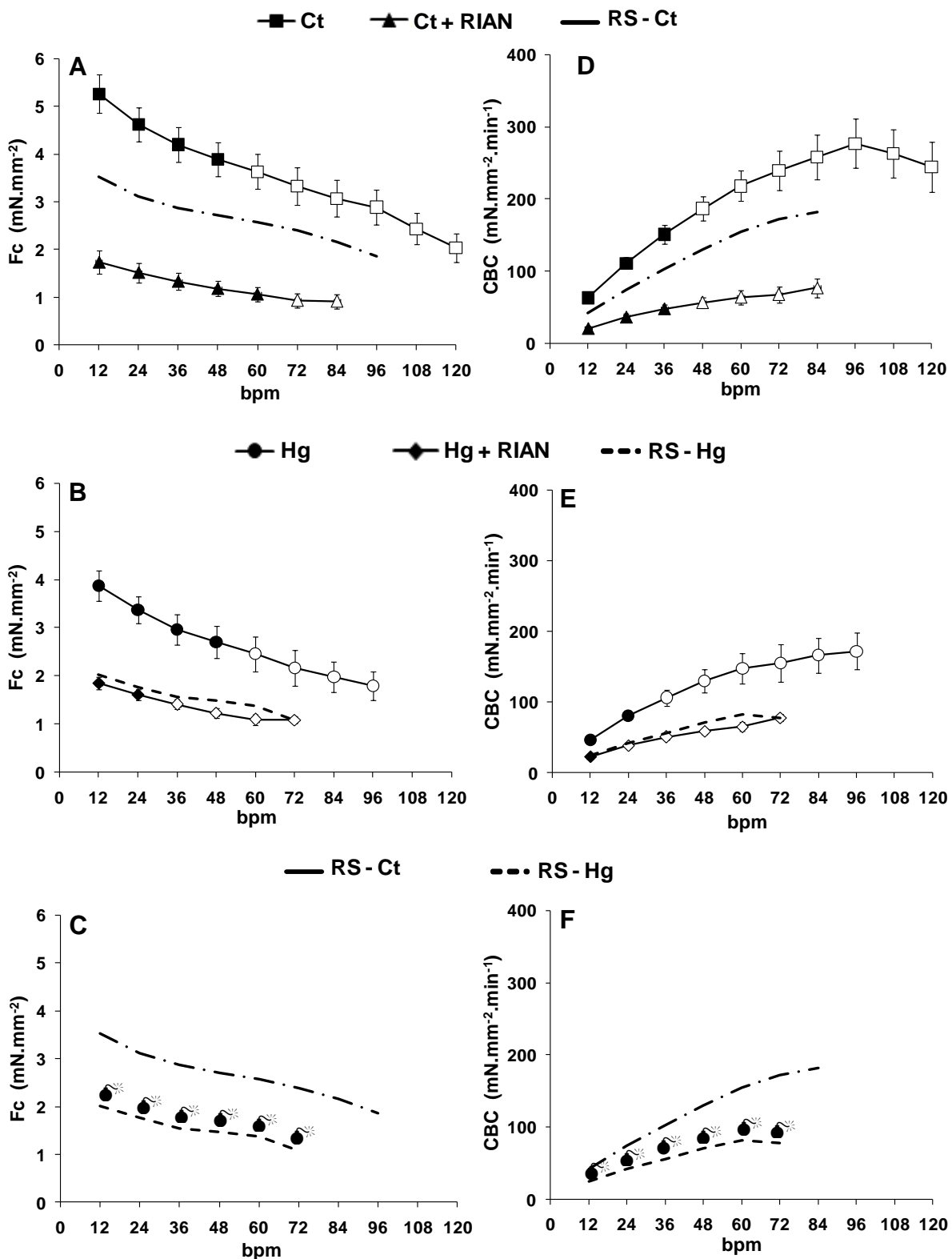
**Figura 10** - Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 s desenvolvida pelas tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina. Em **A**: grupos Ct e Hg; em **B**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **C**: grupos Hg e Hg+RIAN e em **D**: grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN. Valores são médias ± E.P.M. \*: indica diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa; #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

**Tabela 2:** Valores médios de TPT, THR, dFc/dT e -dFc/dT tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus* alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) após pausas diastólicas variando de 10 a 300 s na ausência e na presença de 10 µM de rianodina. Valores são médias ± E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa (p < 0,05) em relação aos valores iniciais (tempo 0 min). \* indica diferença significativa entre os grupos Ct e Hg. # indica diferença significativa entre os grupos Ct e Ct+RIAN. @ indica diferença significativa entre os grupos Hg e Hg+RIAN. & indica diferença significativa entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN.

Pausas (s)	Grupos Experimentais			
	Ct	Hg	Ct+RIAN	Hg+RIAN
	<b>TPT (ms)</b>			
<b>10</b>	486,22 ± 16,78	512,44 ± 35,70 *	432,40 ± 29,07	501,28 ± 34,94
<b>30</b>	470,55 ± 20,12	567,50 ± 34,41 *	457,60 ± 34,82	482,78 ± 24,90
<b>60</b>	512,22 ± 11,57	570,40 ± 13,48 *	458,00 ± 26,70	510,23 ± 26,70
<b>300</b>	469,11 ± 22,40	547,71 ± 19,54 *	448,33 ± 26,44	526,21 ± 38,78
	<b>THR (ms)</b>			
<b>10</b>	311,10 ± 29,35	338,78 ± 19,89	279,00 ± 20,36	290,80 ± 15,28
<b>30</b>	389,00 ± 45,30	342,71 ± 17,70	381,58 ± 29,66	304,36 ± 13,74
<b>60</b>	360,80 ± 34,00	357,28 ± 34,00	318,08 ± 26,18	320,40 ± 15,61
<b>300</b>	416,00 ± 37,92	360,62 ± 23,48	301,16 ± 26,96	324,10 ± 14,84
	<b>dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>			
<b>10</b>	0,0252 ± 0,0018	0,0198 ± 0,0020 *	0,0073 ± 0,0011 #	0,0114 ± 0,0010 @ &
<b>30</b>	0,0230 ± 0,0013	0,0170 ± 0,0015 *	0,0074 ± 0,0012 #	0,0123 ± 0,0013 @ &
<b>60</b>	0,0237 ± 0,0017	0,0174 ± 0,0014 *	0,0067 ± 0,0011 #	0,0105 ± 0,0011 @ &
<b>300</b>	0,0265 ± 0,0018	0,0162 ± 0,0037 *	0,0063 ± 0,0009 #	0,0097 ± 0,0010 @ &
	<b>-dFc/dT (mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>)</b>			
<b>10</b>	-0,0198 ± 0,0014	-0,0146 ± 0,0019 *	-0,0058 ± 0,0011 #	-0,0099 ± 0,0011 @ &
<b>30</b>	-0,0181 ± 0,0010	-0,0113 ± 0,0009 *	-0,0055 ± 0,0010 #	-0,0086 ± 0,0010 @ &
<b>60</b>	-0,0170 ± 0,0015	-0,0170 ± 0,0009 *	-0,0045 ± 0,0008 #	-0,0078 ± 0,0008 @ &
<b>300</b>	-0,0175 ± 0,0017	-0,0175 ± 0,0017 *	-0,0040 ± 0,0005 #	-0,0052 ± 0,0006 @ &

### 3.4 Papel do RS

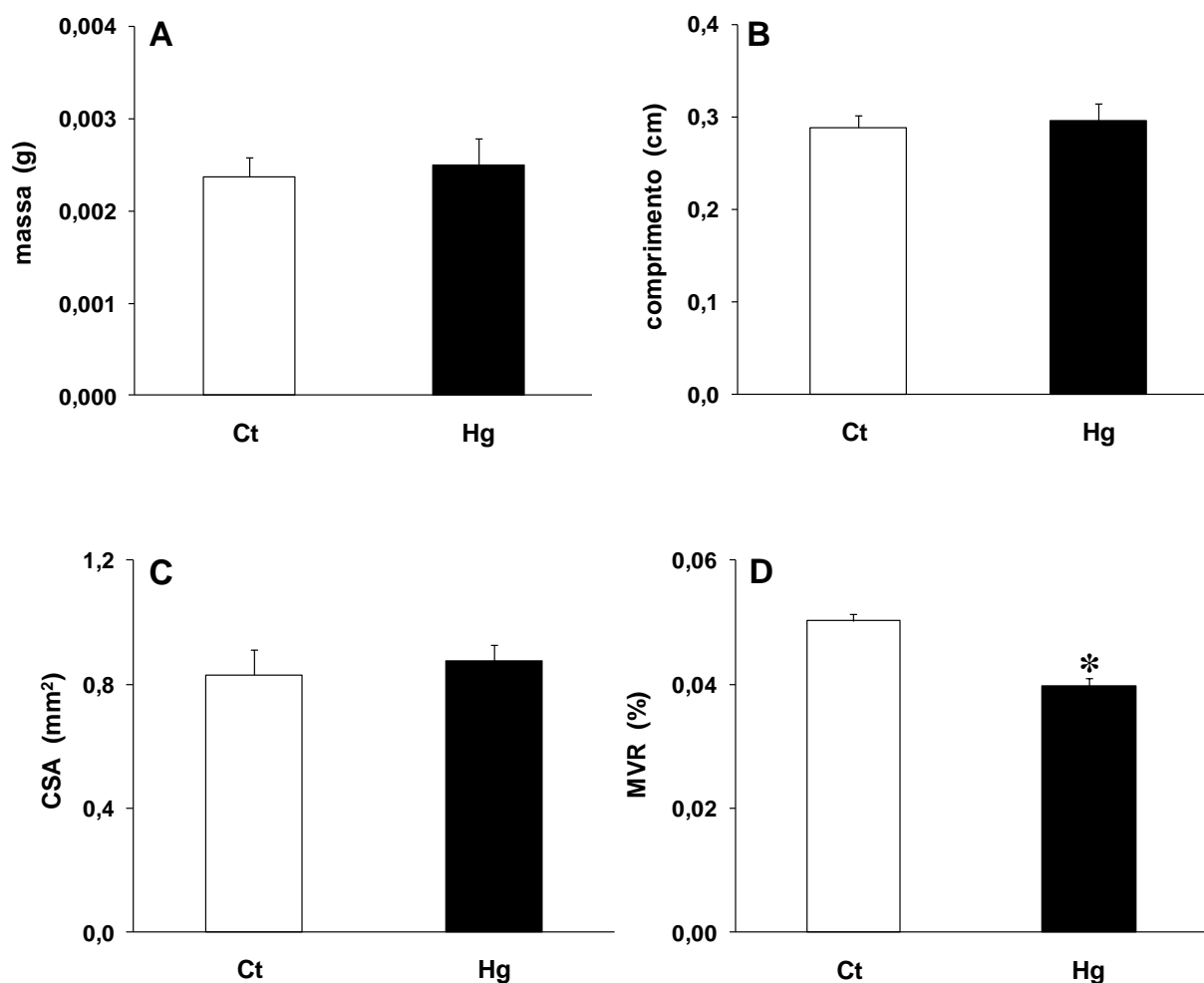
A representação gráfica da contribuição relativa do Ca<sup>2+</sup> acumulado no RS para a geração de força total e CBC em função da frequência de estimulação é apresentada na figura 11 como sendo a diferença entre o desenvolvimento de tais parâmetros nas preparações com e sem rianodina em cada grupo experimental (Ct e Hg). Os resultados revelam que no ventrículo de traíra há uma contribuição significativa do RS para o fornecimento do Ca<sup>2+</sup> ativador na contração de ~70% no grupo Ct e de ~53% no grupo Hg. A participação do RS supera a contribuição dos mecanismos sarcolemais como canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L e trocador NCX atuando no modo reverso. Gráficamente, pode ser observado que a exposição ao Hg promoveu uma redução significativa na contribuição do RS no desenvolvimento da Fc e da CBC.



**Figura 11** – Contribuição relativa do retículo sarcoplasmático (RS) no desenvolvimento da força de contração isométrica (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>) e no índice de bombeamento cardíaco (CBC - mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) em função da frequência de estimulação das tiras ventriculares de traíra, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Em **A** e **D**: grupos Ct e Ct+RIAN; em **B** e **E**: grupos Hg e Hg+RIAN; em **C** e **F**: papel do RS nos grupos Ct e Hg. Valores são médias ± E.P.M. ●\*: indica diferença significativa do papel do RS entre os grupos Ct e Hg (p < 0,05).

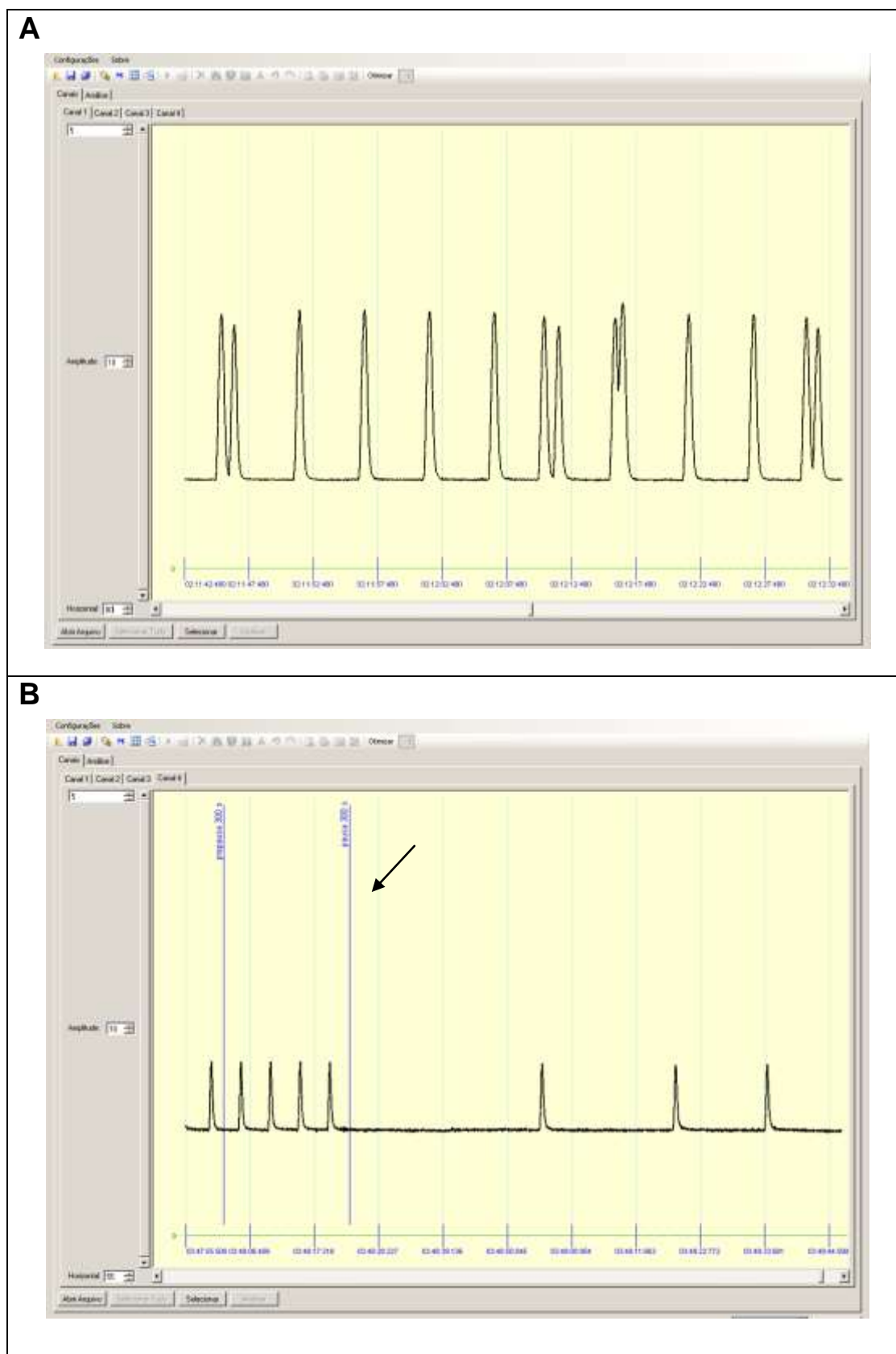
### 3.5 Massa ventricular relativa (MVR)

Os valores da massa e do comprimento das tiras ventriculares, da área de seção transversal (CSA) e da massa ventricular relativa (MVR) das traíras do grupo Ct e Hg estão representados na Figura 12. A exposição ao Hg reduziu a MVR das traíras em 28% e não alterou os demais parâmetros aqui apresentados. Além disso, as tiras ventriculares dos peixes expostos ao Hg apresentaram muitas contrações espontâneas conforme pode ser observado na figura 13, que nem sempre desapareciam ao longo do período de estabilização, fazendo com que muitas preparações de tiras ventriculares dos peixes expostos ao Hg não pudessem ser utilizadas para a análise de dados.



**Figura 12** - Massa (g), comprimento (cm), área de seção transversal (CSA – mm<sup>2</sup>) das tiras ventriculares e massa ventricular relativa (MVR - %) das traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>). Valores são médias ± E.P.M. \* indica diferença significativa do papel do RS entre os grupos Ct e Hg (p < 0,05).





**Figura 13** – Contrações espontâneas exibidas pelas tiras ventriculares das traíras expostas troficamente ao Hg. Em **A**: contrações espontâneas nas tiras estimuladas a 0,2 Hz; em **B**: contrações espontâneas durante a pausa da estimulação elétrica indicada pela seta.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito do tempo

A força de contração isométrica ( $F_c$ ) e a tensão de repouso (RT); assim como os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) e seus índices derivados (TPT/ $F_c$ ; THR/ $F_c$ ;  $dF_c/dT$  e  $-dF_c/dT$ ), no grupo controle e no grupo exposto ao Hg, mantiveram-se constantes ao longo dos 40 minutos experimento indicando que não houve deteriorações tempo-dependentes. Dessa forma, o tempo máximo de 40 min utilizados em todos os protocolos experimentais mostrou-se adequado, não interferindo nos registros dos dados.

De maneira semelhante aos resultados obtidos para o matrinxã, nas traíras expostas troficamente ao Hg, também foi observado um efeito inotrópico negativo do metal com a redução de aproximadamente 20% da  $F_c$  média desenvolvida pela tiras ventriculares dos peixes expostos ao Hg (4,3  $mN \cdot mm^{-2}$ ) em relação ao grupo controle (5,5  $mN \cdot mm^{-2}$ ). Além da redução da  $F_c$ , entre os resultados em comum obtidos para matrinxãs e traíras após a exposição ao Hg, por diferentes vias, destacam-se: reduções significativas na  $dF_c/dT$  (~35%) e na  $-dF_c/dT$  (~32%), elevações nas razões TPT/ $F_c$  (de 37 a 51%) e THR/ $F_c$  (de 75 a 100%) sem alterações nos valores absolutos do THR. As possíveis razões para tais efeitos do Hg já foram discutidas no capítulo anterior. Por outro lado, cabe ressaltar as diferenças no efeito do Hg sobre o acoplamento E-C das duas espécies que foram: ausência de alteração na RT e elevações nos valores absolutos de TPT.

Conforme descrito no capítulo anterior, a literatura descreve que os efeitos do Hg sobre o sistema cardiovascular de ratos são dose-dependentes (VASSALO et al., 1996; VASSALO et al., 1999). Em pequenas concentrações (1 e 2,5  $\mu M$ ), a exposição ao  $HgCl_2$  parece ter um efeito digitálico-símile com elevação da força e da taxa de contração devido a inibição da  $Na^+/K^+$  ATPase. Este efeito desaparece à medida que os efeitos tóxicos do metal vão se acentuando de maneira que exposições a concentrações maiores de Hg (acima de 2,5  $\mu M$  de  $HgCl_2$ ), promovem um efeito inotrópico negativo e redução da potenciação pós-pausa e da contração tetânica (CUNHA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1994; VASSALO et al., 1996; VASSALO et al., 1999).

No presente estudo, esse efeito digitálico-símile do Hg não foi observado nas traíras após a exposição sub-crônica ao Hg por via trófica. Entretanto, esse efeito digitálico-símile nas traíras poderia ter sido sobreposto por outros efeitos do Hg como o potencial para induzir o estresse oxidativo aumentando a lipoperoxidação e, conseqüentemente, levando a alterações na permeabilidade da membrana e homeostasia do  $Ca^{2+}$  (TAN et al., 1993), ou ainda deprimindo a

atividade da SERCA e da ATPase miosínica (AHAMMAD-SAHIB et al., 1988; HALBACH et al., 1981; HECHENBERG & BEYERSMANN, 1991; REDDY et al., 1988).

De fato, conforme descrito no capítulo III, o nível de mercúrio total encontrado no coração dos matrinxãs foi de 7,23 mg/Kg (pool de 10 corações) e no coração das traíras de 0,85 mg/kg (pool de 7 corações). Considerando a densidade do músculo de 1,06 g/cm<sup>3</sup>, o nível de mercúrio aproximado em cada coração de matrinxãs exposto ao Hg é de 4,25 µM e no coração das traíras de 0,64 µM. Para o matrinxã, o nível de Hg encontrado é superior aos descritos como indutores de inotropismo positivo. Para a traíra, o baixo nível de Hg poderia ter induzido um efeito digitálico-símile, o que explicaria uma porcentagem menor (cerca de 20%) de redução da tensão isométrica do que a observada para os matrinxãs (cerca de 50%).

A própria ausência de alteração na RT de traíra pode ter resultado da menor acumulação do Hg no miocárdio ventricular desta espécie, cujos valores podem não ter sido suficientes para desencadear a redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca<sup>2+</sup> como verificado para o matrinxã. A via de exposição ao Hg (trófica) também não pode ser descartada, uma vez que o metal atravessa todo o trato digestório antes de chegar à circulação sanguínea, não sendo possível inferir sobre a forma predominante de Hg que chega ao miocárdio. Além disso, o tempo de exposição ao Hg (30 dias) também não pode ser negligenciado, uma vez que um possível mecanismo compensatório pode ter sido acionado durante este período. Infelizmente, não há literatura disponível que possa subsidiar tais hipóteses e dar suporte para uma discussão mais detalhada.

Os resultados do presente estudo apontam para os seguintes mecanismos compensatórios exibidos pelo miocárdio de traíra frente à exposição sub-crônica ao Hg: indução de aproximadamente 70% da metalotioneína (MT), aumento de 50% na razão GSH:GSSG sem alteração nos níveis de GSSG. Vale ressaltar que um único íon Hg é capaz de se ligar irreversivelmente à GSH e causar a excreção de duas moléculas da mesma (QUIG, 1998) e os grupos tióis (-SH) das cisteínas presentes na MT ligam-se aos íons dos metais dos grupos I-B e II-B da tabela periódica, como zinco (Zn<sup>2+</sup>), cádmio (Cd<sup>2+</sup>), mercúrio (Hg<sup>2+</sup>) e cobre (Cu<sup>2+</sup>), prevenindo sua ação tóxica e danos celulares (NORDBERG, 1998).

Em termos comparativos, no miocárdio de matrinxãs expostos por 96 horas ao HgCl<sub>2</sub>, a indução da MT foi de 40% não sendo verificada alteração na razão GSH:GSSG em decorrência da elevação dos níveis de GSSG em torno de 38%. Tais diferenças também podem ser responsáveis por um efeito inotrópico negativo menos pronunciado em traíras do que nos matrinxãs, uma vez que uma menor quantidade de metal estará disponível no coração das traíras uma vez que tanto a GSH quanto a MT apresentam papel conspícuo no controle e regulação intra e extra celular de metais (ROESIJADI & ROBINSON, 1994). Em camundongos a MT reduz as disfunções contráteis induzidas pela diabetes tais como redução do pico do encurtamento,

prolongamento do tempo para o pico do encurtamento e do tempo para 90% do relaxamento e diminuição das velocidades máximas de encurtamento e relaxamento (WOOL et al., 2006).

Para as traíras, a exposição ao Hg aumentou significativamente o TPT sem alterar o tempo para 50% de relaxamento. Entretanto, de modo semelhante ao observado para os matrinxãs, o Hg reduziu as derivadas máxima e mínima, evidenciando prejuízos nas taxas de contração e relaxamento do miocárdio das traíras. Assim, a exposição trófica ao Hg alterou a cinética de contração e relaxamento do miocárdio de traíra, tornando a ciclagem de cálcio mais lenta, principalmente no que se refere à ativação da contração. Nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> não foram verificadas alterações nos valores absolutos do TPT como ocorreu para as traíras, provavelmente devido as características peculiares do tecido cardíaco de cada espécie ou mesmo pelo tempo de exposição ao Hg.

A anatomia do coração de peixes não é uniforme em todas as espécies e o ventrículo apresenta três formas distintas (sacular, tubular e piramidal), as quais estão associadas a dois tipos diferentes de miocárdio: (i) o misto, caracterizado por uma camada cortical de espessura variável (compacta) e uma camada interna (esponjosa) e (ii) o trabecular, o qual possui apenas uma camada, a esponjosa (SANTER et al., 1983). Tota et al. (1983) propôs quatro categorias principais baseadas na existência e arranjo das camadas esponjosa e compacta e na presença de vasos sanguíneos. O tipo I consiste de miocárdio trabecular e é subdividido em Ia, ausente de vasos coronários penetrantes e Ib, dotado de suprimento vascular exclusivamente epicárdico.

Muitos teleósteos caracterizados por hábitos sedentários, como as espécies bentônicas, apresentam esse tipo de ventrículo. As outras três categorias (II, III e IV) apresentam miocárdio misto irrigado por capilares, sendo o tipo II caracterizado pelo suprimento coronariano apenas na camada compacta e os tipos III e IV apresentam vasos coronarianos que penetram em ambas as camadas do miocárdio misto e no átrio. A diferença entre estes dois últimos tipos está na proporção entre as camadas do miocárdio (menos de 30% de camada compacta no Tipo III). Segundo Farrel & Jones (1992), a maioria dos teleósteos possui coração do tipo II e a maioria dos elasmobrânquios, coração do tipo III. Tubarões endotérmicos e teleósteos ativos apresentam o tipo IV.

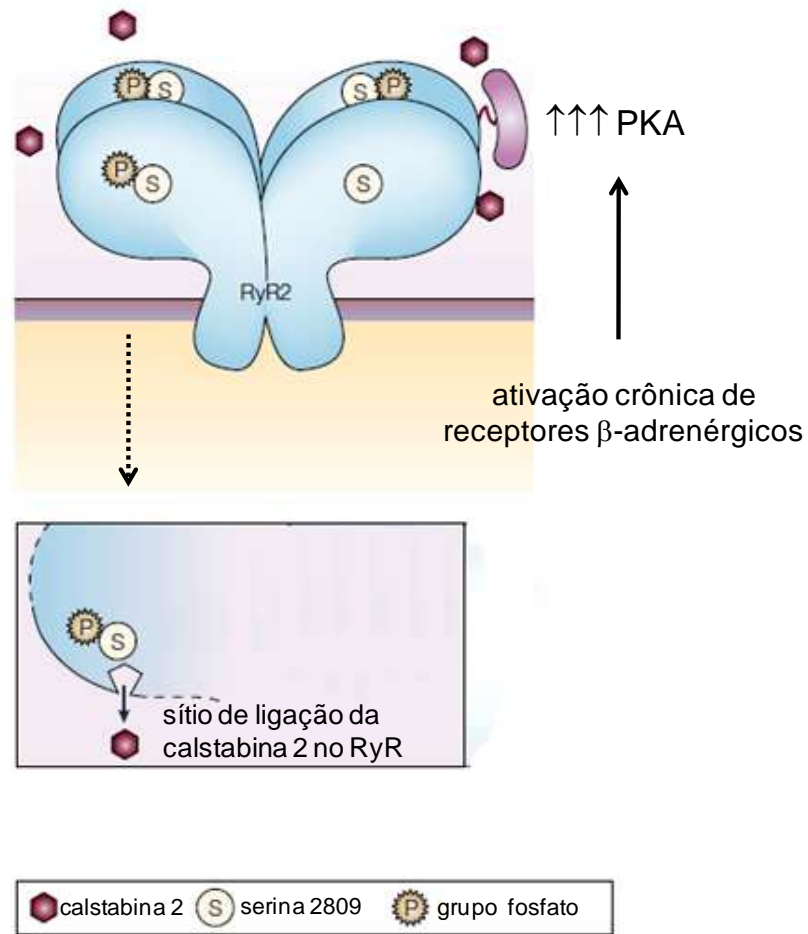
Thomaz et al (2010), estudando as características do miocárdio ventricular dos corações de matrinxã e traíra mostraram que o ventrículo de ambas as espécies apresenta a forma piramidal com uma camada externa de tecido compacto e uma camada interna de tecido esponjoso. A camada compacta contém fibras musculares densas e veias coronarianas. Entre o epicárdio e a camada esponjosa foram observadas artérias coronárias subepicárdicas. A camada esponjosa é bem desenvolvida e formada por um grupo de trabéculas com diferentes formas e lacunas de diferentes tamanhos entre as fibras musculares. Os ventrículos de ambas as espécies

diferem na largura da camada compacta que é mais fina em *H. malabaricus*. A menor quantidade de camada compacta em traíra pode influenciar nos padrões de resposta do músculo cardíaco isolado em situações adversas como frente à exposição ao Hg. Os autores ainda ressaltam que a largura da camada compacta pode estar correlacionada à ecofisiologia das espécies. Uma camada compacta mais larga poderia estar associada a ajustes requeridos para manter um alto metabolismo como em situações de escape de predação, alimentação voraz para piscívoros como a traíra ou ainda durante a natação rápida e constante e a migração características do matrinxã. O desenvolvimento do miocárdio compacto é uma adaptação morfológica relacionada ao nível de atividade da espécie (SANTER & WALKER, 1980).

Simões et al. (1999; 2002) demonstraram que os ventrículos de peixes tropicais ativos como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e do tambaqui (*Colossoma macropomum*) seguiram a correlação descrita acima, apresentando formato piramidal e miocárdio ricamente vascularizado, consistindo de uma camada compacta externa e uma camada esponjosa interna. Porém, esse padrão não foi seguido pelo bagre africano (*Clarias gariepinus*), espécie menos ativa e que apresentou ventrículo sacular com miocárdio misto, irrigado por artérias coronárias. De acordo com Santer & Greer Walker (1980), a quantidade da camada compacta no ventrículo cardíaco de peixes apresenta maior relação com hábitos ecofisiológicos do que com a classificação filogenética. Esta relação está associada, principalmente, à adaptação exigida por espécies que necessitam de uma maior quantidade de energia metabólica periodicamente ou que passam todas as suas vidas em atividades como longas migrações ou natação rápida constante.

Outra hipótese para explicar as diferentes respostas do músculo cardíaco isolado de ambas as espécies frente a exposição ao Hg pode ser o tempo de exposição. De acordo com revisão de Wehrens & Marks (2004), a ativação crônica de receptores  $\beta$ -adrenérgicos resulta em alterações cardíacas que incluem diminuição da expressão e ligação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, aumento da expressão da proteína G inibitória, redução da expressão e função da adenilato ciclase e hiperfosforilação dos RyR pela PKA.

Conforme pode ser observado na figura 14, a hiperfosforilação da serina 2809 dos RyR2 resulta em dissociação da proteína estabilizadora calstabin 2 do canal, deslocando para a esquerda a curva de sensibilidade do receptor ao  $\text{Ca}^{2+}$ , fazendo com que o RyR2 seja mais facilmente ativado por uma mesma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, os RyR2 podem se abrir de maneira anômala durante a diástole levando a um vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  fazendo com que a restauração do conteúdo deste íon no RS ocorra em menor nível. A diminuição da carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, por sua vez, prejudica o acoplamento E-C e a contratilidade durante a sístole levando a arritmias e a falência cardíaca.



**Figura 14** – Hiperatividade crônica de β-receptores levando a hiperfosforilação da serina 2809 do RyR2 pela PKA. Adaptado de Wehrens & Marks (2004).

#### 4.2. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequencia) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC)

Conforme mencionado no capítulo anterior, dentre os diversos grupos de vertebrados existem grandes diferenças no que se refere à relação entre a força de contração e a frequência de estimulação imposta ao músculo cardíaco. Os motivos responsáveis por essas diferenças parecem refletir, indiretamente, variações nos processos que envolvem a acumulação e liberação de  $Ca^{2+}$  na célula, inclusive acerca da forma de participação do RS como fornecedor e acumulador deste íon durante cada etapa do acoplamento E-C (COSTA, 2003; HAJDU, 1969).

Embora a análise da tensão pós-pausa seja a maneira tradicional de se verificar a importância do RS na regulação dos íons  $Ca^{2+}$  em músculo isolado, é importante verificar a

participação do RS em frequências fisiologicamente relevantes por meio do estudo da relação entre a força de contração e aumentos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares na ausência e presença de rianodina, determinando a funcionalidade do RS na frequência observada *in vivo*.

A análise da Fc e dos processos tempo-dependentes das tiras ventriculares de traíra, após incrementos na frequência de estimulação, foi analisada com o objetivo de verificar uma possível limitação dos mecanismos envolvidos com o transporte de cálcio durante o ciclo cardíaco à medida que a frequência é elevada. A relação força-frequência negativa apresentada pela maioria dos teleósteos também foi evidenciada no músculo cardíaco isolado de traíra. Em frequências elevadas, a força é reduzida de 50 a 90% no músculo cardíaco da maioria dos teleósteos antes que as mesmas se tornem arrítmicas (SHIELS & FARREL, 2000; SHIELS et al., 2002). Nas tiras ventriculares das traíras do grupo Ct foi verificada uma redução de aproximadamente 62% da Fc entre as frequências de estimulação de 0,2 Hz (inicial) e 2,0 Hz (frequência máxima atingida). No grupo Hg essa redução foi da ordem de aproximadamente 54%.

O pico de tensão indica a real capacidade inotrópica do coração (SHIELS & FARREL, 1997). Os resultados do presente estudo demonstraram que tanto a exposição ao Hg quanto o tratamento com rianodina afetaram o pico máximo de tensão. Em todas as frequências de estimulação testadas, após a adição de rianodina foram verificados prejuízos de cerca de 67 a 72% na Fc para grupo Ct e de 50 a 56% no grupo Hg comprovando a importância dos estoques de  $Ca^{2+}$  intracelulares para o desenvolvimento da Fc em traíra. Tais reduções foram inferiores aquelas observadas para as tiras ventriculares dos matrinxãs do grupo Ct, o que possivelmente indica um papel mais importante do RS no *B. amazonicus*. Isso pode ser o reflexo das próprias características ecofisiológicas da espécie como alta atividade natatória e migração para reprodução enquanto *H. malabaricus* é uma espécie sedentária.

Esses resultados sugerem que o RS é potencialmente funcional e contribui significativamente para a manutenção da tensão isométrica em traíra, exercendo um papel importante no manejo de cálcio mesmo quando consideradas as frequências observadas *in vivo*. Como reflexo disso, em ambos os grupos experimentais (Ct e Hg), as tiras ventriculares tratadas com rianodina não atingiram as frequências máximas de estimulação alcançadas pelos seus respectivos controles. O inotropismo negativo provocado pela rianodina na frequência observada *in vivo* foi de 70% no grupo Ct, valor este inferior aos observados para o matrinxã (de 82%, capítulo VI) e superiores aos encontrados para outras espécies de teleósteos como a truta e a cavala (HARWOOD et al., 2000; SHIELS & FARREL, 2000). Por outro lado, no grupo Hg, o inotropismo negativo promovido pela rianodina no miocárdio isolado de traíra foi de 52% enquanto que em matrinxã esse valor foi de 41%, indicando mais uma vez que o RS em *B. amazonicus* parece ter um papel mais significativo na contração do que em *H. malabaricus*, apesar da

magnitude da  $F_c$ , obtida *in vitro*, ser equivalente para ambas as espécies (5,48 mN.mm<sup>-2</sup> para o matrinxã e 5,26 mN.mm<sup>-2</sup> para a traíra a 0,2 Hz ou 12 bpm).

Além da  $F_c$ , o TPT e o THR sofreram reduções significativas com o aumento da frequência em todos os grupos experimentais (Ct, Hg, Ct+RIAN e Hg+RIAN), refletindo uma redução frequência-dependente do tempo para o aporte do Ca<sup>2+</sup> às miofibrilas contráteis e de remoção deste íon do citosol, mesmo quando o RS teve sua função bloqueada. Tal redução da capacidade de obtenção e remoção do Ca<sup>2+</sup> livre pode estar associada a mecanismos sarcolemais de transporte deste íon insuficientes do ponto de vista funcional para manutenção do inotropismo cardíaco a elevadas taxas de estimulação, determinando indiretamente o grau de eficiência do acoplamento E-C na musculatura cardíaca (DRIEDZIC & GESSER, 1985).

De maneira semelhante ao observado nos matrinxãs, as tiras ventriculares das traíras do grupo Ct atingiram a frequência de estimulação máxima de 2,0 Hz ou 120 bpm enquanto que as tiras do grupo Hg alcançaram a frequência máxima de 1,6 Hz. Entretanto, quando o RS deixou de ser funcional pela presença da rianodia, as tiras ventriculares das traíras do grupo Ct alcançaram a frequência máxima de 1,4 Hz ou 84 bpm enquanto as tiras do grupo Hg mantiveram suas contrações regulares apenas até a frequência de 1,2 Hz ou 72 bpm. Dessa forma, as tiras ventriculares dos matrinxãs dos grupos Ct e Hg alcançaram frequências máximas superiores as atingidas pelo músculo cardíaco isolado das traíras.

Como há uma correlação entre o desenvolvimento do RS e a frequência de contração máxima que o músculo pode atingir, sendo que as maiores taxas de contração foram encontradas nos tecidos que apresentam um RS mais desenvolvido ou mecanismos de transporte sarcolemais de cálcio mais eficientes, os resultados do presente estudo sugerem um maior desenvolvimento e/ou importância do RS para contração no miocárdio de matrinxã. Independentemente, o Hg reduz a capacidade do miocárdio de matrinxãs e traíras em aumentar a força de contração limitando, assim, os ajustes no débito cardíaco, o que pode limitar a sobrevivência das espécies em determinadas situações que exijam um rápido ajuste do fluxo sanguíneo, tais como na piracema para os matrinxãs, e durante a alimentação de emboscada para as traíras.

Conforme será discutido no capítulo IX, a frequência cardíaca *in vivo* registrada para as traíras do grupo Ct foi de aproximadamente 0,9 Hz (55 bpm) e para as traíras do grupo Hg de aproximadamente 0,7 Hz (40 bpm). Dessa forma, os resultados obtidos aqui indicam que os miócitos das traíras não trabalham, *in vivo*, no limite de sua capacidade de acoplamento E-C, uma vez que o músculo cardíaco isolado manteve suas contrações regulares em frequências de estimulação de até 120 bpm.

A ausência de alteração RT durante a elevação da frequência de contração tanto no grupo Ct como no Hg indica que não há um comprometimento do relaxamento, ou seja, os



mecanismos de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  são eficientes mesmo quando sujeitos a ação combinada de elevadas frequências de estimulação e a presença do Hg. Isso foi corroborado pela ausência de alteração na taxa de relaxamento ( $-\text{dF}_c/\text{dT}$ ) das tiras ventriculares de ambos os grupos experimentais em resposta aos aumentos sucessivos da frequência de estimulação. Assim tanto a SERCA quanto o trocador NCX e a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase da sarcolema foram eficientes na remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  mioplasmático. Por outro lado, no grupo exposto ao Hg+RIAN, foi observado um menor valor de THR somente a 0,2 Hz, indicando que, na ausência do RS funcional, indicando que a exposição ao Hg favorece os mecanismos de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema. O Hg acelera a ciclagem de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema aumentando a atividade do trocador NCX e da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema (BURLANDO et al., 2004; REEVES et al., 1996) conforme discutido detalhadamente no capítulo anterior (Capítulo VI), pois tal efeito também foi observado no miocárdio de matrinxã exposto por 96 horas ao  $\text{HgCl}_2$ .

O tempo de ativação é o tempo despendido do início da contração até o seu pico máximo e traduz a cinética dos processos envolvidos na ativação da contração, ou seja, processos que aumentam a concentração e a cinética de entrada do cálcio no mioplasma (VASSALO et al., 2008). A exposição ao Hg elevou os valores de TPT das tiras ventriculares de traíra, em todas as frequências testadas, tornando a ciclagem do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador mais lenta. Porém, na presença da rianodina, o Hg reduziu os valores de TPT em todas as frequências testadas indicando que o Hg também favoreceu a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema não apenas a sua remoção. Em experimentos com “patch-clamp”, o tratamento com 0,3  $\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  aumenta a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L voltagem-dependentes da membrana de células PC12 e amplificou a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente (ROSSI et al., 1993). Dessa forma, parece que o Hg aumenta o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L, conforme será discutido mais detalhadamente no item 4.3, no protocolo de potenciação pós-pausa, onde tais resultados se tornaram mais evidentes. Como a maior porção do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador provém do RS, os efeitos positivos do Hg sobre a sarcolema se sobrepõem aos efeitos negativos do metal sobre o RS.

Esse efeito do Hg em aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema pode ter contribuído para a manutenção da  $\text{dF}_c/\text{dt}$  das tiras ventriculares das traíras mesmo com incrementos sucessivos na frequência de estimulação, fato não observado para as tiras ventriculares de *B. amazonicus* cujas taxas de contração sofreram reduções significativas com as elevações na frequência de contração. Isso pode indicar que no matrinxã o efeito positivo do Hg sobre a sarcolema parece ser mais importante para os mecanismos de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  pela membrana (trocador NCX e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), o que provavelmente está relacionado as diferentes doses, tempo e vias de exposição ao metal. Tal evidência é corroborada pela redução dos valores de THR do grupo  $\text{HgCl}_2$ +RIAN em todas as frequências de estimulação impostas nas tiras

ventriculares de matrinxã, enquanto que no músculo cardíaco isolado de traíra, essa redução do THR no grupo Hg+RIAN só foi observada a 0,2 Hz.

Nas tiras ventriculares das traíras do grupo Ct, os valores absolutos de TPT começam a sofrer redução significativa a partir de 0,4 Hz, enquanto que a derivada máxima não apresenta diminuição frequência-dependente, mostrando que eficiência dos mecanismos contráteis é mantida. Os presentes resultados sugerem que, para a traíra, os ajustes inotrópicos devem ser tão importantes que os cronotrópicos.

As razões TPT/Fc e THR/Fc também não sofreram reduções significativas em resposta ao aumento na frequência de estimulação, possivelmente devido a elevações nos valores absolutos de TPT e a não alteração da RT, indicando mais uma vez que os mecanismos de relaxamento conseguem ser eficientes mesmo a elevadas frequências de estimulação. No grupo exposto ao Hg, as razões TPT/Fc e THR/Fc mostraram-se superiores em todas as frequências de estimulação testadas, o que evidencia mais uma vez que o Hg prejudica a amplitude do  $Ca^{2+}$  ativador.

Um importante índice de rendimento muscular é dado pela CBC. Para as traíras, os valores máximos da CBP foram obtidos entre 1,4 e 1,8 Hz (84 e 108 bpm) no grupo controle e em 1,6 Hz (96 bpm) no grupo exposto ao Hg (frequência máxima alcançada pelas tiras ventriculares). A exposição ao metal deslocou a curva de frequência ótima para baixo, devido seu efeito negativo no desenvolvimento de tensão isométrica, mostrando que a CBC foi prejudicada pela exposição tóxica ao Hg. Devido ao importante papel do RS como fonte de  $Ca^{2+}$  para a contração a presença de rianodina também deslocou para baixo as curvas de bombeamento cardíaco tanto no grupo Ct quanto no Hg. Conforme discutido no capítulo anterior, concentrações tônicas de adrenalina podem modificar a curva da CBC e modificar a faixa de frequência ótima. De acordo com Rivaroli (2002), tiras ventriculares do miocárdio de traíra não apresentaram nenhuma alteração no desenvolvimento da Fc com adição de concentrações crescentes de adrenalina no meio extracelular, permitindo as inferências aqui apresentadas.

A redução da capacidade de aumentar a performance cardíaca frente a exposição tóxica ao Hg sugere que o animal exposto apresente prejuízos no ajuste do débito cardíaco quando necessário. A traíra é uma espécie absolutamente sedentária, adaptada a ambientes lânticos, de pouca correnteza ou de águas paradas, normalmente sujeitas a bruscas mudanças de temperatura, pH e, principalmente, oxigênio dissolvido (KALININ, 1991). A espécie apresenta baixo metabolismo aeróbico, alta capacidade anaeróbica, extensa área de superfície respiratória e exibe pouca atividade, movimentando-se basicamente para a obtenção de alimento e atividade reprodutiva (KALININ et al., 1993; RANTIN et al., 1992; RANTIN et al., 1993). A espécie apresenta uma demanda de  $O_2$  menor que aquela exigida pelo matrinxã e, portanto, uma baixa taxa metabólica. A taxa metabólica para a traíra em normóxia encontrada no presente estudo foi de 63

mLO<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (capítulo IX) e para o matrinxã foi de 112 mLO<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (capítulo VIII). Dessa forma, é de se esperar que *H. malabaricus* não necessite de uma bomba cardíaca capaz de suportar grandes elevações na frequência de contração como forma de ajustar o débito cardíaco. Entretanto, sendo uma espécie piscívora, depende de ajustes imediatos no débito cardíaco que sustentam o comportamento emboscador voraz.

A partir da discussão precedente, pode-se inferir que os efeitos da exposição trófica e sub-crônica ao Hg tais como reduções no desenvolvimento de força, nas taxas de contração e relaxamento, na frequência de contração máxima e na capacidade de bombeamento cardíaco resultam em prejuízo da performance cardíaca normal. Tais efeitos, em condições naturais, podem afetar significativamente o sucesso de predação da espécie em questão e, conseqüentemente a sua sobrevivência. Cabe ressaltar que os prejuízos cardíacos podem ser ainda mais pronunciados no ambiente natural uma vez que há uma exposição contínua ao mercúrio por via alimentar, e não somente por 30 dias em doses controladas. Adicionalmente, o mercúrio é conhecido por seu alto potencial de biomagnificação acumulando-se ao longo da cadeia trófica, o que faz com que as consequências da contaminação alimentar se agrave pelo consumo de presas de níveis tróficos mais elevados, circunstância que é comum para traíras que exibem até mesmo canibalismo.

### 3.3 Tensão pós-reposo

Apesar de haver menos informações disponíveis para vertebrados inferiores, observações ultraestruturais demonstram que o RS é mais desenvolvido em dipnóicos (HOCHACHKA & HULBERT, 1978) e em alguns teleósteos ativos, como salmonídeos e sconbrídeos (KEEN et al., 1992). Os resultados do presente estudo contrariam tais assertivas, uma vez que a traíra, sendo uma espécie sedentária, apresentou um RS funcional, exibindo potenciações pós-reposo após pausas diastólicas de 10 a 300 segundos e o tratamento com a rianodina as aboliu completamente.

A ausência de um RS funcional limita as frequências máximas e normalmente resulta em incrementos significativos da tensão de reposo a frequências mais elevadas, indicando um relaxamento insuficiente devido a uma retirada ineficaz do cálcio do sarcoplasma. Isso não foi observado no presente estudo, onde não foram identificadas alterações na RT com aumentos sucessivos na frequência de estimulação. Adicionalmente, conforme discutido no item anterior, a adição de rianodina reduziu a frequência máxima de contração alcançada pelas tiras

ventriculares (de 120 bpm no grupo Ct para 84 bpm no grupo Ct+RIAN), o que reforça ainda mais a contribuição funcional do RS para a contração no miocárdio de traíra. Rivaroli (2002) também demonstrou que a contração ventricular de *H. malabaricus* é dependente dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  uma vez que foi observado o desaparecimento da potenciação pós-pausa da tensão isométrica ao utilizar-se a rianodina.

No presente estudo, tanto a pausa prolongada de 5 min como as pausas de 10, 30 e 60 segundos promoveram um significativo aumento na tensão isométrica das tiras ventriculares de traíra, tanto do grupo Ct quanto do Hg. A potenciação mais pronunciada, de aproximadamente 42%, foi registrada após a pausa de 300 segundos nas tiras ventriculares das traíras do grupo Ct. A exposição trófica ao Hg não aboliu totalmente a potenciação pós-pausa, mas a reduziu significativamente após a pausa de 300 segundos, sugerindo uma provável redução da atividade da SERCA. Em miócitos de mamíferos, o efeito do Hg em reduzir a atividade da SERCA e a potenciação pós-reposo também foi demonstrado por Brunder et al. (1998), Oliveira et al. (1994) e Vassalo et al. (1996).

Os prováveis efeitos do Hg sobre o RS foram discutidos pormenorizadamente no capítulo anterior e incluem vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos RyR e/ou redução da atividade da SERCA; via ação direta do Hg nos radicais -SH das proteínas destes canais ou via indireta por indução de estresse oxidativo. Segundo Kuster et al. (2010), a falência cardíaca está associada a um aumento do estresse oxidativo e um acoplamento E-C anormal caracterizado pela depleção dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS e redução da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente. Os autores expuseram miócitos ventriculares de ratos adultos estimulados a 5 Hz a 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 15 min e observaram redução progressiva do encurtamento celular que foi associada a depleção do  $\text{Ca}^{2+}$  do RS via modulação redox por oxidação de grupos tiólicos da SERCA e do trocador NCX. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  causou uma diminuição da atividade da SERCA e um aumento da atividade do trocador NCX.

Kaplan et al. (2003) verificaram que em vesículas isoladas do RS de cardiomiócitos, o estresse oxidativo reduziu a velocidade máxima da SERCA sem alterar a afinidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a glutathiona previniu parcialmente as modificações oxidativas da SERCA mantendo sua atividade. Tais alterações podem ter ocorrido também no miocárdio de traíra que após a exposição trófica ao Hg apresentou elevações na peroxidação lipídica e protéica que caracterizam estresse oxidativo apesar de ter ocorrido aumento no conteúdo de GSH e na razão GSH:GSSG, sugerindo a manutenção da homeostase redox dos miócitos. Isso justificaria não só o efeito do Hg em reduzir não só a potenciação pós-pausa como também as taxas de contração e relaxamento da primeira contração após as pausas diastólicas testadas e em aumentar os valores absolutos de TPT sem alterar o THR, semelhante aos resultados observados nos protocolos de efeito do tempo e força-frequência. Dessa forma, o Hg lentificou a ciclagem do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador corroborando a hipótese de

que o metal age sobre o RS promovendo um vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou reduzindo a atividade da SERCA, ao mesmo tempo em que aumentando a atividade do trocador NCX, possa ter contribuído para a manutenção dos valores absolutos de THR.

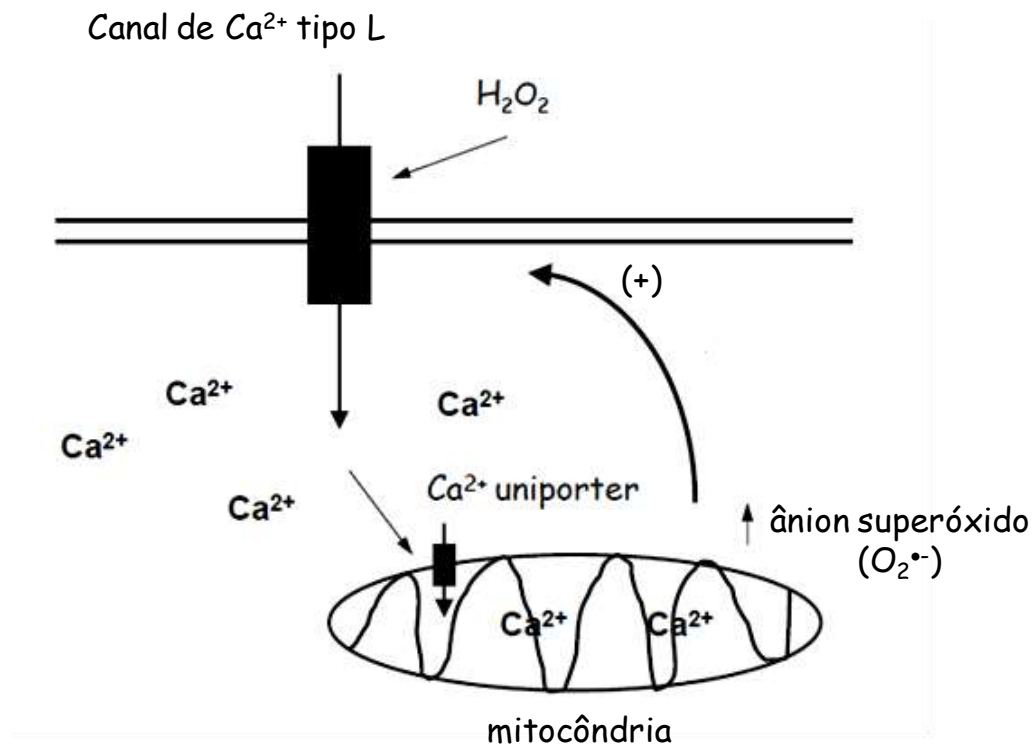
A adição da rianodina aboliu completamente e igualmente a potenciação pós-pausa tanto no grupo Ct quanto no Hg, não havendo diferenças entre os grupos. O tratamento com rianodina também diminuiu as derivadas máximas e mínimas das ondas de contração isométrica obtidas após pausas diastólicas de 10 a 300 s provavelmente devido à inibição do RS, uma vez que grande porção do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador provém dos estoques intracelulares nesta espécie. Entretanto, as tiras ventriculares dos matrinxãs do grupo Hg tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de rianodina exibiram valores de  $dF_c/dT$  e  $-dF_c/dT$  significativamente superiores aquelas do grupo Ct+RIAN sem alterar o TPT e o THR. Mais uma vez fica evidente o duplo efeito do Hg atuando negativamente no RS e, ao mesmo tempo, aumentando velocidade de entrada e saída de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema.

No caso das traíras, especificamente no protocolo de tensão pós-repouso, a ação do Hg em favorecer a ciclagem de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema fica mais bem evidenciada do quando analisados os resultados obtidos para o matrinxã e discutidos no capítulo anterior. A retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  mais acelerada do citosol pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema e/ou do trocador NCX bem como a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L parecem ser de alguma forma favorecida pelo Hg, uma vez que a sarcolema é a única responsável pela primeira contração no pós-pausa quando o RS está bloqueado pela presença da rianodina. Isso pode ser uma das razões para explicar a redução da potenciação pós-repouso apenas após 300 segundos de pausa nas tiras ventriculares das traíras expostas troficamente ao Hg. Essas diferenças obtidas nas taxas de contração e relaxamento entre os grupos Ct+RIAN e Hg+RIAN, não foram evidenciadas nos protocolos de efeito do tempo e de força-frequência provavelmente devido à estimulação elétrica contínua seja a 0,2 Hz ou mais, que impede que todo  $\text{Ca}^{2+}$  seja removido do miócito entre cada batimento como acontece nas pausas diastólicas não fisiológicas além da grande importância do RS, quando na ausência da RIAN, para a contração sobrepondo-se ao influxo transsarcolemal do  $\text{Ca}^{2+}$  o que parece encobrir o efeito positivo do Hg na sarcolema.

As formas com que o Hg pode acelerar a ciclagem de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema são aumentando a atividade do trocador NCX e da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema, mecanismos discutidos detalhadamente no capítulo anterior, e aumentar o tempo e/ou abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (HUDASEK et al., 2004; McDONALD et al., 1994). O portão dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes contém muitas cisteínas. A subunidade  $\alpha 1$  dos canais do tipo L, por exemplo, contém 48 cisteínas. Esses resíduos de cisteína são alvos de modificações redox, pois reagem facilmente com as ERO formando pontes dissulfeto intramoleculares (CAMPBELL et al., 1996; GILBERT, 1990). Em miócitos ventriculares de porquinho da índia e de sapo, agentes de

oxidação tiol-específicos aumentam a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L (HOOL, 2000; YAMAOKA et al., 2000).

Hool (2007) propôs um modelo (Fig. 15) para explicar o aumento da densidade da corrente basal dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L do miocárdio como resultado do estresse oxidativo. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida os canais do tipo L causando um aumento da densidade da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  e, conseqüentemente, aumentando a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria, o que leva a um aumento da produção do ânion superóxido mitocondrial que, por sua vez, promove futuras oxidações do canal, num mecanismo de retroalimentação positiva. O aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pode contribuir para alterações na homeostasia do íon durante o estresse oxidativo.



**Figura 15** – Modelo explicando o aumento da corrente basal do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L do miocárdio como resultado do estresse oxidativo. Adaptado de Hool (2007).

A geração de ERO pela mitocôndria é dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e aumenta proporcionalmente com o aumento da captação do íon pela matrix mitocondrial (BROOKES et al., 2004; ZOROV et al., 2000). Tais efeitos persistem após 9 horas de uma curta exposição (de 5 a

25 min) ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, a oxidação transitória do canal de Ca<sup>2+</sup> pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser suficiente para aumentar a produção do ânion superóxido pela mitocôndria devido ao aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> pelos canais L. O efeito persiste em decorrência de um “feedback” positivo existente entre a atividade basal do canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L, o elevado nível de Ca<sup>2+</sup> intracelular e a produção de superóxido pela mitocôndria (HOOL, 2007).

#### 4.4 Papel do RS

A representação gráfica (Fig. 11) da contribuição relativa do Ca<sup>2+</sup> acumulado no RS para geração de Fc e CBC em função das diferentes frequências de estimulação testadas revela que no ventrículo de traíra, há uma contribuição significativa do RS para o fornecimento do Ca<sup>2+</sup> ativador que supera a participação dos mecanismos sarcolemas como canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L e trocador NCX atuando no modo reverso. A exposição ao Hg reduziu significativamente essa contribuição do RS tornando-a semelhante à contribuição do influxo sarcolemal de Ca<sup>2+</sup>.

Os resultados do presente estudo contrariam a hipótese de que a presença de um RS funcional seja uma característica intrínseca de espécies de natação rápida conforme proposto por Shiels & Farrel (2000), que sugeriram uma forte correlação entre o nível de atividade e o grau de participação do RS no acoplamento E-C. A traíra é uma espécie sedentária que também apresenta sensibilidade a rianodina e uma contribuição do RS de cerca de 67% no desenvolvido da Fc, contrapondo a hipótese acima. Uma explicação para a presença de RS funcional em espécies sedentárias pode ser a posição sistemática em que se encontram. Rivaroli (2002), revisando a filogenia, relatou que as espécies tropicais que apresentam RS funcional pertencem à superordem OSTARIOPHYSI. É o caso do matrinxã e da traíra, espécies estudadas aqui. Da mesma forma, o pacu, estudado por Anelli Jr. (2002), o curimatá, estudado por Rivaroli (2002) e a carpa, estudada por Chugun et al. (1999) também apresentam RS funcional e pertencem a esta superordem, sugerindo que esta seja uma característica comum aos OSTARIOPHYSI, especialmente os neotropicais.

Reforçando essa hipótese, peixes que não apresentam sensibilidade à rianodina pertencem, em sua maioria a outras superordens de teleosteos. A tilápia-do-Nilo, o emboré, o linguado e o “sea raven” pertencem à superordem ACANTHOPTERYGII. Exceções a essa regra seriam os membros da família SCOMBRIDAE como os atuns e a cavala que apresentam RS funcional mesmo pertencendo à superordem ACANTHOPTERYGII. Porém, neste caso, a presença de RS funcional parece mais relacionada ao alto grau de atividade de suas espécies,

constituindo-se em uma característica adaptativa desta família (RIVAROLI, 2002) e um conservacionismo filogenético desta estrutura.

Por outro lado, apesar da traíra ser uma espécie absolutamente sedentária e adaptada a ambientes lênticos, é piscívora e muito voraz apresentando um comportamento emboscador. Dessa forma, durante o consumo das presas, no momento da emboscada extremamente rápida, a espécie requer ajustes cardiovasculares, uma vez que o aumento do débito cardíaco é proporcional à intensidade do exercício. Assim, para que esta demanda seja suprida, a presença de um RS funcional nessa espécie também pode ser uma importante característica adaptativa com o objetivo de garantir a performance predatória.

Conforme discutido minuciosamente no capítulo anterior, o Hg impacta negativamente o RS podendo provocar vazamento do  $Ca^{2+}$  pelos canais de rianodina e/ou redução da atividade da SERCA. Este efeito negativo do Hg sobre o RS parece ser um mecanismo importante para seu o efeito inotrópico negativo, reduzindo a contratilidade miocárdica e a CBC, uma vez que o RS parece oferecer importante contribuição para o manejo de  $Ca^{2+}$  no músculo cardíaco dessa espécie em termos de acumulação e liberação deste íon. Assim, a exposição ao Hg, via dieta, não só compromete o funcionamento do coração das traíras como bomba como também pode afetar a performance predatória, uma vez que o comportamento de emboscada depende de um funcionamento eficiente do aparelho cardiovascular. Alterações fisiológicas resultantes da exposição a xenobióticos requerem mudanças comportamentais compensatórias que acabam por modificar as interações do indivíduo com seu ambiente e, assim repercutem em suas interações ecológicas tanto no nível de população quanto nas comunidades, podendo vir a prejudicar o estabelecimento de suas populações.

#### **4.5 Massa ventricular relativa (MVR)**

Em peixes, a massa ventricular relativa (MVR) apresenta uma grande variação, tanto interespecífica quanto intra-específica (FARREL & JONES, 1992). Diferenças na massa ventricular podem resultar em alterações no débito cardíaco (HILLMAN 1976). É conhecido que a exposição crônica a xenobióticos causa hipertrofia ventricular (CALORE et al., 2007). É importante enfatizar que, devido à ausência de túbulos transversos (túbulos T) nos miócitos de peixes, mesmo uma hipertrofia moderada pode aumentar a distância de difusão, afetar rapidamente o metabolismo aeróbio e limitar a contratilidade muscular (CLARK & RODNICK, 1998). Entretanto, no presente trabalho, os ventrículos das traíras expostas ao Hg por 30 dias apresentaram redução



da MVR ao invés da esperada hipertrofia. Já para os matrinxãs expostos por 96 h ao Hg, nenhuma alteração significativa na MVR foi verificada.

Oliveira Ribeiro et al. (2008) avaliaram os efeitos da exposição durante 7, 21 e 63 dias a  $13,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de metilmercúrio na dieta sobre a morfologia do músculos esqueléticos branco e vermelho do peixe paulistinha (*D. rerio*). O Hg promoveu pronunciada desorganização das miofibrilas, diminuição do espaço entre os feixes de fibras, dilatação das sisternas do RS, diminuição do tamanho das mitocôndrias e desorganização de suas cristas. Assim, como o Hg é capaz de promover alterações estruturais nos músculo, a diminuição da MVR observada nas traíras pode ser o resultado desse efeito.

O Hg ainda é capaz de promover lesões pré-apoptóticas manifestadas anteriormente à morte celular (CARRANZA-ROSALES et al., 2005), que também podem contribuir para a redução da massa ventricular. Neste sentido, Gonzalez et al. (2005), evidenciaram um aumento na expressão de genes pré-apoptóticos tais como C-jun e Bax, em células musculares de *D. rerio* após exposição ao Hg.

Outro mecanismo que deve ser considerado como contribuinte na redução da MVR é o possível papel do estresse oxidativo na indução de alterações fenotípicas no coração (LUO et al., 2006). O aumento da produção de EROs pode conduzir a necrose dos miócitos. Alterações na permeabilidade da membrana como resultado de processos oxidativos (peroxidação lipídica) pode causar um acúmulo de  $\text{Na}^+$  e uma menor atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, o que é acompanhado por aumentos no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, devido a um declínio na troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (TAYLOR & SHAPPEL, 1995). Esse  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumentado ativa as fosfolipases e proteases, produzindo alterações citoesqueléticas que, por fim, resultam em características morfológicas de lesão celular irreversível e necrose franca (SCHAME, 1979).

Em miócitos cardíacos, rápidas modificações no oxigênio celular e na geração de ERO podem contribuir para instabilidade eletrofisiológica e o desenvolvimento de arritmias (KEATING, 2001; TANSKANEN et al., 2005). Tais assertivas corroboram os achados do presente estudo, onde as tiras ventriculares das traíras expostas troficamente ao Hg exibiram muitas contrações espontâneas além de arritmias cardíacas observadas *in vivo* que serão discutidas no capítulo IX. O Hg pode aumentar a condutância dos canais de  $\text{K}^+$  ou por sua ligação direta a resíduos de -SH do canal ou pelo aumento da produção de ERO também capazes de oxidar tais grupamentos (ICHINARI et al., 1996; LIU & GUTTERMAN, 2002). Lesões induzidas pelo Hg nas células marcapasso espalhadas pelo ventrículo alterando o limiar do potencial das mesmas não pode ser descartadas como uma possível causa para o aumento das contrações espontâneas nas tiras ventriculares dos peixes expostos ao metal.

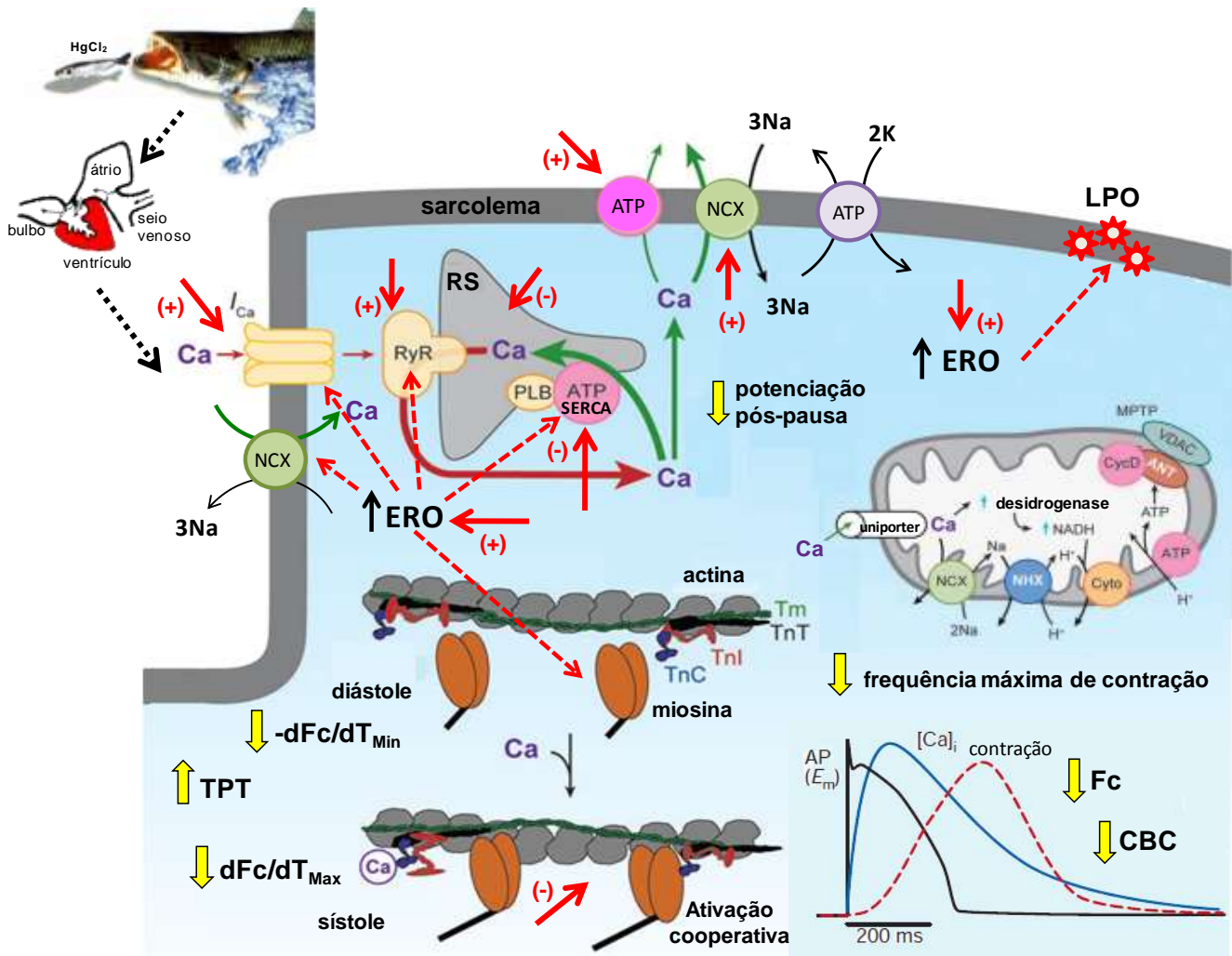
## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo sobre os efeitos do Hg, via dieta, no acoplamento E-C de *H. malabaricus* são sumarizados no esquema proposto na figura 16.

A exposição trófica ao Hg também limitou a manutenção da performance cardíaca de traíra, mesmo na frequência cardíaca fisiológica, prejudicando o acoplamento E-C ao promover: redução da força de contração, uma ciclagem de cálcio mais lenta no interior dos miócitos levando a um déficit nas taxas de contração e relaxamento, redução da contribuição do RS como principal fonte de  $Ca^{2+}$  ativador ao aparato contrátil, redução da CBC e da frequência de contração máxima atingida pelas tiras ventriculares deslocando as curvas de frequência ótima para baixo e para a esquerda, respectivamente.

Segundo Bickham et al. (2000), os poluentes podem apresentar efeitos tóxicos ao nível molecular, mas também iniciar uma cascata de respostas a níveis mais altos tais como nos tecidos e órgãos, saúde do organismo e estabelecimento das populações. As alterações encontradas no presente estudo associadas a uma pronunciada bradicardia, podem conduzir a falhas nos ajustes do débito cardíaco, o que pode ser crítico durante condições hipóxicas, comumente enfrentadas por esta espécie na natureza ou ainda, por ser uma espécie piscívora e muito voraz, comprometer a desempenho da predação e, conseqüentemente, sua sobrevivência, podendo tornar as populações mais vulneráveis.

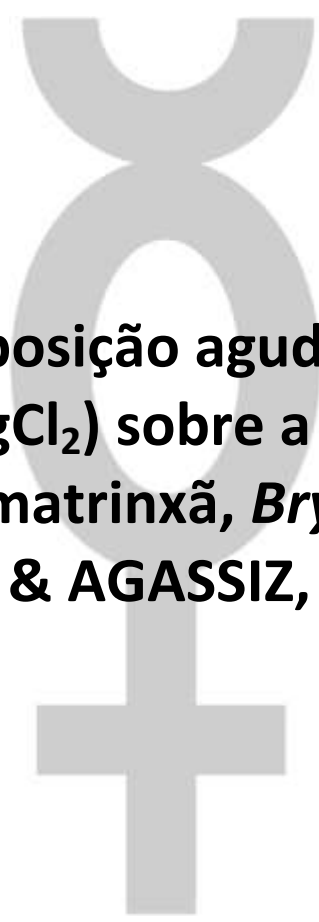
Vale ressaltar que na natureza geralmente há uma exposição contínua ao mercúrio por via alimentar, e não somente por 30 dias em doses controladas, além do grande potencial de biomagnificação do Hg que podem agravar as consequências da contaminação. Conseqüentemente, o uso do Hg deve ser cuidadosamente avaliado, pois o metal representa um sério risco à biota aquática, a preservação da biodiversidade e a saúde da população que utiliza o peixe como principal fonte protéica.



**Figura 16** - Diagrama ilustrativo dos possíveis efeitos da exposição trófica e sub-crônica (30 dias) ao  $HgCl_2$  no acoplamento E-C (setas em vermelho) no miocárdio de traíra, *H. malabaricus*. (Adaptado de BERS, 2002; 2008). As setas amarelas representam as alterações induzidas pelo  $HgCl_2$  nos parâmetros analisados.

## CAPÍTULO VIII

**Efeitos da exposição aguda ao mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre a função cardíoro-respiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)**



---

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição aguda ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) dissolvido na água sobre as respostas cárdio-respiratórias à hipóxia gradual em matrinxã *Brycon amazonicus*. Exemplares juvenis, foram divididos em 2 grupos ( $n=12$ ). Um dos grupos foi utilizado como controle e o outro foi exposto por 96 horas a concentração nominal e subletal de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  (1/5 da  $\text{CL}_{50}$  96h) em sistema estático. Em normóxia (140 mmHg) e nas subseqüentes tensões de  $\text{O}_2$  hipóxicas de 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg foram feitas as determinações dos seguintes parâmetros cárdio-respiratórios: taxa metabólica ( $\dot{V}\text{O}_2$ ), tensão crítica de  $\text{O}_2$  ( $\text{P}_{\text{cO}_2}$ ), ventilação branquial ( $\dot{V}_{\text{G}}$ ), freqüência respiratória ( $f_{\text{R}}$ ), volume ventilatório ( $\text{V}_{\text{T}}$ ), extração de  $\text{O}_2$  da corrente ventilatória ( $\text{EO}_2$ ), necessidade ventilatória ( $\dot{V}_{\text{G}}/\dot{V}\text{O}_2$ ), pressões intrabucal (PIB) e intra-opercular (PIO), freqüência cardíaca ( $f_{\text{H}}$ ) e análise dos componentes do eletrocardiograma (duração e amplitude das ondas P e T e complexo QRS, duração do segmento S-T e dos intervalos P-R, R-R, Q-T e J-T). Com a redução da tensão de  $\text{O}_2$  da água, os peixes do grupo controle aumentaram a  $\dot{V}_{\text{G}}$ ,  $f_{\text{R}}$ ,  $\dot{V}_{\text{G}}/\dot{V}\text{O}_2$ , e o  $\text{V}_{\text{T}}$  e diminuíram, em hipóxia severa, a  $\dot{V}\text{O}_2$ ,  $\text{EO}_2$  e  $f_{\text{H}}$  (bradicardia). A exposição ao  $\text{HgCl}_2$  promoveu: aumento da  $\text{P}_{\text{cO}_2}$  de 25 para 52,5 mmHg; hiperventilação entre as tensões de  $\text{O}_2$  de 140 a 60 mmHg e redução da PIB. Os matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  não conseguiram elevar a níveis controle a  $\dot{V}_{\text{G}}$  e o  $\text{V}_{\text{T}}$  em hipóxia severa reduzindo consideravelmente a magnitude do aumento desses parâmetros devido a uma hipoventilação nas tensões de  $\text{O}_2$  de 40 e 20 mmHg. O  $\text{HgCl}_2$  também reduziu a capacidade dos matrinxãs em manter a  $\dot{V}\text{O}_2$ ,  $\text{EO}_2$  e  $f_{\text{H}}$  constantes até as tensões de  $\text{O}_2$  alcançadas normalmente pelos matrinxãs controles. Em relação ao eletrocardiograma, a hipóxia promoveu aumentos no intervalo R-R, no QTc e nas amplitudes da onda T e do complexo QRS, além de redução na amplitude da onda P e do intervalo P-R. Adicionalmente, a exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  foi capaz de promover, em todas as tensões de  $\text{O}_2$  analisadas, aumentos no intervalo P-R e no segmento S-T caracterizando, respectivamente, um bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau e um prolongamento do platô do potencial de ação do músculo cardíaco com concomitante facilitação da repolarização ventricular, ao também promover a redução da duração da onda T. A análise de variância ANOVA two-way mostrou que há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e  $\text{HgCl}_2$  para os parâmetros  $\dot{V}_{\text{G}}$ ,  $\text{V}_{\text{T}}$ ,  $f_{\text{H}}$  e PIB indicando que o padrão de resposta de tais parâmetros frente à hipóxia gradual é influenciado e depende da exposição ao  $\text{HgCl}_2$ . Tais resultados sugerem que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  prejudica as respostas cárdio-respiratórias frente à hipóxia gradual, tornando a espécie, que é pouco tolerante a hipóxia, mais susceptível. Isso é particularmente agravante na época de reprodução onde a espécie reofílica, que normalmente habita águas bem oxigenadas, enfrenta ambientes de oxigenação bastante variável no percurso em direção a cabeceira dos rios.

## 1 INTRODUÇÃO

Quantidades mensuráveis de mercúrio são encontradas na maioria dos ecossistemas aquáticos devido à combinação de fontes poluidoras naturais e antropogênicas (POST et al., 1996). Conforme detalhadamente exposto no capítulo I, o nível de mercúrio total encontrado em ecossistemas aquáticos, incluindo águas brasileiras, varia de 0,002 até 230  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (ALINNOR, 2005; BOLLEN et al., 2008; HYPOLITO et al., 2004). Além da presença de poluentes, os peixes suportam ainda flutuações sazonais e diurnas dos fatores abióticos como temperatura e  $\text{O}_2$  dissolvido. Essas alterações são particularmente mais pronunciadas em ambientes dulciaquícolas tropicais aonde os peixes chegam a sofrer, por exemplo, flutuações nos níveis de  $\text{O}_2$  dissolvido na ordem de 150% ou mais durante a supersaturação e de 5% ou menos na hipóxia (SAINT-PAUL & BERNARDINO, 1988).

Dessa forma, o mercúrio e a hipóxia ambiental coexistem, sendo constantes desafios a serem enfrentados pela biota aquática. A superação de tais desafios requer a ação de mecanismos homeostáticos e adaptativos altamente especializados que permitem uma maximização na utilização do  $\text{O}_2$  disponível mesmo numa condição adversa. A presença desses fatores (Hg e hipóxia) é particularmente comum para a espécie *Brycon amazonicus*, que é nativa das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins, além de estar amplamente distribuída nas principais bacias hidrográficas brasileiras. Estudos referentes à poluição do ambiente por Hg são relatados nas regiões norte e central do Brasil, onde elevadas concentrações estão associadas ao garimpo de ouro, efluentes industriais e pesticidas usados na agricultura (BASTOS et al., 2006; LACERDA et al., 2000; MORAES et al., 1997). No sudeste e sul, a maioria das fontes de Hg é oriunda de efluentes industriais e domésticos e da queima de combustíveis fósseis (MARINS et al., 1998; MIRLEAN et al., 2005; PARAQUETI et al., 2004; SILVA FILHO et al., 2006). Consequentemente, em seus habitats naturais, o matrinxã frequentemente está sujeito a contaminação mercurial e a hipóxia ambiental. Os estudos sobre as habilidades em responder à hipóxia ambiental apresentadas por espécies que normalmente enfrentam tais condições são de fundamental importância para ajudar a garantir o sucesso das mesmas dentro dos diferentes habitats, além de contribuir para o entendimento de como sua propagação e perpetuação podem ser prejudicadas pela crescente poluição dos mananciais aquáticos.

A manutenção de um transporte adequado de  $\text{O}_2$  do ambiente até os tecidos está relacionada com a utilização de mecanismos de ajustes respiratórios imediatos que, por sua vez, estão relacionados com o grau de atividade do animal, o meio no qual vive, a superfície funcional respiratória e os parâmetros hematológicos (HUGHES, 1973). Geralmente, em situações de hipóxia, os peixes utilizam mecanismos homeostáticos respiratórios que, dentro de determinados limites, conseguem manter a transferência de  $\text{O}_2$  do meio para os tecidos (RANTIN & MARINS, 1984). A literatura descreve que a primeira resposta à hipóxia ambiental observada na maioria das

espécies de teleósteos é o aumento na ventilação branquial acompanhado por uma bradicardia e por um aumento da área da superfície funcional de troca gasosa e, conseqüentemente, da tomada de O<sub>2</sub> (HUGHES & SAUNDERS, 1970; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979; RANTIN, 1993; SAUNDERS, 1962). Hochachka (1980) considera que a hipóxia em peixes ativa três mecanismos reflexos: hiperventilação e bradicardia.

Apesar da toxicidade elevada e bem conhecida do mercúrio, poucos estudos avaliaram seus impactos sobre a fisiologia cardio-respiratória de organismos aquáticos, em especial, de peixes brasileiros. Os estudos já realizados enfocaram principalmente os efeitos do Hg sobre a taxa metabólica e os parâmetros sanguíneos. No peixe mosquito, *Gambusia holbrooki*, a exposição por 48 horas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> elevou em 16% a taxa metabólica (TATARA et al., 2001). Segundo Calow (1991) a exposição a metais resulta em um aumento da taxa metabólica dos organismos aquáticos que reflete a grande demanda energética para processos de reparo de danos e depuração. Por outro lado, no camarão, *Pandalus borealis*, a exposição por 27 horas a 160 µg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> reduziu a taxa metabólica em 59%. Porém, em carpa (*Cyprinus carpio*) e em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não foram identificadas alterações na taxa metabólica após 1 hora de exposição a 25, 50 e 100 µg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> (JEZIERSKA & SARNOWSKI, 2002). Assim, o efeito do Hg sobre a taxa metabólica de animais aquáticos parece depender da espécie, da concentração de Hg utilizada e do tempo de exposição. Em relação ao sistema cardiovascular, há trabalhos realizados apenas com ratos e pessoas contaminadas por mercúrio, e os dados apontam para capacidade do metal em induzir disfunção nervosa parassimpática afetando a atividade autonômica do coração, além de seus efeitos deletérios sobre a pressão arterial e a variabilidade cardíaca (LIM et al., 2010; MURATA et al., 2006; OKA et al., 2003; VALERA et al., 2008).

Os estudos sobre os efeitos do Hg em peixes predominantemente descrevem a taxa de sobrevivência dos animais, as alterações morfológicas, a capacidade de bioacumulação do metal e seu impacto negativo nos processos reprodutivos (DREVNICK & SANDHEINRICH, 2003; HAMMERSCHMIDT et al., 2002; MELA et al., 2007). Tendo em vista a lacuna ainda existente na literatura sobre os efeitos do Hg em peixes brasileiros, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da exposição aguda (96 horas) e sub-letal ao mercúrio inorgânico (0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>) nas variáveis respiratórias (taxa metabólica; tensão crítica de O<sub>2</sub>; ventilação branquial; necessidade ventilatória; extração de O<sub>2</sub>; frequência respiratória; volume ventilatório; pressão intra-bucal; pressão intra-opercular e ventilação total) e nos parâmetros cardíacos (frequência cardíaca; intervalo R-R, amplitude e duração das ondas P e T e do complexo QRS; duração dos intervalos P-R, Q-T e J-T e do segmento S-T) de matrinxã, *B. amazonicus*, tanto em normóxia (tensão de O<sub>2</sub> de 140 mmHg) quanto em hipóxia gradual (tensões de O<sub>2</sub> de 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Exemplares juvenis e de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram adquiridos do Centro de Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros com recirculação de água de clorada (pH 7,0-7,5; DO<sub>2</sub> 6,5-7,3 mg.L<sup>-1</sup>; dureza 48-56 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade 40-43 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e condutividade 120-128 µS.cm<sup>-1</sup>), aeração constante (condições normóxicas, P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 45 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante o período de aclimação, os matrinxãs foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada com 40% de proteína, própria para peixes (Pira Alevinos - Guabi Nutrição Animal®).

### 2.2 Desenho Experimental

Antes do início do experimento, os matrinxãs ( $W_T = 169,22 \pm 7,24$  g;  $L = 23,19 \pm 0,35$  cm) foram aleatoriamente divididos em dois grupos de doze peixes cada um: grupo controle (Ct), em que os peixes permaneceram em água sem mercúrio e grupo exposto ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) na concentração nominal e sub-letal de 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (~1/5 da CL<sub>50</sub> 96 horas). Os peixes foram expostos individualmente em sistema estático mantendo a proporção de 1,0 g de peixe por litro de água. Os detalhes da exposição e da escolha da dose testada foram descritos nos Capítulos III. Nos peixes de ambos os grupos experimentais foram avaliados os parâmetros respiratórios e a atividade cardíaca tanto em normóxia quanto em hipóxia gradual, conforme metodologia descrita a seguir.

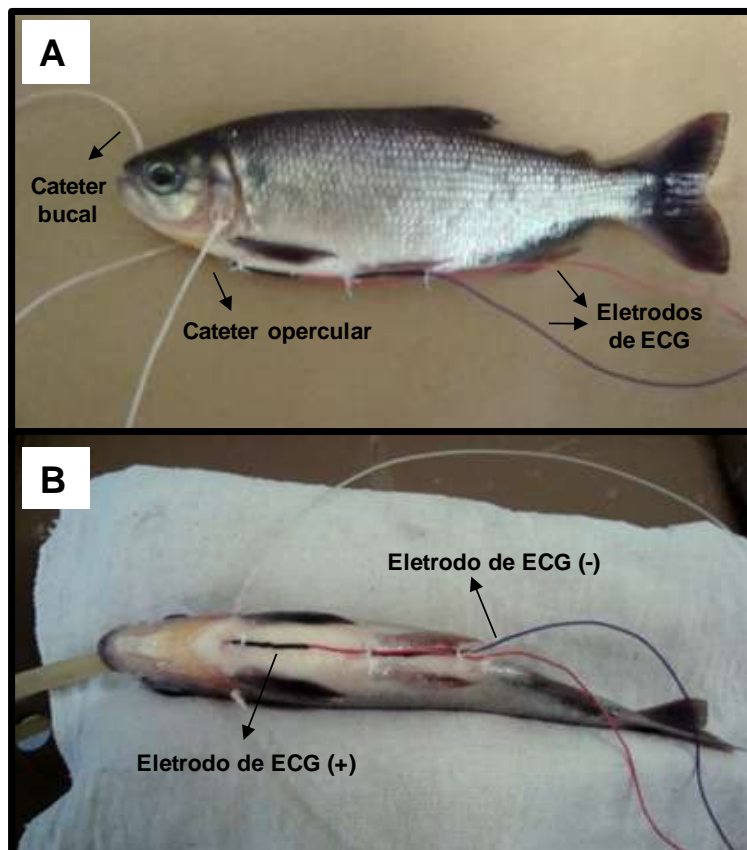
### 2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais

As preparações empregadas para a aquisição dos parâmetros respiratórios foram baseadas nas metodologias de Hughes et al. (1983), Hughes & Saunders (1970) e Rantin et al. (1992). As preparações para obtenção dos eletrocardiogramas (ECG) foram baseadas na metodologia utilizada por Glass et al. (1991) e adaptada por Rantin et al. (1993).

As cirurgias foram precedidas de um processo de anestesia no qual os peixes foram submetidos a um banho em benzocaína 0,005% por aproximadamente 5 minutos em conformidade com as normas da "American Veterinary Medical Association" (AVMA, 2001) e do "Canadian Council on Animal Care - Guidelines on the Care and Use of Fish in Research,



Teaching, and Testing” (CCAC, 2005). Imediatamente após a anestesia, os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica para a implantação dos cateteres de polietileno na cavidade bucal e nos opérculos e para a sutura de eletrodos de ECG para o registro da atividade cardíaca (Fig. 1), sendo que tais procedimentos tiveram duração máxima de 10 minutos.

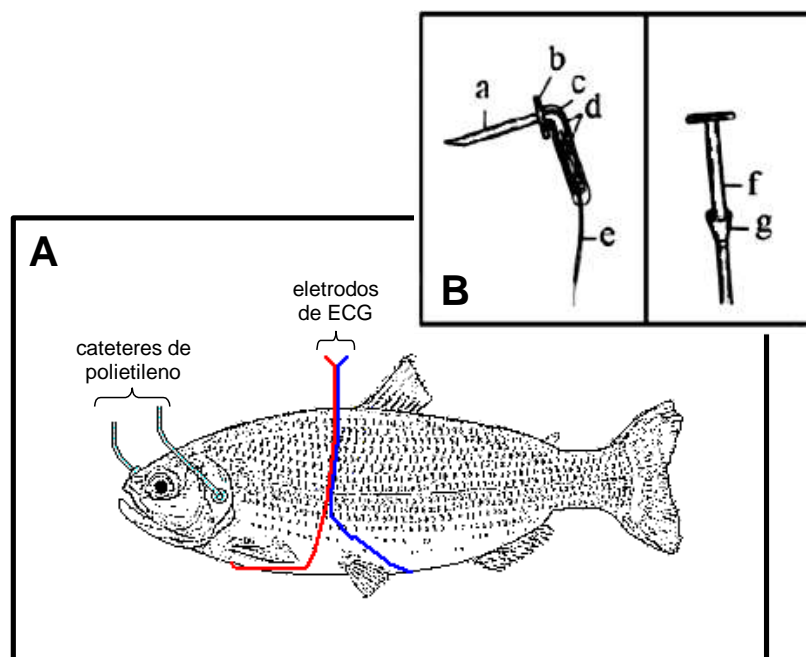


**Figura 1** - Fotos mostrando em **A**: a posição de inserção dos cateteres de polietileno da boca e dos opérculos e, em **B**: os eletrodos de ECG positivo e negativo em matrinxã, *Brycon amazonicus*.

As canulações das cavidades bucal e opercular permitiram obter amostras de água para determinação das tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ), bem como a determinação da frequência respiratória ( $f_R$ ) e das pressões intra-bucal (PIB) e intra-opercular (PIO). A canulação foi obtida pela inserção de cateteres de polietileno (PE 100) na porção mediana superior da cavidade bucal e nas partes distais de ambos os cleitros operculares (PE 60) através de pequenos orifícios obtidos com o auxílio de uma mini-furadeira e uma broca (Fig. 2A). Os cateteres foram fixados com a ajuda de um flange e cola de secagem rápida (Fig. 2B).

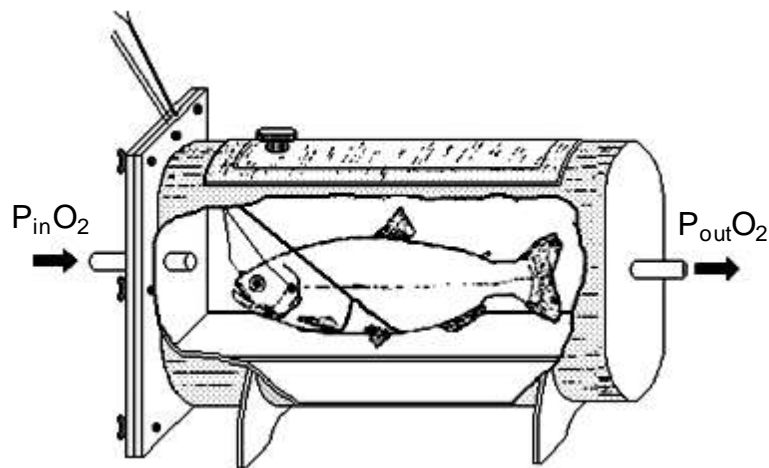
Foram inseridos 2 eletrodos de aço inoxidável: o positivo, posicionado ventralmente entre as brânquias e o coração e o negativo, em posição ventro-caudal próximo às nadadeiras pélvicas, ambos suturados com 2 pontos cirúrgicos à musculatura corpórea e fixados com cola de secagem rápida para evitar seu deslocamento (Fig. 1A e 2B). Um terceiro eletrodo, de referência, foi colocado na água da câmara experimental. Esta preparação permite que sejam obtidos

registros similares àqueles observados na derivação  $D_1$  da eletrocardiografia padrão que foram utilizados para a determinação da frequência cardíaca ( $f_H$ ) e da análise eletrocardiográfica ((duração e amplitude das ondas P e T e complexo QRS, duração do segmento S-T e dos intervalos P-R, R-R, Q-T e J-T). Para *B. amazonicus*, o melhor sinal elétrico do ECG foi obtido posicionando-se o eletrodo positivo aproximadamente a dois centímetros de onde as margens inferiores dos opérculos se unem (Fig. 1B).



**Figura 2** - Em **A**: Esquema mostrando a posição de inserção dos cateteres de polietileno e eletrodos de ECG para as medidas dos parâmetros cardio-respiratórios *in vivo* em matrinxã, *B. amazonicus*. Em **B**: Detalhe de um eletrodo de ECG e do cateter para medidas de PO<sub>2</sub>: **a.** ponta biselada de agulha hipodérmica cujo tamanho varia em função da distância entre a superfície corpórea e o coração do animal; **b.** pedaço de cateter com a extremidade flangeada; **c.** revestimento termo-retrátil; **d.** fixação do fio de cobre no interior da agulha; **e.** fio de cobre encapado; **f.** cateter de polietileno com a extremidade flangeada para a tomada de água; **g.** flange de fixação (adaptado de OLLE, 2007 e MARICONDI-MASSARI, 1993).

Após a preparação anteriormente descrita, os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante (Fig. 3) e imediatamente transferidos para a câmara experimental com capacidade de 50 L, mantida em normóxia (140 mmHg) a 25 °C, onde permaneceram por um período de 12 horas para a recuperação da anestesia e restabelecimento das condições metabólicas de rotina sob tal situação e aqui tidas como “basais”. O fluxo de água através do respirômetro de 2 L foi estabelecido por gravidade e ajustado através de um frasco externo de ajuste de fluxo a uma taxa constante de 30 L.h<sup>-1</sup>, fluxo este capaz de manter a diferença de 10 a 15% entre as tensões de O<sub>2</sub> da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro. De acordo com Sakuragui et al. (2003), esta diferença é capaz de impedir a atividade natatória e/ou aumentar os níveis de hipóxia no interior do respirômetro no decorrer da hipóxia gradual.



**Figura 3** - Esquema do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos *in vivo*. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro.

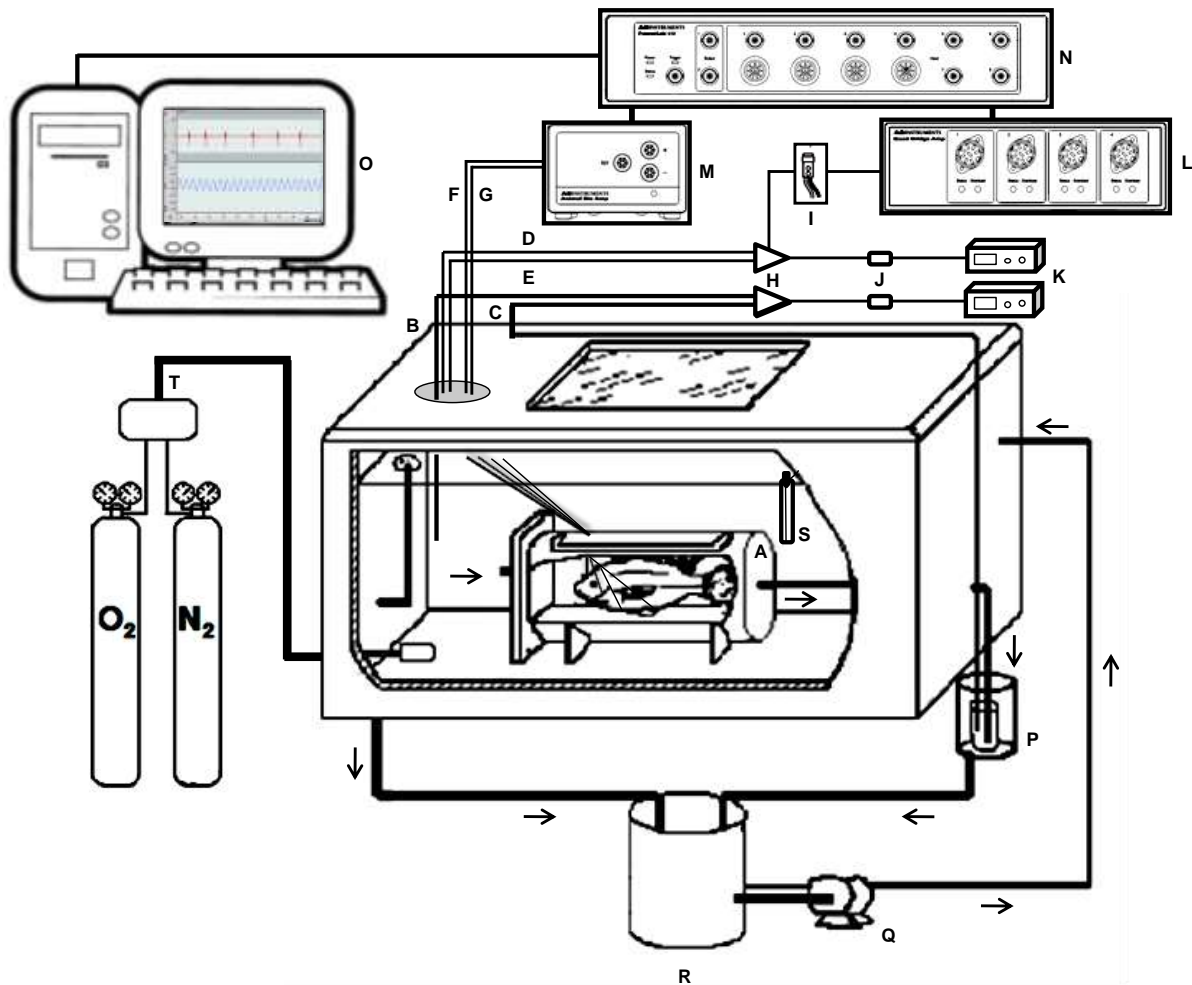
As figuras 1, 2 e 3 mostram o esquema da preparação experimental utilizada para o estudo da  $f_H$  e das respostas ventilatórias em matrinxãs do grupo controle (Ct) e do grupo exposto a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 horas ( $\text{HgCl}_2$ ). Os experimentos foram conduzidos utilizando-se um animal de cada vez. Os registros cardio-respiratórios foram obtidos em normóxia ( $P_w\text{O}_2 \cong 140 \text{ mmHg}$ ) e nas seguintes tensões de  $\text{O}_2$  hipóxicas: 120; 100; 80; 60; 40 e  $20 \text{ mmHg}^1$  obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de  $\text{N}_2$  e ar comprimido no interior da câmara experimental. Cada tensão de  $\text{O}_2$  foi alcançada em cerca de 10 minutos e mantida por um período de 40 minutos antes de serem efetuados os registros. Os procedimentos de tomada de medidas foram efetuados dentro de 5 minutos.

As tensões de  $\text{O}_2$  (mmHg) da água de entrada ( $P_{in}\text{O}_2$ ) e de saída ( $P_{out}\text{O}_2$ ) do respirômetro, bem como as tensões de  $\text{O}_2$  da água inspirada ( $P_i\text{O}_2$ ) e expirada ( $P_e\text{O}_2$ ) pelos peixes foram continuamente monitoradas conectando-se os cateteres de polietileno que coletavam amostras de água de entrada e saída do respirômetro e aqueles implantados na boca e opérculos do peixe a um sistema constituído de torneiras de 3 vias acopladas a eletrodos (FAC-001, FAC, São Carlos, SP) de analisadores de  $\text{O}_2$  (FAC-204A, FAC, São Carlos, SP). A  $f_R$ , a PIB e a PIO foram determinadas conectando-se as cânulas implantadas na boca ou no opérculo do animal a um transdutor de pressão (MLT0380/D, ADInstruments), previamente calibrado com um manômetro digital (AVS Projetos, São Paulo, SP), acoplado a um pré-amplificador (ML 224 Quad Bridge Amp, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado PowerLab (Powerlab 8/30, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). O ECG, por sua vez, foi obtido acoplando-se os

<sup>1</sup> Para converter mmHg em kPa, multiplicar por 0,133322

Utilizando-se o nomograma de Mortimer, que leva em consideração a altitude local e a temperatura dos experimentos, tensões de 140, 120, 100, 80, 60, 40, 20 e  $10 \text{ mmHg}$  equivalem, respectivamente, a 7,35; 6,30; 5,25; 4,20; 3,15; 2,10; 1,05 e  $0,52 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$ .

eletrodos de ECG implantados no animal a um pré-amplificador (ML 136 Animal Bio Amp, ADInstruments) conectado ao mesmo sistema de aquisição e de análise de dados PowerLab. Dessa forma, foram registrados simultaneamente, em cada uma das  $P_wO_2$  testadas, o ECG e a  $f_R$  e a PIB ou o ECG e a PIO (Fig. 4).



**Figura 4** - Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias de *Brycon amazonicus*. **A**: respirômetro; **B**, **C**: cateteres de polietileno para tomada da água que entra ( $P_{in}O_2$ ) e que sai ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, respectivamente; **D**, **E**: cateteres de polietileno para tomada da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ), respectivamente; **F**, **G**: eletrodos cardíacos positivo e negativo; **H**: torneiras de 3 vias; **I**: transdutor de pressão MLT0380/D; **J**: cuvetas termostatzadas com eletrodos de  $O_2$  FAC-001; **K**: analisadores de  $O_2$  FAC-204A; **L**: amplificador de pressão ML224; **M**: amplificador de ECG ML136; **N**: sistema de aquisição de dados Powerlab 8/30; **O**: computador para o registro de dados; **P**: frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; **Q**: bomba para circulação de água; **R**: balde para circulação de água; **S**: termostato para manutenção da temperatura; **T**: entrada de quantidades controladas de  $N_2$  ou ar comprimido. As setas indicam a direção do fluxo de água no sistema. (adaptado de MARICONDI-MASSARI, 1993).

## 2.4 Variáveis Ventilatórias

O consumo de O<sub>2</sub> total, também denominado de taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ), em cada uma das tensões de O<sub>2</sub> experimentais, foi determinado utilizando-se o sistema de respirometria de fluxo constante, pelo monitoramento das tensões de O<sub>2</sub> da água de entrada e de saída do respirômetro. A  $\dot{V}O_2$  (mLO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi calculada por meio da equação proposta por Hughes et al. (1983):

$$\dot{V}O_2 = \frac{(P_{in}O_2 - P_{out}O_2) \cdot \alpha_{O_2} \cdot V_R}{W_T}, \text{ onde:}$$

$P_{in}O_2$  = tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro (mmHg);

$P_{out}O_2$  = tensão de O<sub>2</sub> da água de saída do respirômetro (mmHg);

$\alpha_{O_2}$  = coeficiente de solubilidade do O<sub>2</sub> na água (mLO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.mmHg<sup>-1</sup>);

$V_R$  = fluxo de água através do respirômetro (L.h<sup>-1</sup>);

$W_T$  = peso fresco do animal (kg).

A tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ) foi determinada graficamente pelo método de Yeager and Ultsch (1989) conforme descrito por Rantin et al. (1992). Uma reta foi ajustada com a abscissa,  $P_{in}O_2$  versus  $\dot{V}O_2$ , obtida a partir da expressão  $Y = a + bX$ , onde a e b são calculados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A outra reta, paralela à abscissa, foi plotada pela média dos valores da  $\dot{V}O_2$  que não apresentaram diferença significativa em relação aos valores normóxicos. A interseção dessas retas ajustadas determinou o ponto que, projetado sobre o eixo x, fornece a  $P_cO_2$  da espécie. Este ponto é definido como sendo a tensão parcial de O<sub>2</sub> abaixo da qual a espécie perde sua capacidade de manter uma  $\dot{V}O_2$  constante, independente da disponibilidade de O<sub>2</sub> do ambiente.

Para a determinação da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) foi empregado o método descrito por Saunders (1962) e adaptado por Fernandes & Rantin (1989). Tal método é baseado no princípio de Fick envolvendo respirometria de fluxo constante e utiliza as medidas das tensões de O<sub>2</sub> da água de entrada e de saída do respirômetro, bem como da água inspirada e expirada pelos peixes em cada uma das tensões de O<sub>2</sub> experimentais. A  $\dot{V}_G$  (mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) foi calculada utilizando-se a equação de Hughes & Saunders (1970):

$$\dot{V}_G = \frac{(P_{in}O_2 - P_{out}O_2 / P_iO_2 - P_eO_2) \cdot V_R}{W_T}, \text{ onde:}$$

$P_{in}O_2$  = tensão de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro (mmHg);

$P_{out}O_2$  = tensão de  $O_2$  da água de saída do respirômetro (mmHg);

$P_iO_2$  = tensão de  $O_2$  da água inspirada pelo animal (mmHg);

$P_eO_2$  = tensão de  $O_2$  da água expirada pelo animal (mmHg);

$V_R$  = fluxo de água através do respirômetro ( $ml \cdot min^{-1}$ ),

$W_T$  = peso fresco do animal (kg).

A frequência respiratória ( $f_R$ ) e a pressão intra-bucal (PIB) foram mensuradas conectando-se o cateter bucal ao transdutor de pressão (MLT0380/D, ADInstruments) previamente calibrado. A  $f_R$ , em cada uma das tensões de  $O_2$  experimental, foi expressa em ciclos respiratórios. $min^{-1}$  e a PIB em mmHg. Acoplando-se o cateter opercular ao mesmo transdutor de pressão obteve-se o registro da pressão intra-operculares (PIO), também expressa em mmHg. Os registros de  $f_R$ , PIB e PIO foram feitos nos 10 min finais do período de 40 min no qual os peixes permaneceram em que cada uma das tensões de  $O_2$  testadas.

O volume corrente, ou volume ventilatório ( $V_T$ ) em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e a respectiva frequência respiratória ( $f_R$ ). O  $V_T$  foi expresso em  $mLH_2O \cdot kg^{-1} \cdot ciclo \text{ respiratório}^{-1}$ .

A necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), também denominada de requerimento branquial de convecção de água, em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais, foi calculada pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  -  $mLH_2O \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ ) e o respectivo valor de tomada de  $O_2$  normalizado pela mesma unidade de tempo ( $\dot{V}O_2$  -  $mLO_2 \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ ). Os valores finais de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  foram expressos em  $mLH_2O \cdot mLO_2^{-1}$ .

A extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) pelas brânquias, em normóxia e durante hipóxia gradual, foi calculada a partir da equação proposta por Hughes et al. (1983) e expressa em porcentagem (%).

$$EO_2 = \frac{P_iO_2 - P_eO_2}{P_iO_2} \cdot 100, \text{ onde:}$$

$P_iO_2$  = tensão de  $O_2$  da água inspirada pelo animal (mmHg);

$P_eO_2$  = tensão de  $O_2$  da água expirada pelo animal (mmHg).

## 2.5 Variáveis Cardíacas

Após o período de recuperação, a  $f_H$  foi registrada em normóxia e nas subseqüentes tensões de  $O_2$  hipóxicas. A  $f_H$  foi expressa em batimentos cardíacos por minuto (bpm). O registro do ECG foi realizado nos 10 minutos finais do período de 40 minutos no qual os peixes permaneceram em que cada uma das tensões de  $O_2$  testadas. Avaliou-se também a duração (ms) e amplitude (%) da onda P, do complexo QRS e da onda T e a duração dos intervalos R-R, P-R, Q-T, J-T e do segmento S-T.

Todas essas análises foram feitas pelo sistema de aquisição e análise de dados PowerLab (ADInstruments, Austrália). A seguir encontram-se descritas as análises eletrocardiográficas realizadas no presente estudo de acordo com Khan (2008) e Abedin & Conner (2008).

### - Duração da onda P:

É a medida entre o início da onda P e o final desta e corresponde a despolarização atrial (Fig. 5).

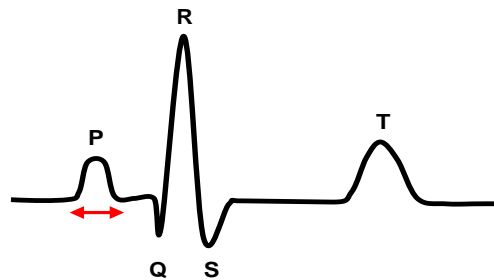


Figura 5: Esquema da duração da onda P

### - Duração do complexo QRS:

É medido desde o início da onda Q até o final da onda S e corresponde a despolarização ventricular (Fig. 6).

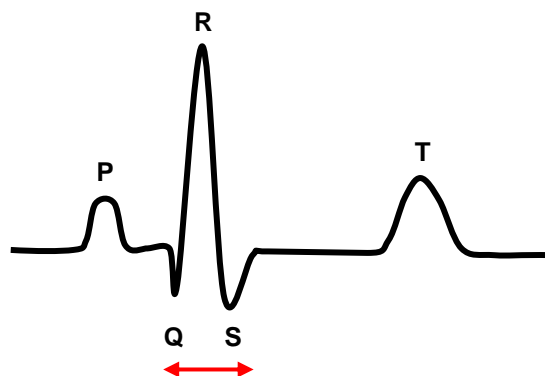
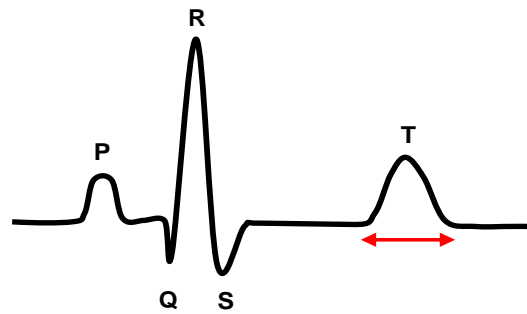


Figura 6: Esquema da duração do complexo QRS

**- Duração da onda T:**

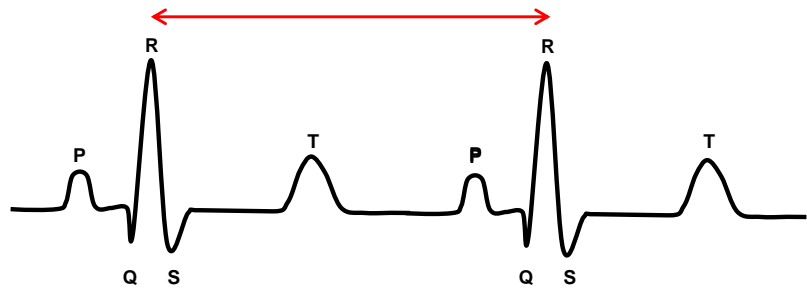
É a medida entre o início da onda T e o final desta e representa a repolarização ventricular (Fig. 7).



**Figura 7:** Esquema da duração da onda T

**- Duração do intervalo R-R:**

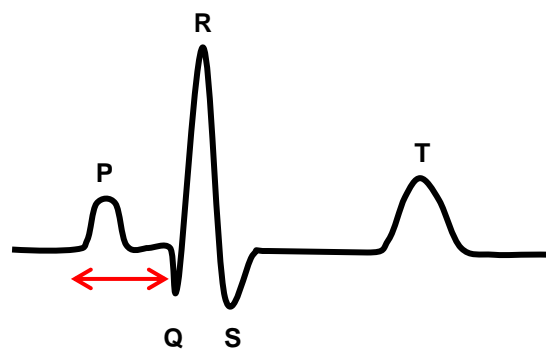
Também denominado ritmo cardíaco. É a distância entre duas ondas R consecutivas e corresponde ao intervalo entre duas despolarizações ventriculares (Fig. 8).



**Figura 8:** Esquema da duração do intervalo R-R

**- Duração do intervalo P-R:**

Mede o tempo de condução átrio-ventricular. É medido desde o início da onda P até ao início do complexo QRS, ou seja, do início da despolarização atrial até o início da despolarização ventricular (Fig. 9). Também denominado duração do potencial de ação atrial -  $A_{APD}$  (AGUIAR et al., 2002).



**Figura 9:** Esquema da duração do intervalo P-R



### - Duração do intervalo Q-T:

É o intervalo de tempo medido entre o início do complexo QRS ao final da onda T (Fig. 10). Corresponde a sístole elétrica total ventricular, ou seja, o tempo necessário para que ocorra a despolarização e repolarização do ventrículo (FELDMAN & GOLDWASSER, 2004). Também denominado duração do potencial de ação ventricular -  $V_{APD}$  (AGUIAR et al., 2002). O  $QT_c$  é a dispersão do intervalo Q-T, obtido pela fórmula de Bazett:

$$QT_c = \frac{Q-T}{\sqrt{R-R}}$$

### - Duração do intervalo J-T:

O ponto J é o ponto exato no qual a onda de despolarização completa sua passagem pelo coração, o que ocorre no fim do complexo QRS (Fig. 11). Exatamente nesse ponto todo o ventrículo está despolarizado (GUYTON & HALL, 2002). O intervalo J-T é medido do ponto J até o fim da onda T e corresponde a repolarização ventricular (Fig. 11).

### - Duração do segmento S-T:

É o intervalo de tempo entre o fim do complexo QRS e o início da onda da onda T. Corresponde a fase inicial da repolarização ventricular (Fig. 12) e representa a fase de platô do potencial de ação (P.A.) ventricular (FELDMAN & GOLDWASSER, 2004).

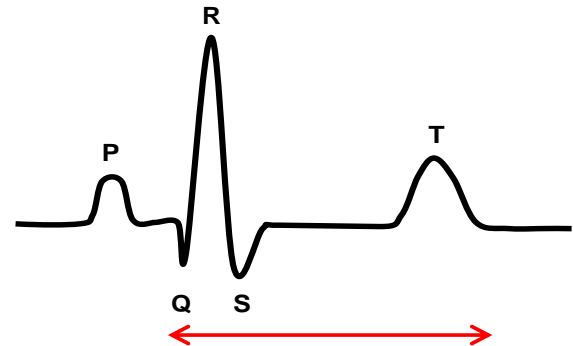


Figura 10: Esquema da duração do intervalo Q-T

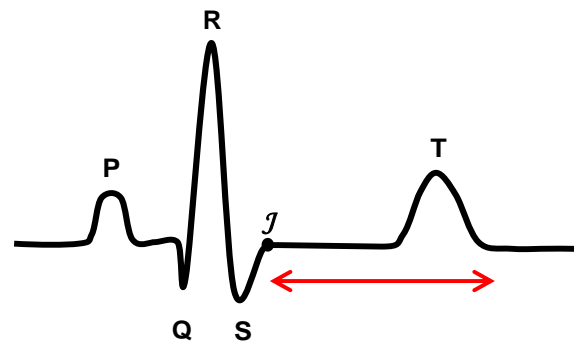


Figura 11: Esquema da duração do intervalo J-T.

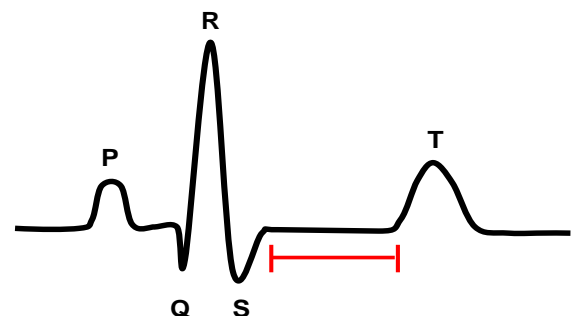
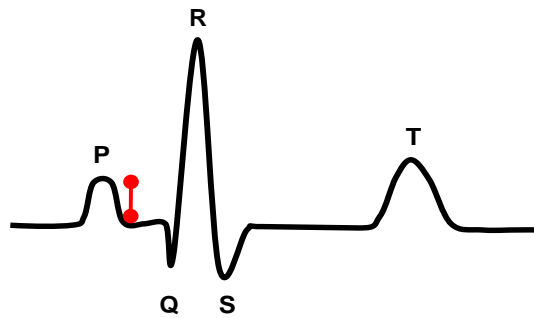


Figura 12: Esquema da duração do segmento S-T

**- Amplitude da onda P:**

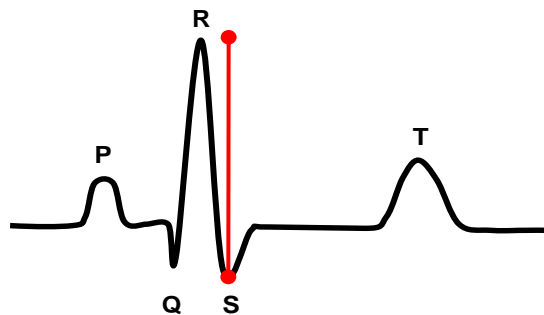
Corresponde a voltagem da onda P (Fig. 13). As ondas P bifásicas foram analisadas apenas em suas deflexões positivas



**Figura 13:** Esquema da amplitude do complexo QRS

**- Amplitude do complexo QRS:**

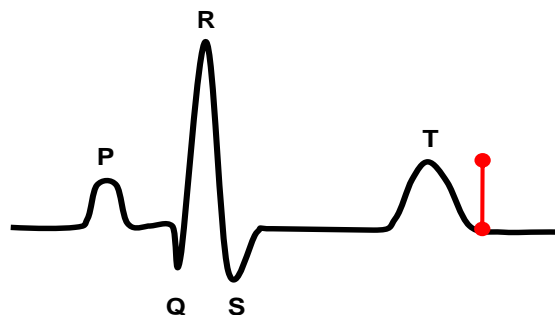
Corresponde a voltagem do complexo QRS, desde o pico da onda R ao pico da onda S (Fig. 14).



**Figura 14:** Esquema da amplitude do complexo QRS

**- Amplitude da onda T:**

Corresponde a voltagem no pico da onda T (Fig. 15). As ondas T bifásicas foram analisadas em suas deflexões positivas.



**Figura 15:** Esquema da amplitude da onda T

## 2.5 Tratamento Estatístico dos Dados

Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. Os seguintes procedimentos foram adotados no presente estudo:

- Teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade foi realizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes de diferentes grupos experimentais (Ct e HgCl<sub>2</sub>) (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- A Análise de variância (ANOVA) one-way, complementada pelo teste de Dunnett de comparações múltiplas, para a identificação das diferenças significativas entre os valores obtidos em normóxia (140 mmHg) e os demais valores obtidos nas diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água (120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg) no decorrer da hipóxia gradual (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- Análise de variância Fatorial ou ANOVA two-way, com interação envolvendo dois critérios de classificação: oito níveis de O<sub>2</sub> na água (140, 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg) e presença ou ausência de HgCl<sub>2</sub> na água (grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>), ou seja, análise fatorial 7 x 2. A análise estatística two-way verificou se as médias dos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da presença de HgCl<sub>2</sub> na água, e as médias dos grupos experimentais (Ct e HgCl<sub>2</sub>), independentemente do nível de O<sub>2</sub> na água, foram ou não significativamente diferentes. Esta análise também estabeleceu se a resposta a hipóxia gradual depende da presença da exposição ao HgCl<sub>2</sub>, uma vez que estes fatores podem ou não estar interagindo. A ANOVA two-way foi complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para a identificação das diferenças específicas, verificando a existência de possíveis interações significativas entre os valores de um mesmo nível de O<sub>2</sub> na água com os diferentes grupos experimentais ou entre diferentes níveis de O<sub>2</sub> dentro de um mesmo grupo experimental (SigmaStat v. 2.00, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

### 3 RESULTADOS

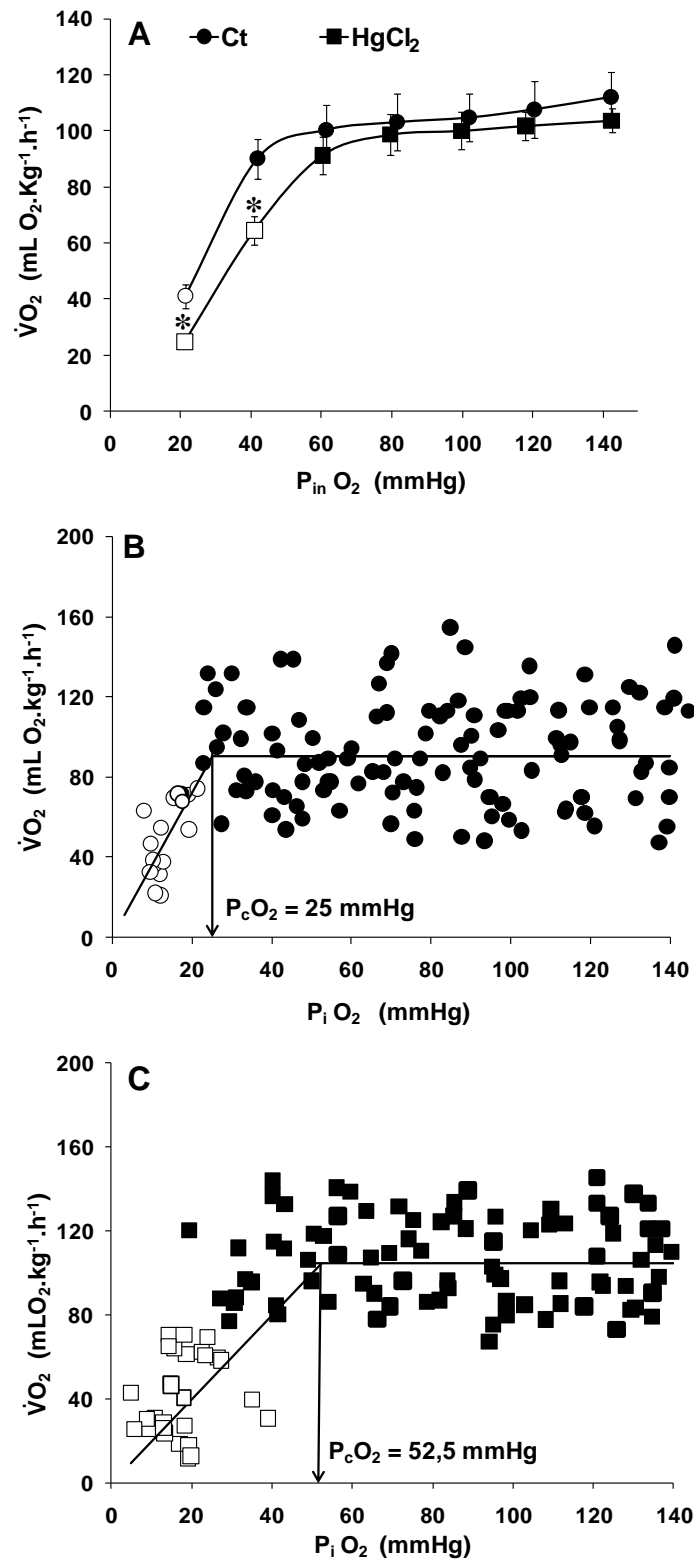
#### 3.1 Respostas Respiratórias

##### 3.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ )

A figura 16A mostra os valores médios da  $\dot{V}O_2$  dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> frente às diferentes tensões de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ). A  $\dot{V}O_2$  de *B. amazonicus* do grupo Ct manteve-se constante até a tensão de O<sub>2</sub> de 40 mmHg, com valor médio de  $103,1 \pm 3,1$  mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Somente na menor tensão de O<sub>2</sub> utilizada (20 mmHg) observou-se uma redução significativa na  $\dot{V}O_2$ , que atingiu o valor mínimo de  $41,1 \pm 4,3$  mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, equivalendo a uma redução de aproximadamente 60%. No grupo HgCl<sub>2</sub>, os valores de  $\dot{V}O_2$  não apresentaram diferença significativa até a tensão de O<sub>2</sub> de 60 mmHg, quando comparados ao valor médio observado em normóxia de  $94,4 \pm 4,8$  mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. A partir da tensão de 40 mmHg ( $64,5 \pm 4,9$  mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), os valores de  $\dot{V}O_2$  apresentaram uma redução significativa atingindo, na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg, o valor mínimo de  $24,7 \pm 2,3$  mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, o que representa uma redução de aproximadamente 76% em relação a média da  $\dot{V}O_2$  em normóxia (140 mmHg).

Quando comparados ambos os grupos experimentais, somente nas tensões de 40 e 20 mmHg, os valores de  $\dot{V}O_2$  do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram-se significativamente inferiores (28 e 40%, respectivamente) em relação ao grupo Ct. A análise de variância two-way dos parâmetros respiratórios (Tab. 2) indicou que houve não houve interação significativa entre os fatores HgCl<sub>2</sub> e hipóxia para este parâmetro, existindo apenas o efeito de cada um dos fatores separadamente em reduzir a  $\dot{V}O_2$ .

A  $P_cO_2$  determina a tensão de O<sub>2</sub> abaixo da qual o peixe não consegue mais acionar eficientemente seus mecanismos de compensação à hipóxia e, assim, manter seu consumo de O<sub>2</sub> constante. Para tanto, a  $P_cO_2$  foi calculada utilizando a tensão de O<sub>2</sub> da água inspirada pelo animal ( $P_{insp}O_2$ ). Para *B. amazonicus*, a  $P_cO_2$  calculada para o grupo controle foi de 25 mmHg (Fig. 16B) e para o grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> foi de 52,5 mmHg (Fig. 16C), caracterizando um aumento de aproximadamente 162%. A análise desses resultados evidenciou que, tanto no grupo controle quanto no exposto ao HgCl<sub>2</sub>, a  $\dot{V}O_2$  manteve-se constante até as respectivas  $P_cO_2$ , diminuindo significativamente abaixo destas.



**Figura 16 - (A)** Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$  - mL O<sub>2</sub>·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg·L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. **(B e C)** Efeito da redução das tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) sobre a  $\dot{V}O_2$  dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, respectivamente. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05). As setas representam a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>

### 3.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ )

Os valores médios da  $\dot{V}_G$ , da  $f_R$  e do  $V_T$  dos peixes do grupo controle Ct e HgCl<sub>2</sub>, em normóxia e quando submetidos à diminuição gradual da tensão de O<sub>2</sub> da água, estão apresentados na figura 17.

No grupo controle, a  $\dot{V}_G$  obtida em normóxia ( $746,4 \pm 78,9$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) manteve-se constante até a tensão de O<sub>2</sub> de 100 mmHg, abaixo da qual, os valores de  $\dot{V}_G$  foram significativamente maiores, sendo o valor máximo alcançado em 20 mmHg ( $7430,9 \pm 596,1$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), correspondendo a um aumento de aproximadamente 10 vezes neste parâmetro (Fig. 17A).

No grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> a diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água provocou um aumento da  $\dot{V}_G$  também a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 80 mmHg, até o valor máximo de  $3357,4 \pm 309,6$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> testada (20 mmHg), valor esse 4,5 vezes maior que o obtido em normóxia ( $746,7 \pm 88,3$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (Fig. 17A).

Quando comparados ao controle, os peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram valores de  $\dot{V}_G$  significativamente inferiores nas tensões de 40 e 20 mmHg, de aproximadamente 36% e 55%, respectivamente (Fig. 17A).

A análise de variância two-way dos parâmetros respiratórios, apresentada na tabela 2, indicou que houve interação significativa entre a exposição ao HgCl<sub>2</sub> e a hipóxia, ou seja, as alterações na  $\dot{V}_G$  frente à hipóxia dependem da presença do HgCl<sub>2</sub> na água. Adicionalmente, o fator hipóxia aumentou significativamente a  $\dot{V}_G$  a partir da tensão de 80 mmHg, independentemente da presença do HgCl<sub>2</sub> na água. Já a exposição HgCl<sub>2</sub> diminuiu significativamente a  $\dot{V}_G$ , independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> da água.

A  $f_R$  obtida em normóxia foi de  $85,0 \pm 2,5$  e  $96,0 \pm 3,4$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>, para os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, respectivamente. Esses valores se mantiveram constantes até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 100 mmHg, abaixo da qual aumentaram significativamente, atingindo valores máximos a 20 mmHg no grupo Ct ( $136 \pm 2,1$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e a 60 mmHg no grupo HgCl<sub>2</sub> ( $126 \pm 3,1$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>), correspondendo a elevações de 60 e 31%, respectivamente. Abaixo de 60 mmHg, a  $f_R$  dos peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub> sofreu redução progressiva de seus valores sendo que na menor tensão de O<sub>2</sub> testada (20 mmHg) o valor da  $f_R$  ( $105 \pm 3,5$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) não diferiu daquele obtido em normóxia (Fig. 17B).

Comparando-se os dados obtidos em ambos os grupos experimentais, observou-se que os valores de  $f_R$  apresentados pelos peixes do grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  foram significativamente superiores (~14%) aos apresentados pelo grupo controle nas tensões de  $\text{O}_2$  de 140 a 60 mmHg. Por outro lado, nas tensões de  $\text{O}_2$  de 40 e 20 mmHg, os valores de  $f_R$  do grupo  $\text{HgCl}_2$  apresentaram-se foram significativamente menores (12 e 23%, respectivamente) que aqueles observados para o grupo Ct.

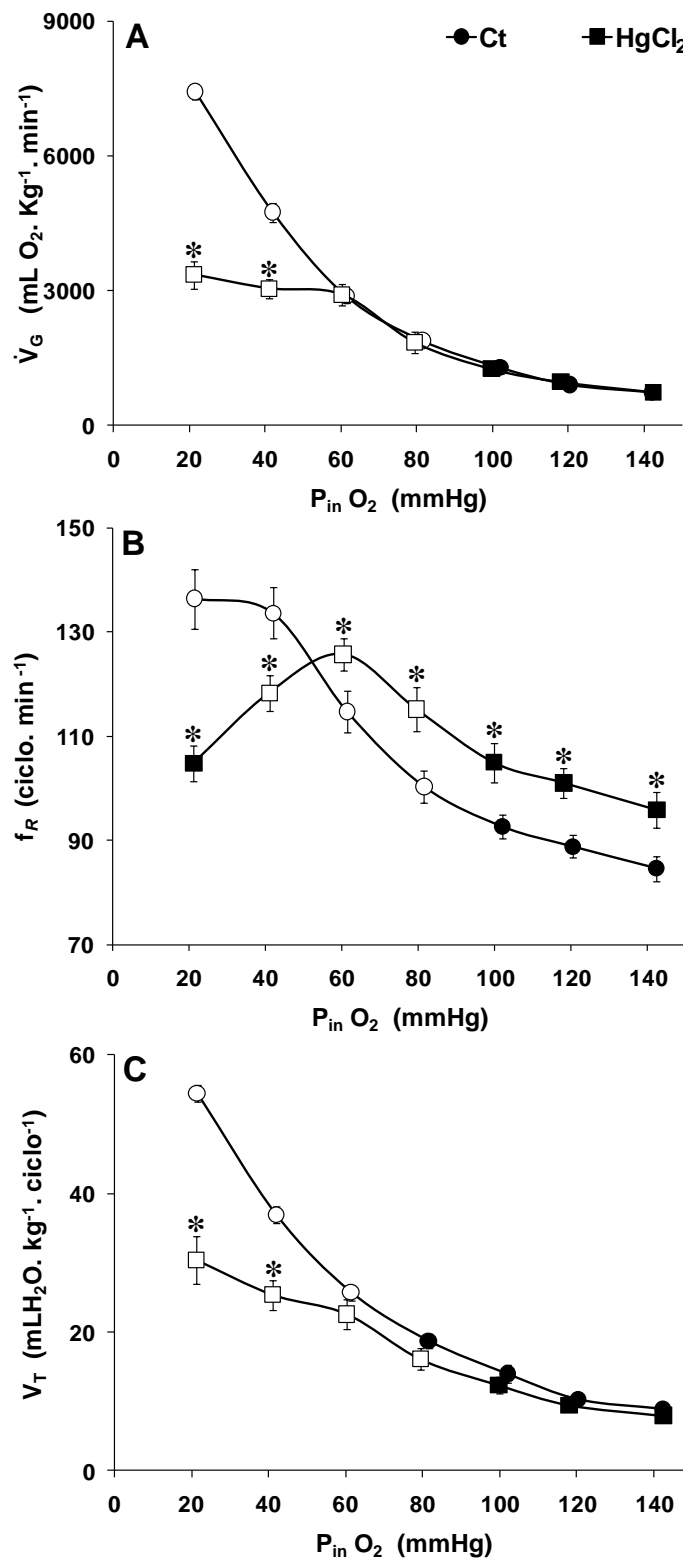
A análise de variância two-way indicou que houve interação entre a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  e à hipóxia para este parâmetro (Tab. 2). O fator hipóxia aumentou significativamente a  $f_R$  a partir da tensão de 80 mmHg, independentemente da exposição ao  $\text{HgCl}_2$ . Já a presença do  $\text{HgCl}_2$ , independentemente dos níveis de  $\text{O}_2$  da água, não alterou a  $f_R$ .

Nos peixes do grupo controle, o valor do  $V_T$  em normóxia foi de  $8,9 \pm 0,8 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$ . Abaixo 80 mmHg, houve aumento significativo neste parâmetro sendo o maior valor observado na tensão de 20 mmHg ( $54,4 \pm 7,5 \text{ mL H}_2\text{O.kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$ ), valor este 6 vezes maior do que aquele obtido em normóxia (Fig. 17C).

A redução gradual da  $P_{\text{inO}_2}$  provocou um aumento significativo do  $V_T$  do grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  a partir de 80 mmHg. O valor do  $V_T$  observado em normóxia foi de  $7,9 \pm 0,8 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$ . Na menor  $P_{\text{inO}_2}$  utilizada (20 mmHg), o  $V_T$  atingiu o valor máximo de  $30,4 \pm 3,8 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$ , valor este 3,8 vezes maior do que o obtido em normóxia (Fig. 17C).

Nas tensões de  $\text{O}_2$  de 140 a 60 mmHg não foram observadas diferenças significativas nos valores do  $V_T$  entre os grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ . Entretanto nas tensões de 40 e 20 mmHg, os valores do  $V_T$  obtidos para o grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  foram significativamente menores do que aqueles observados para o grupo Ct, correspondendo a reduções de 31 e 44%, respectivamente (Fig. 17C).

A análise de variância two-way indicou que houve interação significativa entre a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  e à hipóxia, ou seja, o comportamento do  $V_T$  em resposta à hipóxia depende da presença de  $\text{HgCl}_2$  na água (Tab. 2). Adicionalmente, o fator hipóxia aumentou significativamente o  $V_T$  a partir da tensão de 80 mmHg, independentemente da exposição ao  $\text{HgCl}_2$ . Já a presença do  $\text{HgCl}_2$  na água, independentemente dos níveis de  $\text{O}_2$ , reduziu significativamente os valores do  $V_T$ .



**Figura 17 - (A)** Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), **(B)** freqüência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e **(C)** volume ventilatório ( $V_T$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

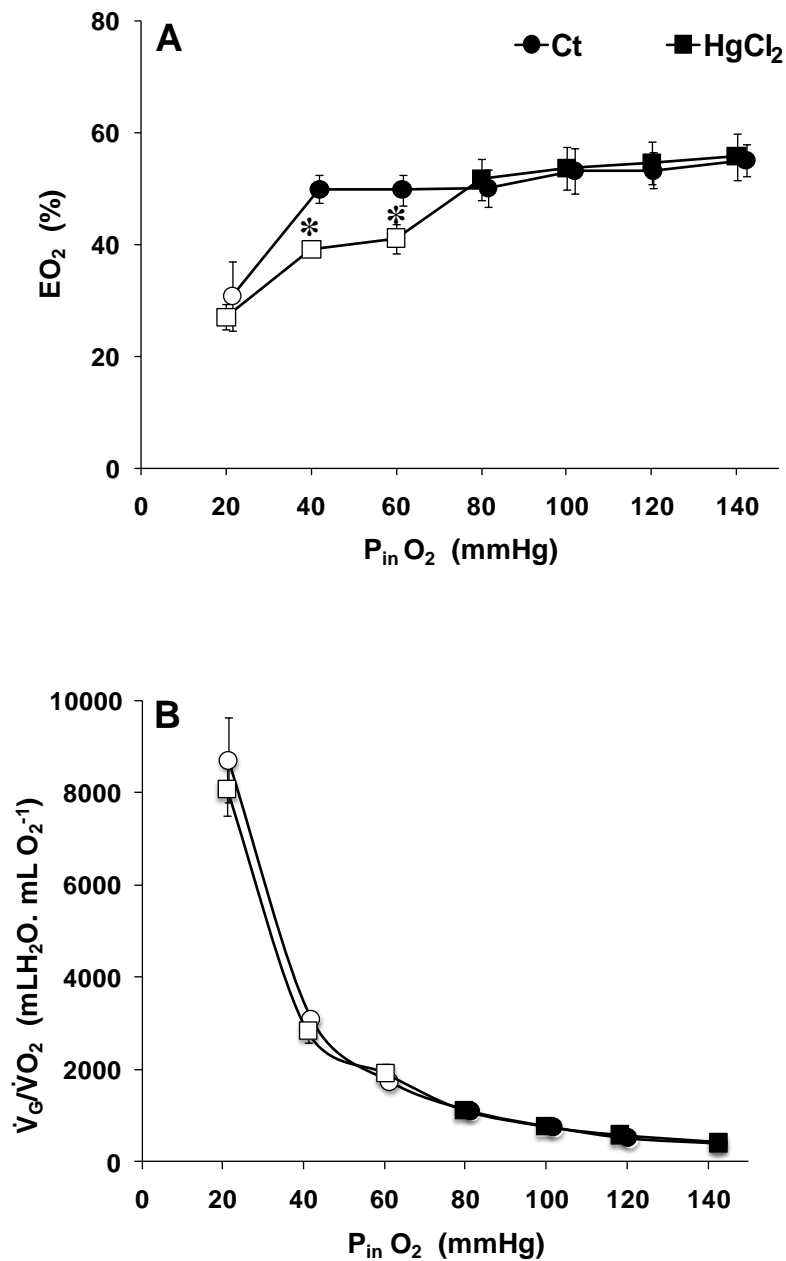


### 3.1.3 Extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ )

Os valores médios de EO<sub>2</sub> e de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, em normóxia e frente a hipóxia gradual, estão apresentados figura 18.

Conforme observado na figura 18A, nos peixes do grupo Ct a EO<sub>2</sub> manteve-se aproximadamente constante, em torno de 55%, desde a normóxia (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> = 140 mmHg) até a tensão de O<sub>2</sub> de 40 mmHg. Na tensão de 20 mmHg observou-se uma redução significativa na EO<sub>2</sub>, que atingiu o valor mínimo de 40,3 ± 4,6 %, correspondendo a uma redução de aproximadamente 30%. Nos peixes do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, a EO<sub>2</sub> obtida em normóxia (55,8 ± 4,1 %) manteve-se constante até a tensão de 80 mmHg, abaixo da qual e próximo a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> (52,5 mmHg), os valores da EO<sub>2</sub> obtidos foram significativamente menores do que aqueles observados em normóxia. No grupo HgCl<sub>2</sub>, os menores valores de EO<sub>2</sub> foram observados na tensão de 20 mmHg (27,0 ± 2,3 %), correspondendo a uma redução de aproximadamente 52%. Quando comparados ambos os grupos experimentais, os valores de EO<sub>2</sub> do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram-se significativamente inferiores (de 27 a 48%) apenas nas tensões de 60 e 40 mmHg. A análise two-way (Tab. 2) indicou que não houve interação significativa entre os fatores hipóxia e HgCl<sub>2</sub> para a EO<sub>2</sub>. O fator hipóxia reduziu a EO<sub>2</sub> partir da tensão de 80 mmHg, independentemente da presença do HgCl<sub>2</sub> na água. A exposição ao HgCl<sub>2</sub> também reduziu significativamente a EO<sub>2</sub> independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> da água.

No grupo controle, a  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  em normoxia foi de 399,5 ± 19,2 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>. Abaixo da tensão de 80 mmHg, os valores da necessidade ventilatória apresentaram um aumento significativo, atingindo o valor máximo na tensão de 20 mmHg (8715,5 ± 451,6 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>), o que corresponde a um aumento de aproximadamente 22 vezes ao valor da  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  obtido em normóxia (Fig. 18B). No grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, aumentos significativos da  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  em relação aos valores obtidos em normóxia (423,4 ± 44,4 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) também foram observados em P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> abaixo de 80 mmHg. O maior valor de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  foi obtido na tensão de 20 mmHg (8089,6 ± 593,9 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>), um aumento de 19 vezes daquele observado em normóxia (Fig. 18B). Quando comparados os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, não foram observadas diferenças significativas nos valores da  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  em nenhuma das tensões de O<sub>2</sub> analisadas. A análise two-way indicou que não houve interação entre os fatores hipóxia e HgCl<sub>2</sub> para esse parâmetro, sendo verificado apenas um efeito da hipóxia, independentemente da presença de HgCl<sub>2</sub> na água, em aumentar a  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  a partir de 60 mmHg (Tab. 2).



**Figura 18 - (A)** Extração de oxigênio (EO<sub>2</sub> - %) e **(B)** necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  - mLH<sub>2</sub>O.mL O<sub>2</sub><sup>-1</sup>) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

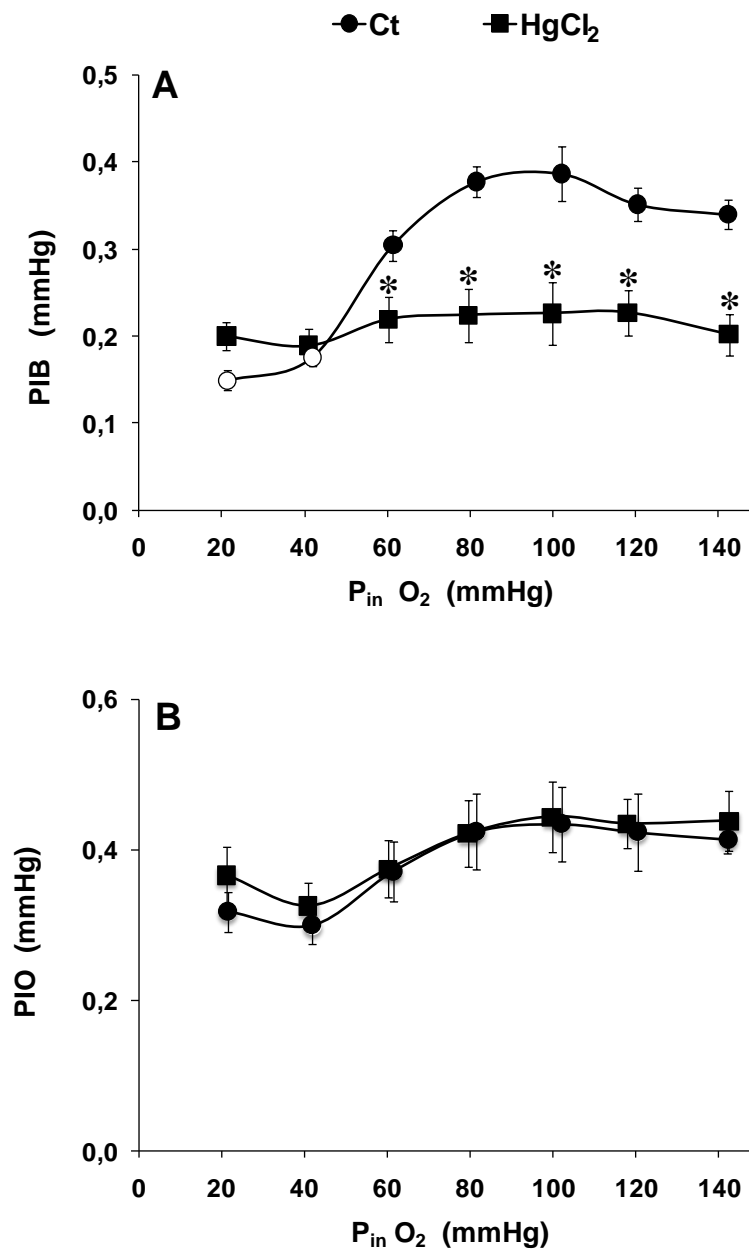
### 3.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO)

A figura 19 ilustra a PIB e PIO dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> em função da diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>).

Houve uma redução significativa da PIB do grupo Ct a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg, partindo do valor de 0,34 ± 0,04 mmHg, observado em normóxia, até o valor mínimo de 0,15 ± 0,01 mmHg, observado na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada no experimento (20 mmHg). A PIB do grupo HgCl<sub>2</sub> não sofreu alterações significativas ao longa da hipóxia gradual. Entretanto, os valores da PIB dos peixes expostos ao HgCl<sub>2</sub> foram significativamente inferiores (em média 40 %) do aqueles observados para os controles entre as tensões de O<sub>2</sub> de 140 a 60 mmHg (Fig. 19A).

A redução da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> não provocou alterações significativas nos valores da PIO dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> (Fig. 19B). Também não foram observadas diferenças significativas nesse parâmetro quando comparados os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>.

A análise de variância two-way indicou que a interação entre a exposição ao HgCl<sub>2</sub> e à hipóxia foi significativa apenas para a PIB mas não para PIO (Tab. 2). Essa análise também revelou que o fator hipóxia, independentemente da presença do HgCl<sub>2</sub> na água, diminuiu significativamente a PIB a partir da tensão de 40 mmHg sem causar alterações significativas nos valores da PIO. Já a exposição ao HgCl<sub>2</sub>, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> da água, também reduziu significativamente a PIB sem alterar a PIO (Tab. 2).

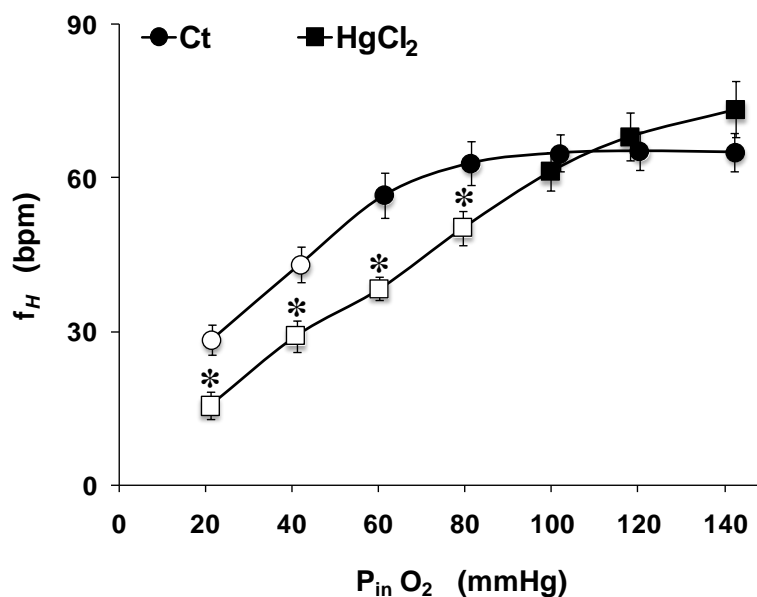


**Figura 19 - (A)** Pressão intra-bucal (PIB - mmHg) e **(B)** pressão intra-opercular (PIO - mmHg) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.2 Caracterização Eletrocardiográfica

#### 3.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ )

Os valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) *in vivo* de *B. amazonicus* dos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, nas diferentes tensões de O<sub>2</sub> estão apresentados na figura 20. A  $f_H$  do grupo controle manteve-se constante entre as tensões de O<sub>2</sub> de 140 e 60 mmHg, com valores entre 57 a 65 bpm. Nas P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 e 20 mmHg ocorreu uma bradicardia significativa e a  $f_H$  atingiu o valor mínimo de 28,0 ± 2,9 bpm, correspondente a uma redução de aproximadamente 57 % em relação ao valor observado em normóxia (65, 0 ± 3,7 bpm). No grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, a  $f_H$  manteve-se constante somente até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 100 mmHg (de 61 a 73 bpm), abaixo da qual sofreu reduções significativas atingindo o valor mínimo de 16,0 ± 2,6 bpm em 20 mmHg, correspondendo a uma redução de ~78 % em relação ao valor observado em normóxia (73,0 ± 5,5 bpm). Os valores de  $f_H$  do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> foram significativamente inferiores (em média 32%) em relação aos registrados para o grupo controle nas tensões de 80 a 20 mmHg. A análise two-way indicou que houve interação significativa entre os fatores hipóxia e HgCl<sub>2</sub> para  $f_H$ . Além disso, foi verificado um efeito da hipóxia, independentemente da presença de HgCl<sub>2</sub> na água, em diminuir a  $f_H$  a partir de 80 mmHg e um efeito apenas do fator HgCl<sub>2</sub> também em reduzir tal parâmetro, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água (Tab 2).



**Figura 20** - Frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

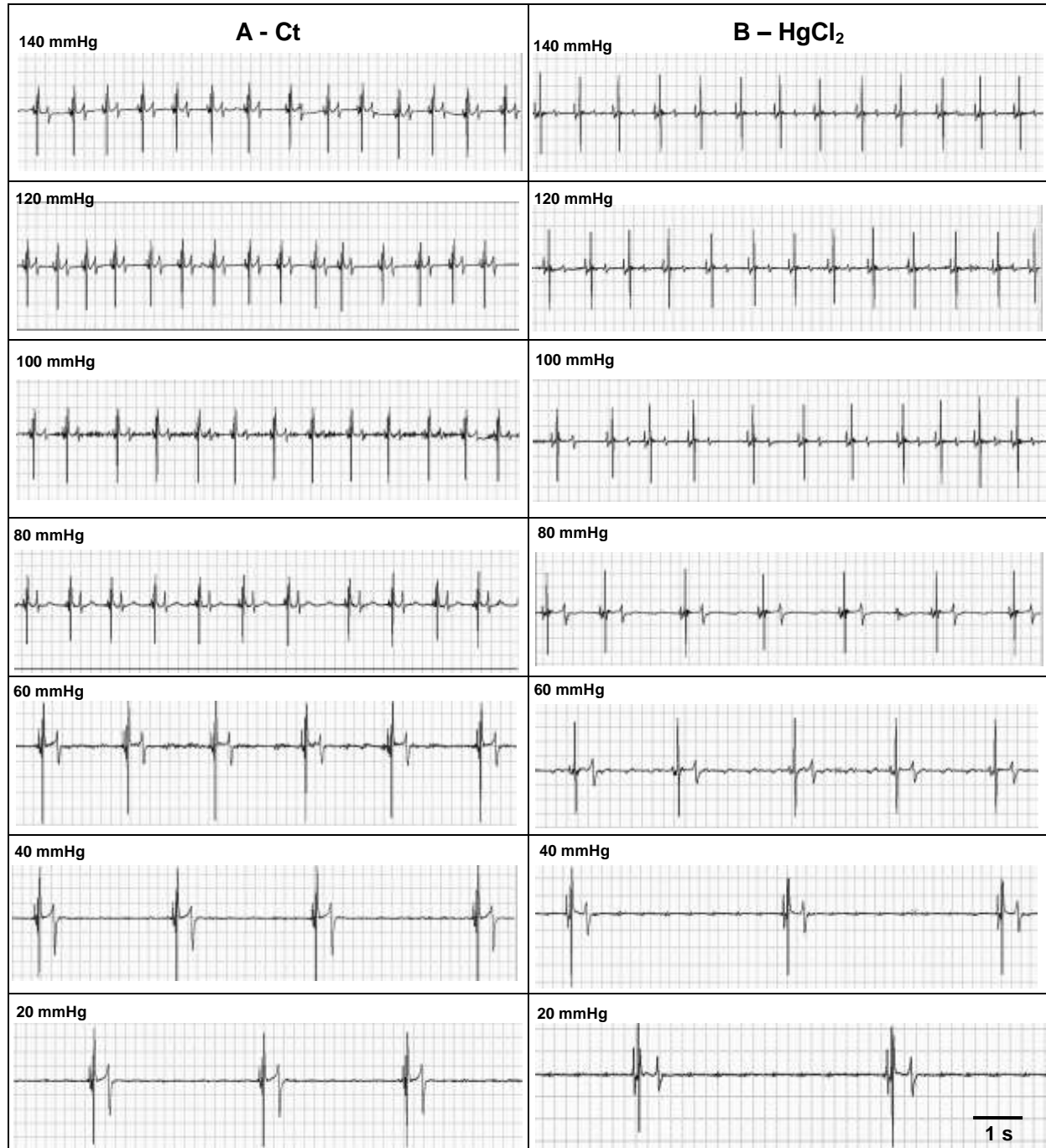
### 3.2.2 Análises eletrocardiográficas

A figura 21 mostra o registro eletrocardiográfico de um exemplar *B. amazonicus* do grupo controle (Fig. 21A) e de um exemplar do grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  (Fig. 21B), caracterizando a morfologia das ondas do ECG em normóxia. Os principais efeitos do Hg incluem: aumentos na duração da onda P e do intervalo P-R e redução na duração da onda T. A figura 22 mostra o traçado básico do ECG obtidos para *B. amazonicus* dos grupos controle (Fig. 22A) e exposto ao  $\text{HgCl}_2$  (Fig. 22B) nas diferentes tensões de  $\text{O}_2$  testadas. Como principais alterações promovidas pela hipóxia gradual, em ambos grupos experimentais, destacam-se: aumentos no intervalo R-R e na duração da onda T, além de elevações nas amplitudes das ondas P, T e do complexo QRS.

Através da análise desses registros é possível a visualização das alterações nos padrões das ondas, nas durações e amplitudes das ondas, nas durações dos segmentos e intervalos de onda e na frequência de batimentos cardíacos tanto ao longo da hipóxia gradual como a diferença entre os traçados de ECG dos peixes dos grupos Ct e  $\text{HgCl}_2$ .



**Figura 21 - (A)** Registro eletrocardiográfico (onda P, complexo QRS e onda T) de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg); **(B)** Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  por 96 horas em normóxia (140 mmHg).



**Figura 22 - (A)** Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg); **(B)** Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> por 96 horas em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg).

A tabela 1 mostra os valores médios das durações das ondas P e T, do complexo QRS, dos intervalos P-R, R-R, Q-T (e QTc), J-T; do segmento S-T além das amplitudes das ondas P e T e do complexo QRS, obtidos para *B. amazonicus* durante a normóxia e hipóxia gradual nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>.

A duração da onda P, em normóxia, foi de  $0,042 \pm 0,003$  s para o grupo Ct e de  $0,038 \pm 0,002$  s para o grupo HgCl<sub>2</sub>, não havendo diferença significativa entre esses valores. Entretanto, no grupo HgCl<sub>2</sub>, nas tensões de O<sub>2</sub> de 60 a 20 mmHg, a duração da onda P apresentou elevação significativa na ordem de 26% em relação ao valor inicial obtido em normóxia. Esses valores foram significativamente superiores aqueles exibidos pelos peixes do grupo Ct nas mesmas tensões de O<sub>2</sub>.

Não foram observadas diferenças significativas na duração do complexo QRS no decorrer da hipóxia gradual nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> e nem entre os grupos experimentais em cada umas das tensões de O<sub>2</sub> analisadas.

Durante a hipóxia severa, houve uma diminuição significativa na duração da onda T em 20 mmHg no grupo Ct e em 40 e 20 mmHg no grupo HgCl<sub>2</sub>. Adicionalmente, os valores médios da duração da onda T do grupo HgCl<sub>2</sub> foram significativamente inferiores (na ordem de 30 a 38%) em relação aos registrados para o grupo Ct em todas as tensões de O<sub>2</sub> testadas.

No grupo Ct houve uma diminuição significativa do intervalo P-R a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 60 mmHg, partindo do valor de  $0,081 \pm 0,002$  s, observado em normóxia, até o valor mínimo de  $0,071 \pm 0,002$  s, observado na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada no experimento (20 mmHg). O intervalo P-R do grupo HgCl<sub>2</sub> não sofreu alteração significativa no decorrer da hipóxia gradual, entretanto, os valores médios deste intervalo apresentaram-se significativamente superiores (de 12 a 24 %) aos do grupo controle em todas as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>.

A duração do intervalo R-R no grupo Ct, em normóxia, foi de  $0,87 \pm 0,05$  s. Tal intervalo sofreu aumentos significativos a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg, alcançando o valor máximo de  $2,76 \pm 0,34$  s na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> testada (20 mmHg). O intervalo R-R do grupo HgCl<sub>2</sub> aumentou significativamente a partir de 80 mmHg, com valores normóxicos de  $0,86 \pm 0,04$  s, atingindo o valor máximo de  $5,99 \pm 0,71$  na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 20 mmHg. Esta análise evidenciou que os aumentos do intervalo R-R ocorreram simultaneamente com a bradicardia em cada um dos grupos experimentais. Os peixes do grupo HgCl<sub>2</sub> apresentaram intervalos R-R com maiores durações (de 22 a 117%) que os apresentados pelos animais do grupo Ct nas tensões de O<sub>2</sub> de 80 a 20 mmHg (facilmente visualizado na Fig. 22).

Não foram observadas diferenças significativas na duração do intervalo Q-T no decorrer da hipóxia gradual no grupo Ct. No entanto, no grupo HgCl<sub>2</sub>, em relação ao valor observado em normóxia ( $0,37 \pm 0,01$  s), foi verificado um aumento significativo no intervalo Q-T de aproximadamente 35% na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 20 mmHg. O valor do intervalo Q-T a 20 mmHg no grupo



HgCl<sub>2</sub> (0,51 ± 0,02 s) foi significativamente superior aquele observado para os peixes do grupo Ct nessa mesma tensão de O<sub>2</sub> (0,42 ± 0,02 s).

O valor médio do QTc (dispersão do intervalo Q-T), em normóxia, foi de aproximadamente 0,4 s em ambos grupos experimentais, valor este que se manteve constante até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 100 no grupo Ct e de 60 mmHg no grupo HgCl<sub>2</sub>. Abaixo de tais tensões ocorreu uma redução significativa deste parâmetro que atingiu um valor mínimo de 0,28 s no grupo Ct e 0,23 s no grupo HgCl<sub>2</sub> na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada. Quando comparados os grupos entre si, nas menores tensões de O<sub>2</sub> de 40 e 20 mmHg, os valores de QTc do grupo HgCl<sub>2</sub> apresentaram-se significativamente inferiores em relação ao grupo Ct.

Em relação a duração do intervalo J-T, não foram observadas diferenças significativas tanto no decorrer da hipóxia gradual como entre os grupos experimentais. Apenas na menor tensão de O<sub>2</sub> (20 mmHg) verificou-se um elevação significativa deste intervalo no grupo HgCl<sub>2</sub>, fazendo com que este valor fosse significativamente superior àquele observado no grupo Ct na mesma P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>.

Não foram observadas diferenças significativas na duração do segmento S-T no decorrer da hipóxia gradual no grupo Ct. Por outro lado, no grupo HgCl<sub>2</sub>, observou-se um aumento significativo do segmento na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 20 mmHg. Em todas as tensões de O<sub>2</sub> testadas, o grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> apresentou durações do segmento S-T significativamente superiores (de 25 a 54%) aqueles exibidos pelos peixes do grupo Ct.

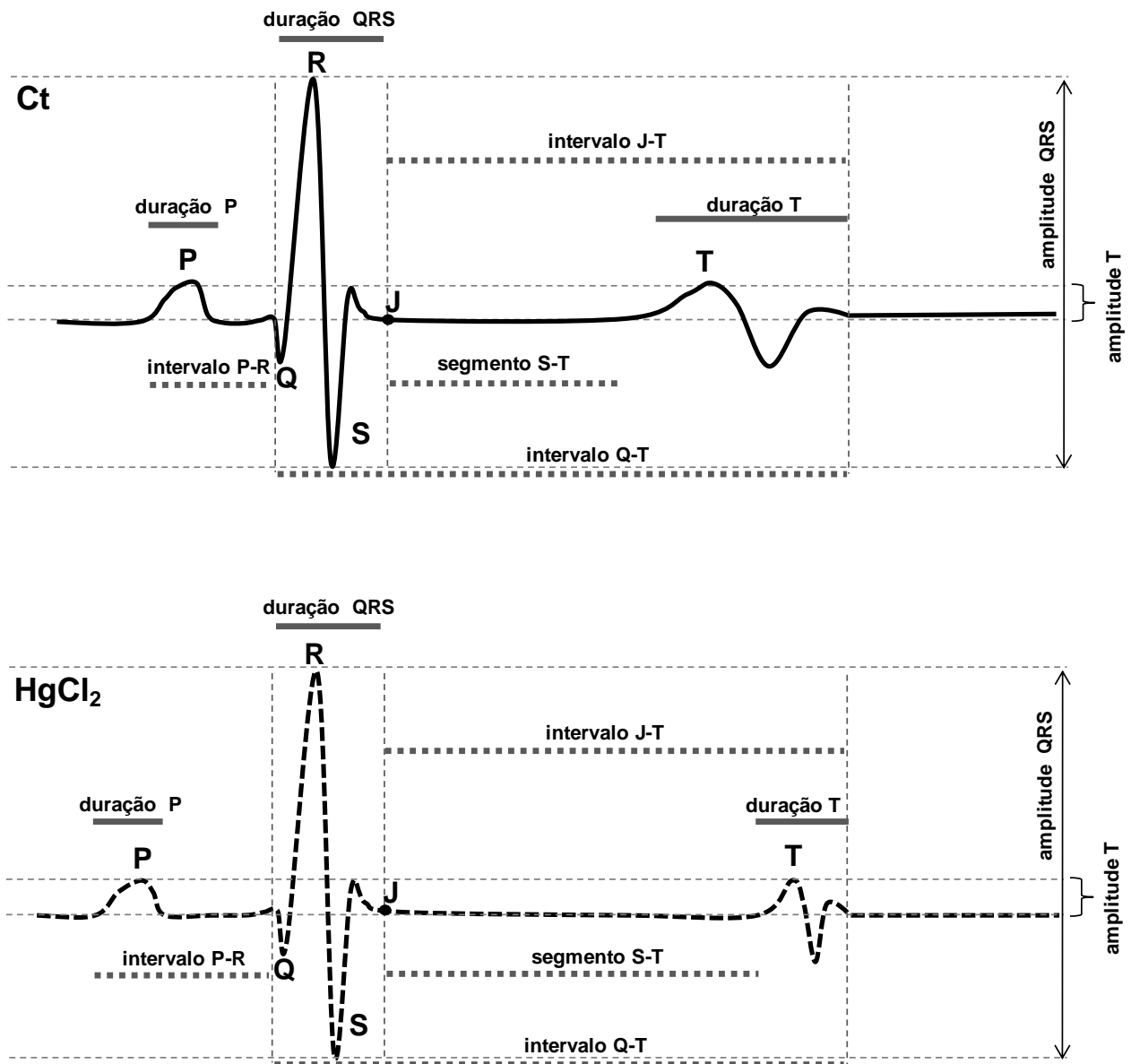
Somente na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 20 mmHg, foram observados aumentos significativos nas porcentagens dos valores iniciais (140 mmHg) da amplitude da onda P em ambos os grupos experimentais. No decorrer da hipóxia gradual, elevações significativas nas amplitudes do complexo QRS e da onda T também foram observadas nas menores P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> analisadas (40 e 20 mmHg). Quando comparados ambos os grupos experimentais, não foram identificadas alterações significativas na amplitude da onda P, do complexo QRS e da onda T

A análise de variância two-way indicou que a interação entre a exposição ao HgCl<sub>2</sub> e à hipóxia só foi significativa para o intervalo R-R e QTc (Tab. 3). Entretanto, houve um efeito significativo da hipóxia, independentemente da presença do HgCl<sub>2</sub> na água, em reduzir a amplitude da onda P e aumentar os valores da duração de T, R-R, QT e QTc, J-T e da amplitude de T e QRS.

Além disso, também foi evidenciado um efeito da exposição ao HgCl<sub>2</sub>, independentemente da hipóxia, em aumentar a duração das ondas P e T, dos intervalos P-R, R-R e Q-T e do segmento S-T. Os principais efeitos da exposição ao HgCl<sub>2</sub> sobre o traçado eletrocardiográfico de *B. amazonicus* estão apresentados na figura 23.

**Tabela 1** - Análises eletrocardiográficas de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg); #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais Ct e HgCl<sub>2</sub> (p < 0,05).

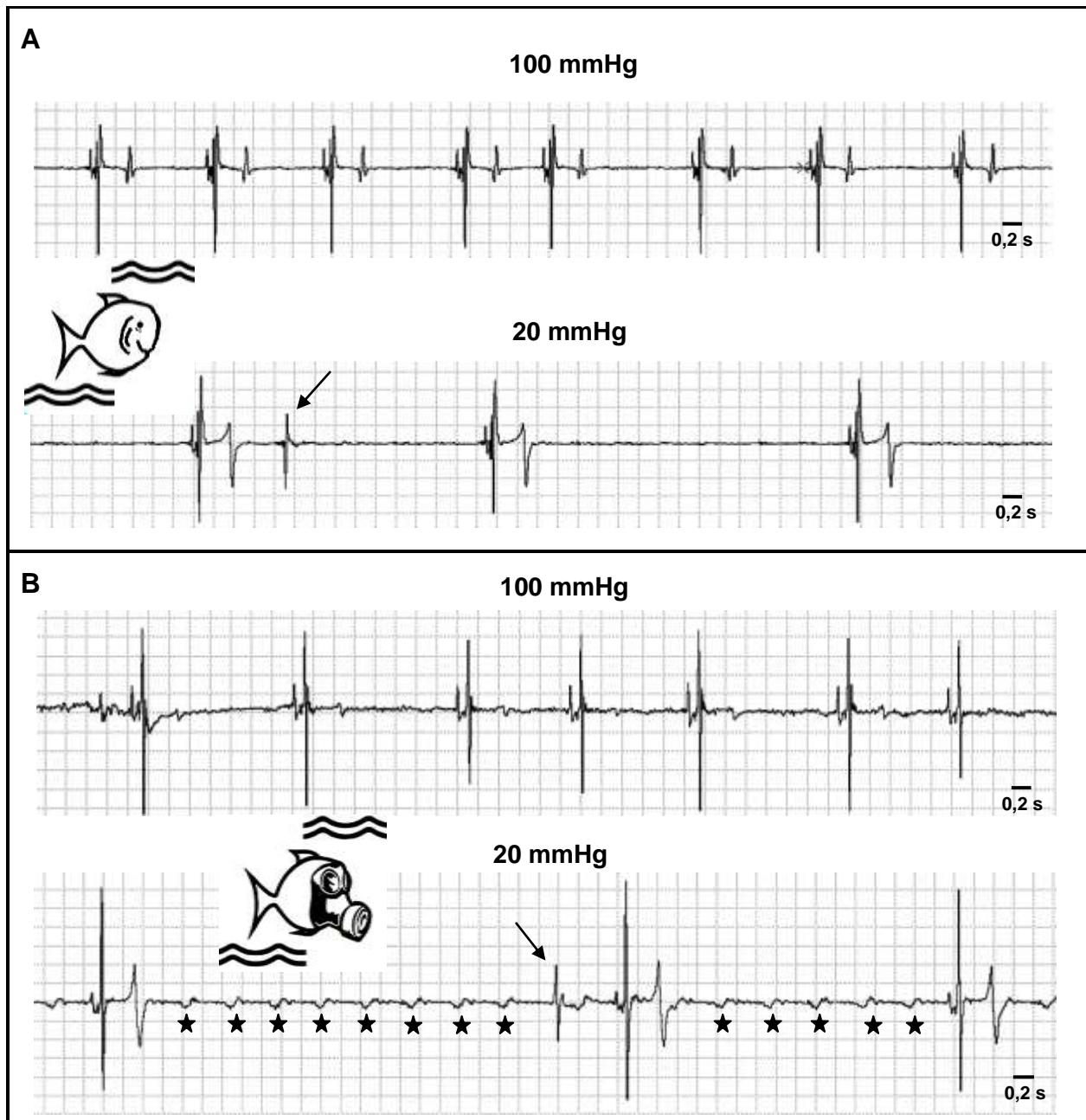
Parâmetro	P <sub>in</sub> O <sub>2</sub>	Ct	HgCl <sub>2</sub>	Parâmetro	P <sub>in</sub> O <sub>2</sub>	Ct	HgCl <sub>2</sub>
Duração da onda P (s)	140	0,042 ± 0,003	0,038 ± 0,002	QTc (s)	140	0,368 ± 0,010	0,393 ± 0,022
	120	0,039 ± 0,002	0,037 ± 0,001		120	0,356 ± 0,008	0,394 ± 0,023
	100	0,039 ± 0,002	0,039 ± 0,002		100	0,346 ± 0,006	0,384 ± 0,024
	80	0,040 ± 0,002	0,039 ± 0,002		80	<b>0,330 ± 0,007</b>	0,360 ± 0,023
	60	0,037 ± 0,002	<b>0,048 ± 0,004 #</b>		60	<b>0,330 ± 0,007</b>	0,318 ± 0,024
	40	0,037 ± 0,002	<b>0,048 ± 0,003 #</b>		40	<b>0,304 ± 0,009</b>	<b>0,254 ± 0,015 #</b>
	20	0,038 ± 0,002	<b>0,048 ± 0,003 #</b>		20	<b>0,284 ± 0,008</b>	<b>0,232 ± 0,016 #</b>
Duração do complexo QRS (s)	140	0,066 ± 0,005	0,063 ± 0,003	Intervalo J-T (s)	140	0,301 ± 0,011	0,279 ± 0,025
	120	0,065 ± 0,004	0,063 ± 0,003		120	0,291 ± 0,010	0,293 ± 0,027
	100	0,063 ± 0,004	0,061 ± 0,003		100	0,290 ± 0,011	0,295 ± 0,026
	80	0,061 ± 0,003	0,061 ± 0,002		80	0,300 ± 0,013	0,305 ± 0,028
	60	0,060 ± 0,004	0,059 ± 0,002		60	0,317 ± 0,015	0,316 ± 0,027
	40	0,060 ± 0,004	0,062 ± 0,003		40	0,313 ± 0,015	0,338 ± 0,026
	20	0,060 ± 0,004	0,064 ± 0,002		20	0,328 ± 0,020	<b>0,432 ± 0,014 #</b>
Duração da onda T (s)	140	0,167 ± 0,018	0,104 ± 0,009 #	Segmento S-T (s)	140	0,168 ± 0,016	0,212 ± 0,007#
	120	0,155 ± 0,015	0,107 ± 0,011 #		120	0,174 ± 0,013	0,218 ± 0,010#
	100	0,155 ± 0,010	0,109 ± 0,009 #		100	0,171 ± 0,012	0,223 ± 0,021 #
	80	0,164 ± 0,012	0,115 ± 0,011 #		80	0,170 ± 0,015	0,222 ± 0,007 #
	60	0,178 ± 0,009	0,125 ± 0,011 #		60	0,171 ± 0,017	0,229 ± 0,008 #
	40	0,195 ± 0,013	<b>0,144 ± 0,009 #</b>		40	0,179 ± 0,015	0,229 ± 0,005 #
	20	<b>0,247 ± 0,026</b>	<b>0,176 ± 0,008 #</b>		20	0,174 ± 0,016	<b>0,268 ± 0,012 #</b>
Intervalo P-R ou A <sub>APD</sub> (s)	140	0,081 ± 0,002	0,091 ± 0,004 #	Amplitude de P (%)	140	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	120	0,079 ± 0,002	0,091 ± 0,004 #		120	98,12 ± 4,51	101,72 ± 2,65
	100	0,079 ± 0,002	0,090 ± 0,003 #		100	102,01 ± 6,35	99,23 ± 4,39
	80	0,076 ± 0,003	0,089 ± 0,004 #		80	98,85 ± 4,09	100,17 ± 4,07
	60	<b>0,072 ± 0,003</b>	0,087 ± 0,003 #		60	94,52 ± 7,49	95,73 ± 3,77
	40	<b>0,072 ± 0,003</b>	0,087 ± 0,002 #		40	83,97 ± 6,70	88,51 ± 5,95
	20	<b>0,071 ± 0,002</b>	0,088 ± 0,003 #		20	<b>74,31 ± 9,59</b>	<b>76,47 ± 4,62</b>
Intervalo R-R (s)	140	0,878 ± 0,047	0,856 ± 0,044	Amplitude do QRS (%)	140	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	120	1,059 ± 0,073	0,912 ± 0,048		120	94,91 ± 2,86	97,69 ± 1,80
	100	1,151 ± 0,082	1,019 ± 0,049		100	97,83 ± 3,18	98,37 ± 3,04
	80	1,089 ± 0,077	<b>1,332 ± 0,059 #</b>		80	98,01 ± 3,36	101,45 ± 2,73
	60	1,270 ± 0,147	<b>1,687 ± 0,084 #</b>		60	104,58 ± 3,74	103,59 ± 5,84
	40	<b>1,813 ± 0,137</b>	<b>2,404 ± 0,298 #</b>		40	<b>117,74 ± 4,03</b>	<b>121,11 ± 6,28</b>
	20	<b>2,759 ± 0,349</b>	<b>5,997 ± 0,715 #</b>		20	<b>120,86 ± 6,62</b>	<b>119,96 ± 12,41</b>
Intervalo Q-T ou V <sub>APD</sub> (s)	140	0,374 ± 0,009	0,374 ± 0,015	Amplitude de T (%)	140	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	120	0,362 ± 0,010	0,374 ± 0,022		120	102,35 ± 8,61	101,00 ± 9,26
	100	0,358 ± 0,012	0,371 ± 0,023		100	112,68 ± 12,30	100,30 ± 9,65
	80	0,365 ± 0,015	0,385 ± 0,023		80	112,68 ± 12,30	105,39 ± 15,24
	60	0,380 ± 0,017	0,394 ± 0,025		60	130,81 ± 21,43	114,18 ± 14,46
	40	0,402 ± 0,012	0,432 ± 0,009		40	<b>161,42 ± 22,04</b>	<b>139,48 ± 11,23</b>
	20	0,422 ± 0,024	<b>0,506 ± 0,017 #</b>		20	<b>159,41 ± 15,35</b>	<b>143,29 ± 12,80</b>



**Figura 23** - Traçado eletrocardiográfico exibido pelos exemplares de *B. amazonicus* do grupo controle (traçado contínuo) e do grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  (traçado pontilhado) em normóxia (140 mmHg). Como principais efeitos do  $\text{HgCl}_2$  são mostrados: o aumento da duração do intervalo P-R e do segmento S-T e redução da duração da onda T.

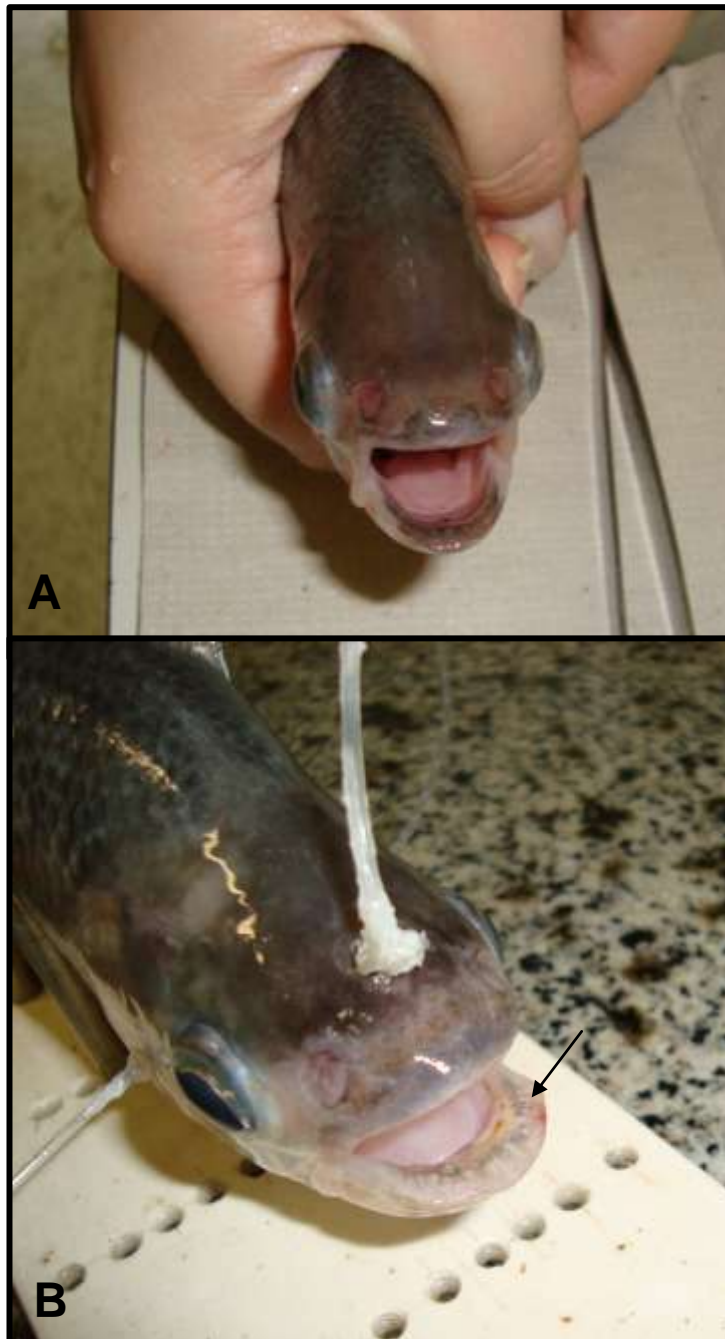
A figura 24 mostra o registro eletrocardiográfico de um peixe do grupo Ct (Fig. 24A) e de um exemplar do grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  (Fig. 24B) caracterizando a ritmo cardíaco no decorrer da hipóxia gradual. Em hipóxia severa (20 mmHg), 40% dos peixes do grupo controle apresentaram algumas extra-sístoles (~ 2/min). Por outro lado, 85% dos peixes expostos ao  $\text{HgCl}_2$  apresentaram extra-sístoles (3-4/min) em hipóxia severa. Arritmias foram observadas tanto em

normóxia como durante a hipóxia gradual em ambos os grupos experimentais. Na maior parte dos registros eletrocardiográficos do matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  e submetidos à hipóxia severa ainda foram observadas sucessivas ondas P entre o aparecimento de dois complexos QRS.



**Figura 24 – (A)** Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo controle em hipóxia moderada (100 mmHg) e severa (20 mmHg); **(B)** Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *B. amazonicus* do grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  por 96 h em hipóxia moderada (100 mmHg) e severa (20 mmHg). As setas indicam as extra-sístoles. As estrelas representam despolarizações atriais sucessivas (ondas P) entre duas despolarizações ventriculares (complexos QRS).

Após a exposição à hipóxia gradual os matrinxãs de ambos os grupos experimentais desenvolveram edema labial como mostrado na figura 25.



**Figura 25** - Efeito da hipóxia sobre o tamanho do lábio de *B. amazonicus*. A foto **A** representa um peixe do grupo Ct em normóxia (140 mmHg) e a foto **B** um peixe do grupo Ct após ser submetido a hipóxia severa (20 mmHg). A seta indica o edema labial.

**Tabela 2** - Análise de variância ANOVA two-way das variáveis respiratórias e da frequência cardíaca de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da exposição ao HgCl<sub>2</sub>, ou nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> (p < 0,05).

FATORES	PARÂMETROS				
	$\dot{V}O_2$ (mLO <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\dot{V}_G$ (mLH <sub>2</sub> O.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	$f_R$ (ciclos.min <sup>-1</sup> )	$V_T$ (mLH <sub>2</sub> O.ciclo <sup>-1</sup> )	$EO_2$ (%)
<b>Efeito da hipóxia</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	<b>p &lt; 0,001</b>
140	107,90 ± 4,64	746,59 ± 173,52	90,21 ± 2,21	8,46 ± 1,76	55,44 ± 2,11
120	104,76 ± 4,64	943,96 ± 177,36	94,87 ± 2,15	9,91 ± 1,65	53,92 ± 2,17
100	102,42 ± 5,03	1277,60 ± 170,99	98,77 ± 2,13	13,18 ± 1,70	53,42 ± 2,13
80	100,90 ± 4,83	<b>1871,58 ± 179,62</b>	<b>107,73 ± 2,13</b>	<b>17,44 ± 1,84</b>	50,86 ± 2,25
60	95,81 ± 4,64	<b>2897,07 ± 200,08</b>	<b>120,15 ± 2,25</b>	<b>24,19 ± 1,87</b>	<b>45,46 ± 2,20</b>
40	<b>77,34 ± 4,81</b>	<b>3901,37 ± 200,08</b>	<b>125,91 ± 2,47</b>	<b>31,18 ± 1,96</b>	<b>44,57 ± 2,43</b>
20	<b>32,93 ± 4,81</b>	<b>5394,16 ± 247,31</b>	<b>120,57 ± 2,65</b>	<b>42,43 ± 2,21</b>	<b>28,91 ± 2,34</b>
<b>Efeito do Hg</b>	<b>p = 0,003</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	ns	<b>p &lt; 0,001</b>	ns
Ct	94,22 ± 2,50	2844,28 ± 103,13	107,27 ± 1,07	24,18 ± 0,98	48,87 ± 1,11
HgCl <sub>2</sub>	<b>83,51 ± 2,60</b>	<b>2022,15 ± 104,60</b>	109,35 ± 1,36	<b>17,76 ± 1,02</b>	46,15 ± 1,27
<b>Hipóxia x Hg</b>	ns	<b>p &lt; 0,001</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	ns

FATORES	PARÂMETROS			
	$\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ (mLH <sub>2</sub> O.mLO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	PIB (mmHg)	PIO (mmHg)	$f_H$ (bpm)
<b>Efeito da hipóxia</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	<b>p &lt; 0,001</b>	ns	<b>p &lt; 0,001</b>
140	411,47 ± 156,98	0,281 ± 0,025	0,426 ± 0,027	69,21 ± 2,57
120	542,531 ± 153,78	0,289 ± 0,023	0,429 ± 0,028	66,71 ± 2,63
100	752,03 ± 181,96	0,307 ± 0,023	0,439 ± 0,028	63,15 ± 2,71
80	1108,66 ± 187,47	0,301 ± 0,024	0,423 ± 0,028	<b>56,73 ± 3,02</b>
60	<b>1828,234 ± 186,04</b>	0,262 ± 0,022	0,373 ± 0,027	<b>47,43 ± 3,02</b>
40	<b>2977,91 ± 178,42</b>	<b>0,182 ± 0,021</b>	0,312 ± 0,027	<b>36,11 ± 2,80</b>
20	<b>8402,58 ± 211,42</b>	<b>0,175 ± 0,024</b>	0,342 ± 0,027	<b>21,98 ± 3,04</b>
<b>Efeito do Hg</b>	ns	<b>p &lt; 0,001</b>	ns	<b>p = 0,001</b>
Ct	2330,33 ± 93,84	0,298 ± 0,011	0,383 ± 0,016	55,18 ± 1,53
HgCl <sub>2</sub>	2247,78 ± 98,89	<b>0,215 ± 0,013</b>	0,401 ± 0,014	<b>48,05 ± 1,50</b>
<b>Hipóxia x Hg</b>	ns	<b>p = 0,005</b>	ns	<b>p = 0,005</b>

**Tabela 3** - Análise de variância ANOVA two-way das análises eletrocardiográficas de matrinxãs, *B. amazonicus*, do grupo controle (Ct, n = 12) e exposto a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas (HgCl<sub>2</sub>, n = 12) e submetidos à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da exposição ao HgCl<sub>2</sub>, ou nos grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> (p < 0,05).

FATORES	PARÂMETROS					
	P (s)	QRS (s)	T (s)	P-R (s)	R-R (s)	Q-T (s)
<b>Efeito da hipóxia</b>	ns	ns	p < 0,001	ns	p < 0,001	p < 0,001
140	0,066 ± 0,002	0,064 ± 0,002	0,135 ± 0,008	0,086 ± 0,002	0,94 ± 0,11	0,374 ± 0,012
120	0,065 ± 0,002	0,064 ± 0,003	0,131 ± 0,008	0,085 ± 0,002	0,98 ± 0,11	0,368 ± 0,011
100	0,064 ± 0,002	0,062 ± 0,002	0,132 ± 0,009	0,084 ± 0,002	1,08 ± 0,10	0,365 ± 0,012
80	0,064 ± 0,002	0,061 ± 0,002	0,139 ± 0,009	0,083 ± 0,002	1,26 ± 0,11	0,375 ± 0,012
60	0,062 ± 0,002	0,059 ± 0,003	0,152 ± 0,009	0,080 ± 0,002	<b>1,52 ± 0,12</b>	0,387 ± 0,011
40	0,062 ± 0,002	0,061 ± 0,003	0,169 ± 0,009	0,079 ± 0,002	<b>2,11 ± 0,12</b>	0,416 ± 0,013
20	0,063 ± 0,002	0,062 ± 0,003	<b>0,211 ± 0,011</b>	0,079 ± 0,002	<b>4,38 ± 0,14</b>	<b>0,464 ± 0,013</b>
<b>Efeito do Hg</b>	p < 0,001	ns	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,009
Ct	0,039 ± 0,001	0,062 ± 0,001	0,180 ± 0,005	0,076 ± 0,001	1,50 ± 0,057	0,381 ± 0,006
HgCl <sub>2</sub>	<b>0,089 ± 0,001</b>	0,062 ± 0,001	<b>0,126 ± 0,005</b>	<b>0,089 ± 0,001</b>	<b>2,01 ± 0,068</b>	<b>0,405 ± 0,007</b>
<b>Hipóxia x Hg</b>	ns	ns	ns	ns	p < 0,001	ns

FATORES	PARÂMETROS					
	QTc (s)	J-T (s)	S-T (s)	P <sub>amp</sub> (%)	QRS <sub>amp</sub> (%)	T <sub>amp</sub> (%)
<b>Efeito da hipóxia</b>	p < 0,001	p < 0,001	ns	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
140	0,381 ± 0,010	0,290 ± 0,013	0,190 ± 0,011	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
120	0,375 ± 0,010	0,292 ± 0,013	0,196 ± 0,010	99,92 ± 3,49	96,30 ± 2,95	101,68 ± 8,46
0	0,365 ± 0,010	0,292 ± 0,013	0,198 ± 0,010	100,62 ± 3,67	98,10 ± 3,10	99,82 ± 9,18
80	0,345 ± 0,010	0,302 ± 0,013	0,196 ± 0,010	99,51 ± 3,57	99,73 ± 3,10	109,03 ± 8,71
60	<b>0,324 ± 0,010</b>	0,317 ± 0,014	0,200 ± 0,011	95,13 ± 3,84	104,08 ± 3,27	122,49 ± 8,57
40	<b>0,279 ± 0,012</b>	0,326 ± 0,014	0,204 ± 0,010	86,24 ± 4,20	<b>119,43 ± 3,46</b>	<b>150,45 ± 11,18</b>
20	<b>0,258 ± 0,012</b>	<b>0,380 ± 0,015</b>	0,221 ± 0,010	<b>78,48 ± 4,06</b>	<b>120,41 ± 3,32</b>	<b>151,35 ± 11,07</b>
<b>Efeito do Hg</b>	ns	ns	p < 0,001	ns	ns	ns
Ct	0,331 ± 0,005	0,306 ± 0,007	0,173 ± 0,005	93,99 ± 1,80	104,85 ± 1,52	123,72 ± 4,77
HgCl <sub>2</sub>	0,334 ± 0,006	0,323 ± 0,008	<b>0,229 ± 0,006</b>	94,55 ± 2,18	106,02 ± 1,84	114,80 ± 5,17
<b>Hipóxia x Hg</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Respostas Respiratórias

#### 4.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ )

O sistema respiratório representa a mais extensa área de interface entre o peixe e a água e, frequentemente, é o primeiro sistema a ser afetado pelos poluentes dissolvidos (HEATH, 1995). De acordo com Dube & Hosetti (2010), a atividade respiratória dos peixes é uma das primeiras variáveis fisiológicas a ser afetada pela contaminação aquática. Assim, as respostas respiratórias poderiam ser utilizadas, de maneira bem sucedida, nos testes de toxicidade de efluentes, antes de serem descartados na rede de esgoto ou nos rios. Os autores ainda ressaltam que parâmetros como frequência ventilatória, taxa de tosse e consumo de  $O_2$ , por estarem intimamente associados com a demanda respiratória e irritação/dano branquial, fornecem um indicador robusto do estresse total dos animais e concomitante da qualidade da água. Os metais dissolvidos na água são captados pelas brânquias afetando a sua morfologia, promovendo desequilíbrios osmóticos e iônicos, aumentando a produção de muco e levando ao comprometimento da função respiratória (EVANS, 1987; SKIDMORE, 1970). Segundo Stinson & Mallatt (1989), o Hg causa fortes efeitos tóxicos sobre a membrana celular e muitas de suas ações tóxicas são atribuídas a sua capacidade de atravessar a mesma e interromper processos de transporte iônico.

As taxas de consumo de  $O_2$  medidas em um respirômetro são particularmente úteis uma vez que indicam o custo aeróbico da exposição ao poluente (CAMPBELL et al., 2002). O consumo de  $O_2$  é extensamente utilizado na fisiologia como um indicador biológico que integra a atividade metabólica global de um animal em resposta a fatores ambientais específicos, refletindo o gasto energético (MEHRLE & MAYER 1984). De acordo com MacKinnon & Farrell (1992), a taxa metabólica de peixes, normalmente mensurada pelo consumo de  $O_2$ , é um critério usado como índice de toxicidade sub-letal, pois alterações nesse parâmetro apontam para limitações no desempenho aeróbico do animal. A  $\dot{V}O_2$  de *B. amazonicus* do grupo Ct mostrou-se independente da concentração de  $O_2$  no meio, característica de uma espécie oxi-reguladora, capaz de manter a  $\dot{V}O_2$  constante em torno de  $103 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  até a tensão de  $O_2$  na água de 40 mmHg. Na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg, essa espécie não foi capaz de manter a  $\dot{V}O_2$ , tornando-se dependente da concentração de  $O_2$  na água. Espécies oxi-reguladoras mantêm ou até mesmo elevam consumo de  $O_2$  em resposta a hipóxia gradual até a tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ) ser atingida (RANTIN et al., 1984). A  $P_cO_2$  representa o limite da capacidade da espécie em manter constante sua  $\dot{V}O_2$  em



resposta à redução do  $O_2$  ambiental. Acima da  $P_cO_2$  a  $\dot{V}O_2$  permanece aproximadamente constante, a despeito das mudanças nas tensões de  $O_2$  do meio. O valor da  $P_cO_2$  para os matrinxãs do grupo Ct foi de 25 mmHg. Na  $P_cO_2$  a espécie deixa de se comportar como oxi-reguladora e passa a se comportar como oxi-conformista e a  $\dot{V}O_2$  é reduzida progressivamente com a  $PO_2$  ambiental (ULTSCH et al., 1978). Alguns estudos demonstraram que a  $P_cO_2$  é caracterizada pela mudança no padrão de consumo de  $O_2$  e pelo início do metabolismo energético anaeróbico (PORTNER & GRIESHABER, 1993; THILLART et al., 1994). Segundo Bridges (1988), abaixo da  $P_cO_2$  há uma perda da habilidade do sistema de troca gasosa em compensar a redução nas tensões de  $O_2$  do ambiente quando existe a necessidade de suprir uma demanda de  $O_2$  extra da bomba respiratória e dos tecidos.

A  $\dot{V}O_2$  em normóxia de *B. amazonicus* foi próxima à verificada para o dourado, *Salminus maxillosus*, ( $\sim 100 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , SOUZA et al., 2001) e truta arco íris, *Salmo gairdneri* ( $\sim 100 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , HOLETON & RANDALL, 1967). Tais resultados estão em concordância com os obtidos por Olle (2007) e Anelli Jr (2010) que descreveram valores de  $\dot{V}O_2$  para matrinxã, em normóxia, de  $107 \pm 6,3$  e  $109 \pm 6,9 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente. Em comparação com algumas espécies tropicais, a  $\dot{V}O_2$  de *B. amazonicus* foi semelhante à encontrada para espécies ativas, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* ( $72 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; GUERRA, 1992), o tambaqui, *Colossoma macropomum* ( $78 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; CORRÊA, 1996), o curimatá, *Prochilodus scrofa* ( $90 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; FERNANDES et al., 1995) e mais alta que para algumas espécies sedentárias, como o cascudo, *Hypostomus regani* ( $40 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; MATTIAS et al., 1998) e a traíra, *H. malabaricus* ( $64 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; presente estudo, capítulo IX). Espécies muito ativas de atuns (*Katsuwonus pelamis* e *Thunnus albacares*), apresentaram altos valores de  $\dot{V}O_2$  (BUSHNELL & BRILL, 1992). Considerando-se que *B. amazonicus* é uma espécie ativa, migratória, sendo encontrada em ambientes de águas rápidas e bem oxigenadas, a forma com que regula a  $\dot{V}O_2$  se assemelha ao que é observado em espécies com características semelhantes.

A  $P_cO_2$  calculada para *B. amazonicus* (25 mmHg) foi semelhante aos valores encontrados em serrasalmídeos tropicais, como o tambaqui ( $P_cO_2 = 24 \text{ mmHg}$ ; CORRÊA, 1996), o pacu ( $P_cO_2 = 30 \text{ mmHg}$ ; GUERRA, 1992) e o curimatá ( $P_cO_2 = 21,9 \text{ mmHg}$ ; FERNANDES et al., 1995). Por outro lado, Olle (2007) encontrou um valor de  $P_cO_2$  de 35,4 mmHg para o matrinxã. É interessante ressaltar que a variação dos valores da  $P_cO_2$  apresentados pela espécie pode ser resultante, em parte, pelas metodologias e equipamentos utilizados e pelas próprias condições laboratoriais. A manutenção da  $P_wO_2$  por um tempo suficientemente longo em cada nível de hipóxia, o sistema de respirometria e tamanho dos animais são fatores que podem provocar tais variações na determinação das  $P_cO_2$ . Para peixes de ambientes tropicais, que estão mais

frequentemente sujeitos à hipóxia ambiental, baixos valores de  $P_cO_2$ , podem ser um aspecto muito importante do ponto de vista ecológico, por mostrar uma grande capacidade de regulação da tomada de  $O_2$  do meio por parte dessas espécies (FERNANDES & RANTIN, 1989).

A exposição ao  $HgCl_2$ , não alterou a  $\dot{V}O_2$  do matrinxã em normóxia (140 mmHg), porém foi capaz de modular o padrão de resposta do consumo de  $O_2$  frente à hipóxia severa, fazendo com que a  $\dot{V}O_2$  se mantivesse constante somente até a tensão de  $O_2$  de 60 mmHg, diminuindo seus valores nas tensões de 40 e 20 mmHg e aumentando a  $P_cO_2$  em 110% (de 25 mmHg para 52,5 mmHg). Assim, a exposição aquosa por 96 horas a 0,15 ppm de  $HgCl_2$  pode tornar a espécie menos resistente as grandes variações de  $O_2$ , tanto sazonais quanto diurnas, que normalmente ocorrem em ambientes tropicais como a Amazônia ou durante a migração no período reprodutivo. A manutenção de uma elevada  $\dot{V}O_2$  característica da espécie em normóxia (140 mmHg) após a exposição ao  $HgCl_2$  pode ter contribuído para a elevada bioconcentração do metal nas brânquias, fígado, músculo branco e coração dos matrinxãs (ver capítulo III). Para exposições aquosas, existem correlações significativas entre a taxa de consumo de  $O_2$  e taxa de transferência de xenobióticos através das brânquias (RANDALL et al., 1996). De acordo com Beckvar et al. (1996), para peixes e invertebrados a absorção do mercúrio consiste num processo ativo que está relacionado com a taxa de respiração e com a taxa metabólica.

Além dos mecanismos neurotóxicos, os metais podem diretamente danificar as superfícies respiratórias e interferirem com o metabolismo energético, osmorregulação, e a função endócrina (HEATH, 1995; WEBER & SPIELER, 1994). A extensão dos efeitos tóxicos e os mecanismos pelos quais os metais atuam nos peixes dependem do tipo de metal, da dose e da via de exposição (Di GIULIO & HINTON, 2008). De acordo com Jezierska & Sarnowski (2002), as brânquias são muito mais suscetíveis a contaminações por metais via água e, frequentemente, exibem várias lesões induzidas por esse tipo de exposição, o que leva não só ao desequilíbrio osmótico, como também prejudica a função respiratória. Alguns estudos sugerem que a exposição aquosa ao Hg inorgânico dissolvido danifica o epitélio branquial resultando em respostas compensatórias como aumento na frequência ventilatória e na demanda energética, e alteração na eficiência da troca gasosa, o que conduz a uma elevação da taxa metabólica (JAGOE et al., 1996; ST-AMAND et al., 1999; TATARA et al., 2001). Os resultados do presente estudo não corroboram tais hipóteses, uma vez que não foram observadas elevações na  $\dot{V}O_2$  nos matrinxãs expostos por 96 horas a 0,15  $mg.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  e não houve alteração na extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) conforme discutido posteriormente.

Oliveira Ribeiro et al. (2002) estudando os efeitos da exposição aquosa a 15  $\mu g.L^{-1}$  de Hg inorgânico por 96 horas no peixe “Arctic charr” (*Salvelinus alpinus*) observaram que após 12 horas de exposição ao Hg (II) provocou severas lesões branquiais como descolamento do epitélio

lamelar, grande número de vacúolos nas células epiteliais, edemas e aneurismas. Entretanto, após 96 horas de exposição ao Hg (II), os autores verificaram uma recuperação parcial dessas lesões brânquias, restando apenas algumas alterações nas células epiteliais e a alteração na forma dos eritrócitos dentro dos capilares. Oliveira Ribeiro et al. (2000) também observaram recuperação incompleta das lesões brânquiais do peixe-gato tropical, *Trichomycterus zonatus*, após 96 horas de exposição a  $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Hg inorgânico. Após 4, 12 e 24 horas de exposição os autores descreveram várias alterações patológicas branquiais como hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais das lamelas secundárias, epitélio escamoso, formação de pontes interlamelares reduzindo o espaço da água e, em alguns casos, chegando à fusão completa de lamelas secundárias adjacentes.

Pistole et al. (2008) verificaram que a exposição por 24 horas a elevadas concentrações de cobre ou cádmio reduziu a  $\dot{V}\text{O}_2$  do peixe “fathead minnow”, *Pimephales promelas*, enquanto a exposição por 96 horas promoveu uma elevação em seus valores. Os autores sugerem que o aumento da  $\dot{V}\text{O}_2$  reflete a implementação das respostas celulares e mecanismos de compensação se seguem após o período inicial de exposição tais como a indução da MT e aumento da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Tais resultados poderiam explicar, em parte, a manutenção da  $\dot{V}\text{O}_2$  dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , uma vez que possíveis lesões branquiais induzidas pelo metal poderiam ter sofrido recuperação parcial após 96 horas não alterando a tomada de  $\text{O}_2$ . Cabe ressaltar que, no presente estudo, o período de recuperação de 12 horas após a cirurgia antes do início dos experimentos pode ter contribuído para esta recuperação parcial das lesões branquiais possivelmente induzidas pelo  $\text{HgCl}_2$ . As possíveis lesões resultantes após as 96 horas poderiam ainda ter contribuído para a redução da  $\dot{V}\text{O}_2$  em hipóxia severa nas tensões de 40 e 20 mmHg, além do aumento da  $\text{P}_c\text{O}_2$ .

A redução da  $\dot{V}\text{O}_2$  em hipóxia severa e o aumento da  $\text{P}_c\text{O}_2$  nos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  podem também ser decorrentes das lesões oxidativas e da grande bioacumulação do metal que podem ter tornado esse órgão mais suscetível, comprometendo seu funcionamento em hipóxia severa. Conforme discutido no capítulo IV, a exposição por 96 horas a uma dose sub-letal de  $\text{HgCl}_2$  ( $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $1/5$  da  $\text{CL}_{50}$  96h) é um potente indutor de estresse oxidativo em brânquias de matrinxã, capaz de comprometer funções das membranas lipídicas e de proteínas essenciais na manutenção da homeostasia celular e, conseqüentemente, para as trocas gasosas e consumo de  $\text{O}_2$ . Nos peixes expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , a diminuição da  $\dot{V}\text{O}_2$  nas menores tensões de  $\text{O}_2$  pode ser o reflexo de se ter atingido a capacidade máxima das brânquias, já com lesões oxidativas, em tolerar ou acomodar as alterações relacionadas ao consumo de  $\text{O}_2$  induzidas pela exposição ao metal.

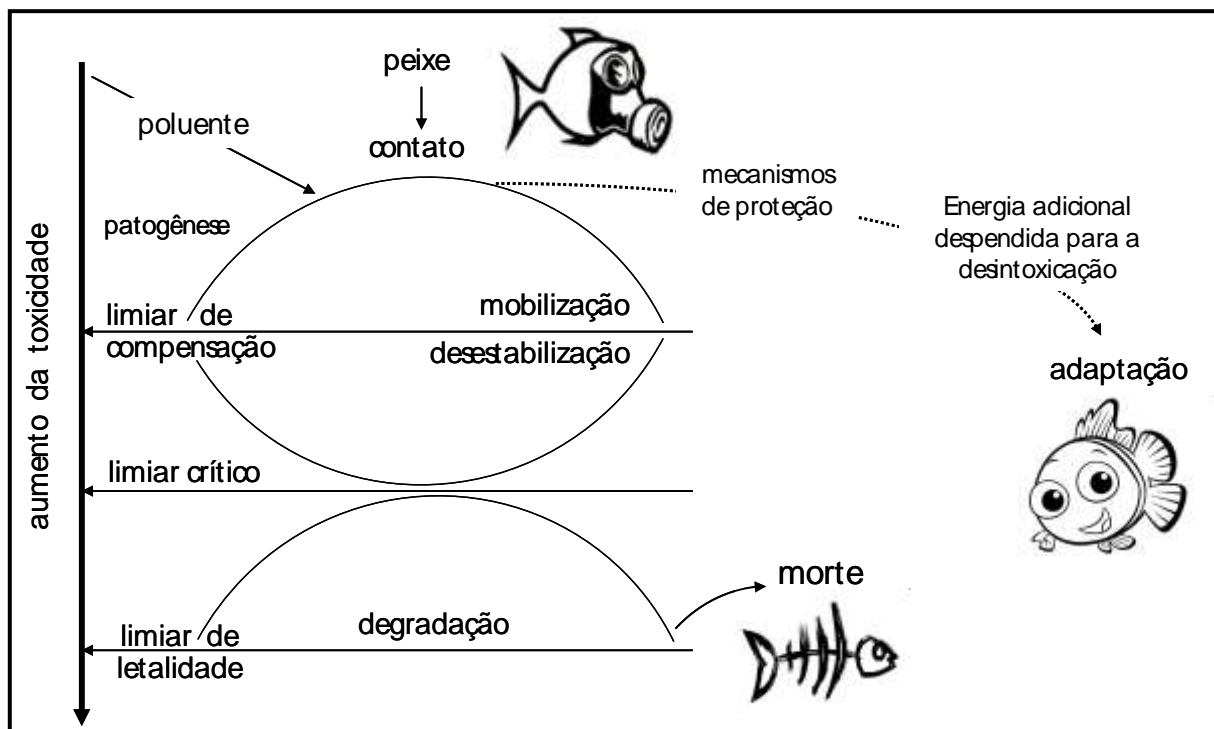
McKenzie e colaboradores (2007) estudaram o desempenho do exercício e a taxa metabólica do ciprinídeo, *Leuciscus cephalus*, exposto em rios europeus livres de poluição e em rios com elevados níveis de metais pesados. Os autores verificaram que os peixes expostos em locais poluídos não conseguiram reproduzir o desempenho natatório dos animais controles e não foram capazes de aumentar a taxa metabólica acompanhando o aumento da demanda energética do exercício. De acordo com Calow (1991), a manutenção de elevados custos para lidar com o estressor pode não ser suficiente para superar o estresse. Dessa forma, no presente estudo, os matrinxãs foram capazes de sobreviver, mas foram incapazes de manter a regulação da taxa metabólica na presença do HgCl<sub>2</sub> em hipóxia severa. Dessa forma, conforme evidenciado pela análise two-way, o padrão de resposta da  $\dot{V}O_2$  frente à hipóxia não depende da presença de HgCl<sub>2</sub> na água, havendo apenas um efeito individual do HgCl<sub>2</sub> ou da hipóxia em reduzir a  $\dot{V}O_2$ .

A ocorrência de tais alterações também pode estar relacionada a mudanças induzidas pelo HgCl<sub>2</sub> na capacidade do sangue em transportar O<sub>2</sub>. Sastrya & Sharma (1980) estudando o efeito da CL<sub>50</sub> (1,8 mg.L<sup>-1</sup>) e de uma concentração sub-letal (0,3 mg.L<sup>-1</sup>) de HgCl<sub>2</sub> no teleósteo *Channa punctatus*, observaram, após 96 horas de exposição, reduções significativas na concentração de hemoglobina e no hematócrito. Shah & Altindag (2004) verificaram aumento no volume corpuscular médio (MCV) e diminuição na concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) no peixe *Tinca tinca* após 96 horas de exposição a 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>. Apesar de não terem sido avaliadas, essas possíveis alterações hematológicas induzidas pelo HgCl<sub>2</sub> na água podem ter ocorrido em matrinxã e resultado numa menor capacidade de transporte de O<sub>2</sub>, causando certo nível de hipóxia e aumento da P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>. Conseqüentemente, os peixes tentaram compensar os baixos níveis de O<sub>2</sub> aumentando a frequência respiratória. Entretanto, essa hiperventilação não foi sustentada em hipóxia severa, reduzindo a tomada de O<sub>2</sub>.

Deve-se ressaltar que os matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram hiperventilação nas tensões de O<sub>2</sub> de 140 a 60 mmHg, abaixo da qual os animais exibiram uma hipoventilação conforme discutido posteriormente. Isso pode ter contribuído, respectivamente, para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  a níveis controle até a tensão de 60 mmHg e para a redução significativa deste parâmetro nas tensões de 40 e 20 mmHg. As próprias lesões oxidativas encontradas nas brânquias dos matrinxãs após a exposição ao HgCl<sub>2</sub> (ver detalhes no capítulo IV) podem ter contribuído, pelo menos em parte, para a queda da  $\dot{V}O_2$  na tensão de 40 mmHg elevando, assim, a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>. Morris et al. (2005) estudaram os efeitos concomitantes do chumbo e da hipóxia na respiração e no “status” energético muscular do lagostim de água doce, *Cherax destructor*, para determinar se a intoxicação por chumbo agravou os efeitos da hipóxia. Os autores verificaram que nos lagostins intoxicados por 14 dias com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Pb e submetidos a hipóxia gradual (P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> de 19,60 a 1,33 kPa) exibiram, sob hipóxia máxima, aumento muscular de ADP e

diminuição da respiração com redução da glicólise. Adicionalmente, durante as fases iniciais da hipóxia severa, que foi sustentada por 3 horas, houve uma diminuição transitória de 15% na frequência de ventilação nos lagostins expostos ao Pb, o que reflete a menor utilização de O<sub>2</sub>. Estes efeitos foram atribuídos à exposição ao Pb, mas ocorreu apenas durante a hipóxia severa, agravando os efeitos desta, de maneira semelhante ao observado no presente estudo.

Conforme proposto por Moissenko (2000), o esquema geral do desenvolvimento de toxicidade em peixes é mostrado na figura 25.



**Figura 26** - Esquema do desenvolvimento de toxicidade em peixes (adaptado de Moissenko, 2000).

Teoricamente, os mecanismos de proteção atingem seu pico de atividade no limiar de compensação, até onde conseguem retardar ou impedir o desenvolvimento de patologias. O limiar crítico é caracterizado pela exaustão dos sistemas de proteção e as alterações patológicas no organismo começam a prevalecer sobre os processos de reparação, o que acaba por conduzir a resultados letais. Ao mesmo tempo, a morbidade em uma população de peixes não é uniforme, e este fato pode ser atribuído a diferenças não apenas na duração e intensidade dos efeitos tóxicos, mas também na tolerância individual dos espécimes para agentes tóxicos correspondentes. A exposição ao HgCl<sub>2</sub> parece reduzir os limiares de compensação e crítico frente à hipóxia, fazendo com que os matrinxãs não conseguissem manter a homeostasia da tomada de O<sub>2</sub> a limites exibidos pelos controles, reduzindo a taxa metabólica em hipóxia severa,

elevando a  $P_cO_2$  e comprometendo, conseqüentemente, as chances de sobrevivência em situações de baixa disponibilidade de  $O_2$ .

#### 4.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), freqüência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ )

A  $\dot{V}_G$  de *B. amazonicus* em normóxia, determinada no presente estudo (746 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), foi próxima à encontrada para outras espécies estudadas nas mesmas condições, como cascudo *H. regani* (913 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; MATTIAS et al., 1998) e o dourado, *S. maxillosus* (914 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; SOUZA et al., 2001), espécies que habitam águas rápidas e bem oxigenadas. Para que a homeostase respiratória se mantenha, com propósito de preservar o gradiente de  $O_2$  entre a água e o sangue tão alto quanto possível, torna-se necessário a mobilização de mecanismos compensatórios, como o aumento da  $\dot{V}_G$  assegurando, deste modo, a eficiência respiratória nas trocas gasosas (FERNANDES & RANTIN, 1989).

Tanto os matrinxãs do grupo Ct quanto aqueles do grupo HgCl<sub>2</sub> exibiram aumentos significativos na  $\dot{V}_G$  no decorrer da hipóxia gradual, a partir da tensão de  $O_2$  de 80 mmHg. Segundo Weber (1982) os mecanismos utilizados pela maioria das espécies de peixes tropicais em resposta às diminuições nas concentrações de  $O_2$  no ambiente são as respostas ventilatórias e os ajustes na capacidade de transporte de  $O_2$  pelo sangue, sendo que este último mecanismo necessita de vários dias para tornar-se efetivo. Segundo Glass (1992), a discussão sobre a ventilação branquial deve fundamentar-se no que o autor denominou "uma das equações fundamentais da fisiologia respiratória", estabelecida por Dejours (1981):  $\dot{V}O_2 = \dot{V}_G \cdot EO_2 \cdot P_{insp}O_2 = 1$ . Como o potencial para o aumento da  $EO_2$  é muito limitado em peixes, o aumento na  $\dot{V}_G$  é necessário para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  e constitui a mais efetiva compensação durante reduzidas disponibilidades de  $O_2$  na água (KALININ, 1996).

Para o grupo Ct foram registrados aumentos da  $\dot{V}_G$  na ordem de 10 vezes na menor  $P_{in}O_2$  estudada (20 mmHg) em relação a normóxia (140 mmHg). Tal resposta também foi observada para outras espécies de teleósteos submetidos a diferentes níveis de hipóxia ambiental. A truta arco-íris foi capaz de aumentar a  $\dot{V}_G$  em 13 vezes em resposta à hipóxia (HOLETON & RANDALL, 1967), o tambaqui em 10,9 vezes (CORRÊA, 1996) e o curimatá em 12 vezes (FERNANDES et al., 1995). Para Rantin & Johansen (1984), a magnitude com a qual o peixe geralmente aumenta a  $\dot{V}_G$  depende do grau de hipóxia a que é submetido e da capacidade da espécie em compensar a redução de  $O_2$  no ambiente. Por outro lado, no grupo HgCl<sub>2</sub>, os

aumentos na  $\dot{V}_G$  ficaram em torno de 4,5 vezes em relação à normóxia. De acordo com Kalinin (1991), as respostas ventilatórias exercem um papel muito importante na sobrevivência de peixes em água pobres em  $O_2$ , pelo fato de serem respostas imediatas. Dessa forma, a exposição ao  $HgCl_2$ , reduz a capacidade de compensação (limites de compensação e crítico, Fig. 25) da espécie frente à hipóxia, o que foi comprovado pela interação significativa entre os fatores hipóxia e  $HgCl_2$ , ou seja, a exposição ao metal impediu a elevação da ventilação branquial, sendo o padrão de resposta da  $\dot{V}_G$  frente à hipóxia dependente da presença de  $HgCl_2$  na água.

A  $\dot{V}_G$  em *B. amazonicus* durante a hipóxia gradual, apresentou um aumento significativo principalmente em função da maior elevação no  $V_T$  (cerca de 7,3 vezes no grupo C e 5,8 vezes no grupo  $HgCl_2$ ) do que na  $f_R$  (cerca de 1,6 vezes no grupo Ct a 20 mmHg e 1,3 vezes no grupo  $HgCl_2$  a 60 mmHg) apesar da reduzida capacidade para expansão das cavidades bucal e opercular. No grupo exposto ao  $HgCl_2$  houve a necessidade de elevação no  $V_T$  já na tensão de  $O_2$  de 80 mmHg para manter a  $\dot{V}O_2$ , enquanto que os matrinxãs do grupo Ct, exibiram aumentos pronunciados a partir da tensão de 60 mmHg. Há uma predominância dessa estratégia entre os peixes, apesar de possuírem um grande potencial para aumentar a  $f_R$  devido a um padrão de respiração muitas vezes intermitente (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979). Do ponto de vista metabólico, um maior aumento no  $V_T$  em relação a  $f_R$  é aparentemente o mecanismo mais econômico de elevação na  $\dot{V}_G$ , desde que o custo energético desse processo é normalmente muito mais alto em teleósteos do que a ventilação pulmonar em animais de respiração aérea (DEJOURS, 1981). Para Rantin et al. (1992), a conservação de uma velocidade de contração muscular seria energeticamente mais econômica, ao passo que uma frequência de contração mais alta estaria limitada tanto pela alta viscosidade interna do músculo como da água.

Durante a normóxia até a tensão de 60 mmHg, os valores da  $\dot{V}_G$  de ambos os grupos experimentais não diferiram de forma significativa entre si, provavelmente devido a elevada  $f_R$  e a manutenção do  $V_T$  no grupo exposto ao  $HgCl_2$  nessas tensões de  $O_2$ . Entretanto, nas menores  $P_{in}O_2$  estudadas (40 e 20 mmHg) foram registrados valores significativamente menores da  $\dot{V}_G$  no grupo  $HgCl_2$  do que aqueles exibidos pelos peixes do grupo Ct, representando um decréscimo de 36 e 55%, respectivamente, na capacidade de elevar a ventilação branquial. A redução da magnitude do aumento da  $\dot{V}_G$  induzida pela exposição ao  $HgCl_2$  foi acompanhada por decréscimos na magnitude do aumento tanto da  $f_R$  quanto do  $V_T$ . Nas tensões de  $O_2$  de 40 e 20 mmHg, as diminuições na  $f_R$  em relação ao grupo Ct ficaram em torno de 11 e 23%, respectivamente, enquanto que as reduções no  $V_T$  foram de 31 e 44%, respectivamente. As diferenças nas magnitudes das reduções da  $f_R$  e  $V_T$  foram refletidas na análise two-way que evidenciou um efeito da hipóxia, independentemente da presença de  $HgCl_2$  na água, em aumentar

a  $\dot{V}_G$ , a  $f_R$  e o  $V_T$  a partir de 80 mmHg e um efeito do  $HgCl_2$ , independentemente dos níveis de  $O_2$  na água, em reduzir a  $\dot{V}_G$  e o  $V_T$  mas não a  $f_R$ . Adicionalmente, houve interações significativas entre os fatores hipóxia e  $HgCl_2$  para os três parâmetros, ou seja, a exposição ao  $HgCl_2$  impediu aumentos a níveis controles em tais parâmetros na hipóxia severa. Dessa forma, próximo a  $P_cO_2$  determinada para os matrinxãs expostos ao  $HgCl_2$ , houve uma completa ruptura nos mecanismos compensatórios que, em situações controle, são normalmente acionados na tentativa de manter a  $\dot{V}O_2$  e a  $EO_2$  constantes. Portanto, a exposição ao  $HgCl_2$  impossibilitou o desenvolvimento normal das respostas respiratórias, reduzindo a amplitude destas. Segundo Hochachka (1980), o aumento na taxa de ventilação e/ou débito (volume) ventilatório, como sendo uma das primeiras respostas fisiológicas à hipóxia ambiental, é efetivo apenas até que o custo de energia para a ventilação das brânquias seja menor do que os benefícios derivados dela. A partir desse ponto, a ventilação branquial pode ser reduzida, assumindo valores baixos, o que compromete os mecanismos homeostáticos de resposta à hipóxia.

A redução da  $\dot{V}_G$  nos peixes expostos ao  $HgCl_2$  a partir de 40 mmHg provavelmente foi decorrente da passagem da hiperventilação para hipoventilação nessa tensão de  $O_2$ . Segundo Di Giulio & Hinton (2008), a ventilação branquial é realizada utilizando-se um sistema de bomba de duas bombas. A primeira envolve a sucção gerada pela abertura opercular que faz com que a água entre na cavidade bucal. A segunda utiliza a pressão gerada pelos músculos que envolvem a cavidade bucal para forçar a água pelas brânquias. Apesar dos ajustes na  $\dot{V}_G$  dependerem do comportamento da  $f_R$  e do  $V_T$ , a passagem de uma hiperventilação para a hipoventilação observada na tensão de  $O_2$  de 40 mmHg nos matrinxãs expostos ao  $HgCl_2$  pode ter contribuído para a redução do próprio  $V_T$  em hipóxia severa, uma vez que não foram observadas alterações significativas na PIB e na PIO durante a hipóxia, conforme discutido posteriormente.

Há um acoplamento mecânico estreito entre os movimentos das cavidades bucal e opercular (BALLINTIJIN, 1972). Os ossos operculares se articulam com o hiomandibular que faz parte do complexo palatino, de tal forma que, quando o opérculo se abre, há o abaixamento do assoalho bucal. A estimulação elétrica do músculo levantador opercular resulta, simultaneamente, na abertura do opérculo e no abaixamento da mandíbula (BALLINTIJIN, 1969). Assim, nos matrinxãs expostos ao  $HgCl_2$ , a queda da  $f_R$  na tensão de  $O_2$  de 40 mmHg, resultou tanto em um menor volume quanto em uma menor velocidade de água passando pelas brânquias. A exposição aguda a poluentes pode causar edema e descolamento do epitélio branquial que pode ser acompanhada por uma hipersecreção de muco (Di GIULIO & HINTON, 2008). Essas alterações aumentam a barreira de difusão do  $O_2$  água-sangue levando a hipoxemia o que acaba por conduzir a elevações na  $f_R$  e  $V_T$  para manter o consumo de  $O_2$  (SELLERS et al., 1975). Gehrke (1988) mostrou que após 3 horas de exposição a 10 e 20  $mg.L^{-1}$  de zinco houve aumentos



significativos da  $f_R$  de percas (*Leiopotherapon unicolor*). Assim, a hiperventilação apresentada pelo matrinxãs expostos ao  $HgCl_2$  em normóxia até a tensão de  $O_2$  de 60 mmHg pode ter sido desencadeada por um possível quadro de hipoxemia causado pelo aumento da produção de muco e/ou alterações no transporte do  $O_2$ .

Nos matrinxãs contaminados foi observado muco nas brânquias em pequenas quantidades, porém não existe muco visível presente normalmente nos matrinxãs controles. Corroborando os resultados do presente trabalho, Prasad (1994) observou que, após 24 horas de exposição a 0,1 ppm de  $HgCl_2$ , o “catfish”, *Heteropneustes fossilis*, apresentou um revestimento fino de muco nas brânquias. O aumento da secreção de muco tem por finalidade diminuir a difusão do agente tóxico do meio para o sangue, porém a barreira criada dificulta a entrada de  $O_2$ , resultando em hipóxia tecidual (HANDY et al., 1989). De acordo com Perry (1998) a hiperventilação reduz o impacto de uma barreira de difusão mais espessa reduzindo a extensão do comprometimento do sistema respiratório e mantendo e/ou prevenindo alterações severas na pressão de  $O_2$  arterial. Entretanto, essa hiperventilação não foi mantida em hipóxia severa o que pode ser o reflexo da exaustão do metabolismo muscular em manter uma  $f_R$  elevada. Conforme discutido no capítulo IV, a exposição aguda a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $HgCl_2$  induziu estresse oxidativo no músculo branco de matrinxã, caracterizado por elevações significativas na peroxidação lipídica e protéica e nos níveis de GSSG e reduções no conteúdo de GSH e na razão GSH:GSSG.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo que tem como funções a manutenção da atividade celular, a desintoxicação de compostos xenobióticos e a ação contra radicais livres (COMPORTI et al., 1991). De acordo com revisão feita por Silveira et al. (2008), há evidências de que a GSH é um dos principais antioxidantes do tecido muscular esquelético exercendo função vital na manutenção do estado redox intracelular durante a contração e protegendo este tecido contra o ataque oxidativo imposto pela elevada taxa metabólica durante o exercício. Esta função é especialmente importante durante a atividade muscular extenuante onde a produção de espécies reativas de oxigênio é substancialmente aumentada na medida em que o processo de fadiga aproxima-se (JUDEL, 2006; REID et al., 1992). Em adição, várias proteínas incluindo quinases, fatores de transcrição e enzimas possuem propriedades redox sensitivas em resíduos de cisteína ricos em grupos tióis (PACKER, 2000; SEN, 2000; SEN & UNGVARI et al., 2006). Assim, o desequilíbrio redox ( $\downarrow$  GSH:GSSG) gerado pelo estabelecimento do estresse oxidativo induzido pela exposição ao  $HgCl_2$  pode ter diminuído a performance dos músculos respiratórios do matrinxã de tal forma que abaixo da tensão de  $O_2$  de 60 mmHg a musculatura não suportou manter os elevados batimentos operculares. Por outro lado, a ação direta do metal também pode ter prejudicado a função dos músculos ventilatórios. No músculo esquelético, o mercúrio é capaz de promover desorganização das miofibrilas, redução no número de mitocôndrias, proliferação intersticial de fibroblastos e degeneração (CINCA et al., 1980; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2008).

#### 4.1.3 Extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ )

A EO<sub>2</sub> de aproximadamente 55% obtida em normóxia para *B. amazonicus* é relativamente baixa quando comparada a outras espécies de peixes, como a tilápia-do-nilo, o tambaqui, o pacu, o curimatá, a traíra e carpas, que exibem valores de EO<sub>2</sub> em torno de 70 % (CORRÊA, 1996; FERNANDES et al., 1995; KALININ et al., 1996; MATTIAS et al., 1996; SAUNDERS, 1962; GUERRA, 1992). Por outro lado, esse valor é compatível com aqueles apresentados pelos atuns *K. pelamis* e *T. albacares*, para os quais foi observada uma EO<sub>2</sub> de aproximadamente 55% em normóxia. Os matrinxãs do grupo Ct mantiveram uma EO<sub>2</sub> constante até a tensão de O<sub>2</sub> de 40 mmHg. Um aumento na ventilação enquanto simultaneamente a EO<sub>2</sub> é mantida constante, constitui uma das compensações mais efetivas durante reduções na PO<sub>2</sub> ambiental (STEFFENSEN et al., 1982). Conforme observado no presente estudo, um aumento muito elevado da  $\dot{V}_G$  ocasionou uma diminuição na eficiência das trocas gasosas na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> testada. Isso ocorre devido ao possível desvio de uma parte do volume ventilado para a área respiratória e/ou à diminuição do tempo de difusão do O<sub>2</sub> em decorrência de um aumento na velocidade da água (HUGHES & SAUNDERS, 1970).

Por outro lado, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> fez com que a EO<sub>2</sub> sofresse uma queda significativa já na tensão de O<sub>2</sub> de 60 mmHg fazendo com que seus valores se tornassem significativamente inferiores aqueles exibidos pelos controles nas tensões de 60 e 40 mmHg. A ausência de diferenças significativas na EO<sub>2</sub> de 140 (normóxia) até 80 mmHg entre os grupos Ct e HgCl<sub>2</sub>, sugere, em um primeiro momento, ausência de lesões branquiais que comprometessem as trocas gasosas ou uma recuperação das patologias após 96 horas de exposição conforme apontado por Oliveira Ribeiro et al. (2002) e discutido anteriormente. Não se pode descartar a possibilidade de que lesões branquiais tenham sido induzidas pelo HgCl<sub>2</sub> e tenham contribuído para antecipar a queda da EO<sub>2</sub> no decorrer da hipóxia gradual. Conforme discutido no capítulo IV, as brânquias dos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram altos níveis de peroxidação lipídica e oxidação protéica que conduzem à lesão tecidual a qual, segundo Smith (1995), é caracterizada por qualquer alteração que deprecie a viabilidade ou a função essencial do órgão sem a presença necessariamente de lesões histopatológicas.

Satchell (1991) reuniu os mecanismos fisiológicos e bioquímicos adotados pelos teleósteos durante a hipóxia ambiental, para maximizar a tomada de O<sub>2</sub> e minimizar seu gasto, em três categorias: (a) respostas reflexas desencadeadas pela estimulação dos quimiorreceptores de O<sub>2</sub>, como: hiperventilação branquial, bradicardia, sincronismo cardio-respiratório e constrição dos vasos sanguíneos periféricos; (b) respostas intrínsecas dos vasos branquiais, modificando o padrão de fluxo sanguíneo nas brânquias, podendo aumentar a espessura da lâmina de sangue no interior das lamelas branquiais e, conseqüentemente, causar um aumento na área disponível

para a troca gasosa em cada lamela individual e recrutar lamelas adicionais e (c) respostas desencadeadas pela ativação, via estresse hipóxico, dos centros autonômicos que regulam a liberação de catecolaminas no sangue pelos tecidos cromafins. As catecolaminas, por sua vez, podem evocar respostas tais como mudanças adicionais no padrão do fluxo de sangue nas brânquias e na condutância difusiva de O<sub>2</sub>, regulação da tomada de O<sub>2</sub> pelos eritrócitos, proteção da musculatura cardíaca contra acidificação e aumento nos níveis sanguíneos de glicose compensando, em parte, a passagem de metabolismo aeróbico para glicolítico próximo a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>.

A exposição ao HgCl<sub>2</sub> representa uma situação de estresse adicional ao estresse hipóxico ao longo do período experimental e, dessa forma, os níveis de epinefrina e catecolaminas nos matrinxãs expostos ao metal podem ser superiores aqueles exibidos pelos animais controles. A tomada de O<sub>2</sub> pelas brânquias é principalmente determinada pela área de superfície funcional respiratória, a qual pode ser aumentada pela epinefrina que promove vasodilatação (McKIM et al., 1987). Isso poderia explicar a ausência de diferenças na EO<sub>2</sub> entre o grupos Ct e HgCl<sub>2</sub> nas tensões de O<sub>2</sub> de 140 a 80 mmHg, mesmo na presença de possíveis lesões branquiais induzidas pelo metal. Nesse sentido, Oliveira Ribeiro e colaboradores (2002) mostraram que no peixe “arctic char” (*Salvelinus alpinus*) a exposição aquosa a 15 µg.L<sup>-1</sup> de Hg<sup>2+</sup> por 96 h induziu hipertrofia da glândula interrenal responsável pela secreção de corticóides.

A  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  é uma ferramenta útil para analisar as trocas gasosas. Aumentos neste parâmetro significam que uma maior quantidade de água deve passar pelas brânquias para que a mesma quantidade de O<sub>2</sub> seja obtida (KALININ, 1996). A baixa EO<sub>2</sub> exibida por *B. amazonicus* foi acompanhada por moderados valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  ( $\cong 400 \text{ mLH}_2\text{O.mLO}_2^{-1}$ ). Elevados valores EO<sub>2</sub> resultam em uma menor  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ , o que é energeticamente menos caro, além de oferecer um grande potencial de aumento compensatório na ventilação durante a hipóxia (KERSTENS et al., 1979). Assim espécies tolerantes a hipóxia exibem baixos valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ . Os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  obtidos para *B. amazonicus* em normóxia são semelhantes àqueles apresentados por *Carassius auratus* (360 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>; DEJOURS et al., 1968) e por *Piaractus mesopotamicus* (455 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>; GUERRA, 1992). No presente estudo, ambos os grupos experimentais apresentaram aumentos significativos na  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  (~ 20 vezes) na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> estudada (20 mmHg) em relação a normóxia, não havendo diferenças entre eles, indicando que a exposição ao HgCl<sub>2</sub> não afetou a eficácia na tomada de O<sub>2</sub> pelas brânquias. A  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  manteve-se constante até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 80 mmHg, indicando uma moderada eficiência da superfície respiratória funcional nas trocas gasosas quando comparada a outras espécies que conseguem manter a  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  constante dentro de um amplo intervalo de P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> como observado em tilápia-do-Nilo (KALININ, 1996), e traíra (presente estudo, capítulo IX).

A análise ANOVA two-way indicou que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do  $\text{HgCl}_2$  na água, em elevar a  $\dot{V}\text{O}_2$  e a  $\dot{V}_G/\dot{V}\text{O}_2$  a partir da tensão de 60 mmHg, sem que haja um efeito apenas do fator  $\text{HgCl}_2$ , independentemente dos níveis de  $\text{O}_2$  na água ou uma interação significativa entre os fatores  $\text{HgCl}_2$  e hipóxia. Dessa forma, pode-se inferir que o efeito do estresse hipóxico parece se sobrepôr ao efeito do  $\text{HgCl}_2$  que por sua vez, parece ter reduzido o limiar de compensação dos peixes desencadeando o colapso dos mecanismos homeostáticos compensatórios em tensões de  $\text{O}_2$  mais elevadas.

#### 4.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO)

Os peixes são capazes de manter a tomada de  $\text{O}_2$  constante durante a hipóxia aquática através do aumento da ventilação branquial, causado pelo aumento na frequência e/ou no volume respiratório (SMITH & JONES, 1982). O trabalho da musculatura ventilatória geralmente é refletido por elevações na PIB e PIO ao longo da hipóxia, como observado para tambaqui, *C. macropomum* (CÔRREA, 1996), tilápia-do-Nilo, *O. niloticus* (KALININ, 1996) e traíra (presente estudo, capítulo IX). Entretanto, em relação à normóxia, os matrinxãs do grupo Ct apresentaram reduções significativas nos valores da PIB a partir da tensão de 40 mmHg. O decréscimo da PIB em hipóxia severa provavelmente é o resultado da tendência da espécie em praticar a ventilação “ram”. Em seu ambiente natural, o matrinxã pode lançar mão da chamada “ram ventilation”, que consiste na passagem forçada de água pelas brânquias, posicionando-se contra a corrente, ou nadando com a boca parcialmente aberta, o que melhoraria a eficiência da ventilação a um menor custo energético (RANDALL, 1982). Este tipo de mecanismo foi observado em várias espécies de teleósteos como a cavala do Atlântico, *Scomber scomber* (HALL, 1930), as rêmoras *Remora remora* (STRASBOURG, 1957) e *Echeneis naucrates* (STEFFENSEN & LOMHOLT, 1983), e o salmão “sockeye”, *Oncorhynchus nerka* (SMITH et al., 1967), entre outros.

A ventilação “ram” não é restrita aos peixes pelágicos grandes que nadam rapidamente. Muitos peixes respiram por bombeamento a velocidade baixa e passam para ventilação “ram” a velocidades mais altas. A passagem para ventilação “ram” não significa que as brânquias sejam ventiladas sem custo; isso apenas significa que o trabalho da respiração é transferido dos músculos das bombas operculares para os músculos natatórios do corpo e da cauda (STEFFENSEN, 1985). A boca aberta faz com que a força de arrasto aumente, o que deve ser compensado por um maior trabalho muscular. Contudo o fluxo contínuo durante a ventilação “ram” é mais econômico do ponto de vista energético que o bombeamento opercular no ritmo elevado necessário para a natação rápida (SCHMIDT-NIELSEN, 2000).

Peixes que praticam a ventilação do tipo “ram” podem apresentar um custo muito menor da  $\dot{V}_G$  (MUIR & BUCKLEY, 1967). A rêmora, *E. naucrates*, por exemplo, numa velocidade acima de 60 cm/s regula o seu  $V_T$  pela alteração da abertura da sua boca. BROWN & MUIR (1970), calcularam que o custo da ventilação “ram” em atum é de aproximadamente 1-3% da  $\dot{V}_G$ . No presente estudo, os altos valores da  $\dot{V}_G$  apresentados por *B. amazonicus* durante a hipóxia (~ 7430 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) sugerem que a espécie não consegue manter um alto volume de ventilação a baixos custos, necessitando alocar uma maior quantidade de energia no processo da ventilação. Isso reforça a suposição que esta espécie deva lançar mão da ventilação do tipo “ram” durante os longos percursos migratórios. Durante a ventilação “ram”, os músculos respiratórios não estão relaxados, mas tonicamente ativos e a amplitude bucal continuamente ajustada, embora o gasto energético desses movimentos seja provavelmente insignificante (STEFFENSEN & LOMHOLT, 1983; STEFFENSEN, 1985).

Em hipóxia severa a estratégia de *B. amazonicus* em apresentar uma tentativa de ventilação “ram” abrindo a boca e levando a redução da PIB foi capaz de manter um elevado  $V_T$  favorecendo a manutenção do consumo de O<sub>2</sub> e da  $\dot{V}_G$ . Cabe ressaltar que os matrinxãs como se encontravam dentro de um respirômetro não utilizaram a natação para sustentar a ventilação “ram”, apenas abriram a boca, mantendo os batimentos operculares e, conseqüentemente a PIO. O respirômetro de fluxo constante é uma câmara com duas aberturas, uma de entrada de água para onde fica voltada a boca do animal e a outra de saída conectada ao controlador de fluxo. Dessa forma, cria-se uma corrente de água bem na direção da cavidade bucal do peixe. Em espécies que praticam ventilação “ram” esse fluxo de água pode favorecer esse tipo de modalidade ventilatória, pois o animal, mesmo não podendo nadar, utiliza dessa correnteza para ventilar as próprias brânquias em situações de hipóxia severa economizando energia dessa forma. Se houvesse um flanco na abertura de entrada do respirômetro que fizesse a água entrar de forma dispersa talvez essa transição para a ventilação “ram” exibida pelos matrinxãs controles não tivesse sido desencadeada. Segundo Dejours (1981), a influência da  $P_{in}O_2$  na transição para a ventilação “ram”, bem como sobre a amplitude bucal durante a ventilação “ram” sugere que o controle dessa modalidade de ventilação faz parte integrante do sistema de controle da ventilação branquial ativo, que é principalmente baseado em um mecanismo de detecção de O<sub>2</sub>. Entretanto, não se pode descartar o papel de mecanorreceptores na passagem da ventilação normal para a do tipo “ram” (STEFFENSEN, 1985).

Além da tendência da ventilação “ram”, os matrinxãs apresentaram edema labial após terem sido submetidos à hipóxia severa. Alguns peixes apresentam adaptações morfológicas e/ou fisiológicas que atuam no sentido de preservar suas funções frente a condições adversas do ambiente. Dentre os exemplos mais conhecidos podemos citar o edema labial reversível em

resposta a hipóxia ambiental. Uma espécie conhecida por apresentar essa adaptação é o tambaqui, *C. macropomum*. A espécie desenvolveu uma adaptação morfológica para tirar vantagem, durante períodos hipóxicos, da camada superficial da água mais oxigenada, através da ASR (“aquatic surface respiration”). Para tanto o tambaqui apresenta formação temporária de edema labial na mandíbula inferior, cuja finalidade é uma melhor hidrodinâmica na captação da água mais oxigenada da fina camada superficial (FLORINDO, 2002). As observações do presente estudo sugerem que o matrinxã apresente a mesma adaptação do tambaqui, embora em menor proporção. A ASR é um dos principais meios pelos quais muitos peixes sobrevivem durante períodos prolongados de hipóxia aquática (LEWIS, 1970). O uso da película superficial da água relativamente rica em O<sub>2</sub>, sob condições de hipóxia extrema, pode ser o fenômeno mais amplamente observado nas espécies de peixes tropicais de água doce que não apresentam adaptações respiratórias auxiliares (KRAMER & McCLURE, 1982).

Segundo Winemiller (1989) 14 espécies de caraciformes sul-americanos desenvolvem protuberância da hipoderme do lábio inferior durante períodos de hipóxia extrema. O inchaço labial e a ASR em outras espécies do gênero *Brycon* também foram relatadas (BRAUM & JUNK, 1982; BRAUM, 1983). De acordo com Florindo (2002), o edema labial em tambaqui não está sob o controle dos quimiorreceptores de O<sub>2</sub> localizados nas brânquias e cavidade orobranquial, pois a denervação bilateral dos nervos branquiais e da cavidade orobranquial não eliminou essa resposta. É provável, assim, que o inchaço do lábio inferior seja um evento local ainda desconhecido induzido pela hipóxia severa.

No presente estudo, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> fez com que os matrinxãs apresentassem valores de PIB em média 37% inferiores aqueles exibidos pelos controles entre as tensões O<sub>2</sub> de 140 a 60 mmHg. Assim, nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>, o gasto energético empregado na tentativa de acionar mecanismos compensatórios para manter a taxa metabólica a níveis controle, como a manutenção da PIB, não foi suportado. Os matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram como estratégia a hiperventilação exibindo menores valores de PIB em comparação ao controles. Os menores valores de PIB aliados a hiperventilação foram suficientes em manter a  $\dot{V}_G$  e o  $V_T$  a níveis controles. Esses menores valores de PIB pode ser o resultado, em parte, da exaustão da musculatura ventilatória induzida pelo HgCl<sub>2</sub> via estresse oxidativo e desequilíbrio redox conforme discutido anteriormente. Isso foi corroborado pela análise de variância ANOVA two-way mostrou que há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e HgCl<sub>2</sub> nos valores da PIB, ou seja, o padrão de comportamento da PIB frente à hipóxia gradual é dependente da exposição ao HgCl<sub>2</sub>.

Do ponto de vista energético, um aumento na  $f_R$  e a manutenção do  $V_T$  é mais custoso. Entretanto, o contato direto do HgCl<sub>2</sub> com o epitélio branquial pode ter desencadeado um alto grau de irritabilidade e a estratégia de hiperventilação pode ser vista como um mecanismo

mais eficiente e rápido de remover o agente agressor (De BOECK et al., 2001). Nesse sentido, a tendência de ventilação do tipo “ram” não foi exibida pelos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  provavelmente por esses animais já apresentarem uma menor PIB desde de a normóxia (140 mmHg), preferindo ter como estratégia frente a exposição a manutenção da boca relativamente aberta com concomitantes elevações no número de batimentos operculares. Tal estratégia não foi capaz de manter a  $\dot{V}\text{O}_2$  e a  $\text{EO}_2$  até a tensão hipóxica máxima alcançada pelos controles. Existem relações entre a morfologia e o tamanho da cabeça dos animais que podem causar diferenças na velocidade da água que passa pelas lamelas (LAUDER, 1984). É possível que a própria cavidade bucal do matrinxã, por seu reduzido tamanho, não apresente a plasticidade de aumentar o seu volume frente à exposição ao  $\text{HgCl}_2$  a ponto de aumentar o  $V_T$ . A análise two-way também indicou que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do  $\text{HgCl}_2$  na água, e um efeito do  $\text{HgCl}_2$ , independentemente da hipóxia, em diminuir a PIB. Por outro lado, nenhuma dessas alterações foi verificada para a PIO que se manteve inalterada entre e em ambos os grupos experimentais ao longo da hipóxia gradual.

## 4.2 Caracterização Eletrocardiográfica

### 4.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ )

A  $f_H$  média de *B. amazonicus* em normóxia manteve-se em cerca de 65 bpm e está acima da observada para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (50 bpm; RANTIN et al., 1998) e a traíra (55 bpm, presente estudo, capítulo IX). Entretanto, espécies ativas exibem valores de  $f_H$  mais elevados como o dourado, *Salminus maxillosus*, que apresentou valores de  $f_H$  em torno de 97 bpm em normóxia (SOUZA et al., 2001). A  $f_H$  em teleósteos é determinada pelo ritmo intrínseco do marca-passo sinoatrial, estando envolvidos nesta regulação as próprias células marca-passo, hormônios e fibras nervosas colinérgicas e adrenérgicas (FARRELL & JONES, 1992). A princípio, alterações na  $f_H$  induzidas pela exposição a xenobióticos podem ser produzidas por alteração da regulação humoral e neural da atividade do marca-passo. Normalmente, o coração de peixes está sob controle parassimpático e a liberação contínua de acetilcolina (ACh) nos terminais colinérgicos nervosos mantém a  $f_H$  *in vivo* menor que a frequência de despolarização intrínseca das células marca-passo (SAITO, 1973). Assim, o estímulo do sistema simpático na  $f_H$  de peixes é, geralmente, muito mais fraco em relação ao efeito inibitório colinérgico (CAMERON, 1979).

O controle da  $f_H$  também é evidente durante a hipóxia, onde a resposta usual a esta alteração ambiental corresponde a uma bradicardia acompanhada de um aumento do volume

sistólico (ALTIMIRAS et al., 1995). Nos matrinxãs do grupo controle essa bradicardia se manifestou a partir da tensão de  $O_2$  de 40 mmHg. A bradicardia tem sido considerada como sendo um mecanismo reflexo de compensação à hipoxia em teleósteos (FARRELL, 2007). Como o débito cardíaco é mantido, a bradicardia hipóxica é interpretada como uma forma de aumentar o tempo de residência do sangue tanto nas lamelas secundárias (possibilitando maior captação de  $O_2$  da corrente ventilatória) quanto no miocárdio (possibilitando um maior tempo para tomada de  $O_2$  pelo mesmo). Tal fato é possibilitado por dois efeitos: (a) aumento do recrutamento lamelar, causado por hipertensão acompanhada de bradicardia e (b) adequada relação ventilação-perfusão (SATCHELL, 1991; ALTIMIRAS et al., 1995).

A exposição ao  $HgCl_2$  fez com que a bradicardia se iniciasse muito antes, já na tensão de 80 mmHg, e fosse mais pronunciada, de modo que os valores de  $f_H$  exibidos abaixo dessa tensão foram significativamente inferiores aos do grupo Ct nas mesmas tensões. O músculo branco e o coração parecem ser os tecidos mais sensíveis aos danos oxidativos induzidos pelo  $HgCl_2$  em matrinxã, apresentando sinais de perdas na homeostase redox, com diminuição na relação GSH:GSSG ou tendência a diminuição, com aumentos significativos no conteúdo de GSSG, além do aumento da peroxidação lipídica e protéica (ver detalhes em capítulo IV). As principais causas dessas diferenças poderiam ser atribuídas a diferentes taxas de geração das ERO e a diferentes potenciais antioxidantes dos tecidos (FATIMA et al., 2000).

De acordo com Taylor & Shappel (1995), alterações bioquímicas induzidas por isquemia ou xenobióticos levam à verdadeira necrose do miócito e incluem quedas nos níveis celulares de ATP, diminuição da atividade das ATPases da membrana responsáveis pela manutenção das concentrações de íons intracelulares e modificações na permeabilidade da membrana como o resultado de processos oxidativos. O acúmulo de  $Na^+$  em consequência da permeabilidade aumentada da membrana e a atividade diminuída da  $Na^+K^+$ -ATPase é acompanhado por aumentos do  $Ca^{2+}$  intracelular, devido a um declínio na troca  $Na^+/Ca^{2+}$ . O acúmulo de  $Ca^{2+}$  intracelular produz alterações citoesqueléticas pela ativação de fosfolipases e proteases que resultam em lesão celular irreversível. O declínio e/ou oxidação no conteúdo sulfidrílico leva a redução da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase, cuja atividade depende de certos grupos SH essenciais e pode ser inibida por agentes de ligação às sulfidrilas (TRIMM et al., 1986).

É descrito na literatura que na musculatura de peixes o mercúrio se liga diretamente a grupos tióis e que o metal se encontra predominantemente associado a fração protéica do tecido (BALSHAW et al., 2006; NAKAO et al., 2007). Portanto, a regulação redox das  $Ca^{2+}$ -ATPases no retículo sarcoplasmático e membrana plasmática, fornece um possível mecanismo pelo qual o estresse oxidativo poderia afetar adversamente a viabilidade do miócito e a função do coração. Adicionalmente, o aumento da oxidação das proteínas contráteis pode prejudicar a maquinaria contrátil (TOWBIN & BOWLES, 2001). Dessa forma, no presente estudo, o estresse oxidativo



induzido pela exposição ao  $\text{HgCl}_2$  pode ter se somado aos impactos negativos de uma possível isquemia miocárdica resultante da hipóxia gradual contribuindo para a redução quase linear da  $f_H$  dos matrinxãs com a diminuição da  $P_{\text{inO}_2}$ . Isso foi corroborado pela análise de variância ANOVA two-way que mostrou que há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e  $\text{HgCl}_2$  para este parâmetro, além de ter indicado que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do  $\text{HgCl}_2$  na água, em reduzir os valores de  $f_H$ . Assim, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  altera o padrão de resposta da  $f_H$  frente à hipóxia, fazendo com que a bradicardia reflexa fosse mais precoce e intensa. A análise two-way indicou ainda um efeito do  $\text{HgCl}_2$ , independentemente dos níveis de  $\text{O}_2$  na água, bem como um efeito da hipóxia, independentemente da presença do metal na água, em reduzir a  $f_H$ .

Cabe ressaltar o efeito que o  $\text{HgCl}_2$  pode ter diretamente nos mecanismos contráteis do coração, o que pode ter contribuído para uma bradicardia mais acentuada frente à hipóxia severa. Conforme detalhadamente discutido no capítulo VI, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  induziu uma redução de cerca de 50 % na força de contração cardíaca de matrinxã. Rhee & Choi (1989) estudando os efeitos do Hg sobre de corações isolados perfundidos de coelhos evidenciaram que a ação do metal mais pronunciada foi a de reduzir a pressão sanguínea. Os autores sugerem que esse efeito cardiodepressor do Hg primeiramente se dá por sua ação direta no músculo cardíaco e depois por sua capacidade de alterar da atividade simpática. Moreira-Rodrigues et al. (2010) verificaram que injeções subcutâneas de  $1\text{mg.kg}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  induziram disfunções cardíacas em ratos. Esses animais apresentaram falha sistólica com diminuição da taxa de pressão máxima do ventrículo esquerdo e redução do encurtamento e da fração de ejeção.

Na literatura é descrito que os efeitos cardiovasculares tóxicos do Hg são decorrentes de sua ação direta no músculo cardíaco ou indiretamente por seus efeitos no controle neural da função cardíaca (EPA, 1997). Assim, não se pode excluir a possibilidade de que o  $\text{HgCl}_2$  tenha aumentado a sensibilidade do ramo cardíaco do nervo vago de modo a pronunciar a bradicardia reflexa durante a hipóxia gradual. A irritabilidade do nervo vago pelo mercúrio levando a inibição da atividade cardíaca foi apontada por Salant & Brodman (1929). Kostial & Landeka (1975) também sugeriram que o Hg age nas terminações nervosas produzindo liberação de acetilcolina. Por outro lado o Hg é capaz de inibir a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Suresh et al. (1992) evidenciaram que a exposição a  $0,1\text{ mg.L}^{-1}$  de Hg inorgânico durante 1, 15 e 30 dias induziu supressão da atividade da AChE em brânquias, fígado, músculo e cérebro de carpa com concomitante acúmulo de acetilcolina nesses tecidos. Frasco e colaboradores (2007) também demonstraram que o  $\text{HgCl}_2$  é capaz de inibir diversas acetilcolinesterases através de agregação e desnaturação protéicas.

De acordo com Vosyliene et al. (2003), prejuízos no trabalho cardíaco, a redução da taxa de batimento cardíaco e a redução na ventilação podem induzir distúrbios no suprimento

de O<sub>2</sub> para os tecidos e, como conseqüências negativas, há diminuição das atividades natatória e alimentar, dos processos metabólicos e da taxa de crescimento. Alterações em tais parâmetros podem levar à diminuição da biomassa dos peixes além de aumentar as chances de se tornarem presas mais fáceis aos predadores, levando em última análise à redução populacional.

#### 4.2.2 Análises eletrocardiográficas

Em peixes, os eventos elétricos cardíacos obtidos por eletrocardiografia apresentam os mesmos eventos conhecidos para o eletrocardiograma (ECG) de mamífero, ou seja, a onda P que representa despolarização atrial, o complexo QRS que indica a despolarização do ventrículo e a onda T que corresponde à repolarização ventricular (SATCHELL, 1991). No presente estudo, *B. amazonicus* exibiu, em normóxia, durações das ondas P, QRS e T de 42, 66 e 167 ms, respectivamente. Em mamíferos, as durações das ondas P, complexo QRS e onda T não ultrapassam 110, 100 e 150 ms (GUYTON & HALL, 2002).

Os peixes apresentam padrões eletrocardiográficos difíceis de serem estabelecidos, mesmo utilizando-se várias derivações, pois apresentam diversidade anatômica e pouca informação sobre os locais corretos de implantação dos eletrodos. Um exame multidirecional da atividade cardíaca do animal, usando-se várias derivações eletrocardiográficas, permite uma análise detalhada da atividade elétrica cardíaca, suficiente para detectar cada componente das ondas do ECG e estabelecer os eixos elétricos do coração (YOSHIKAWA et al., 1988). Segundo Rantin e colaboradores (1995), as avaliações com relação à frequência cardíaca, débito cardíaco e força de contração miocárdica não são suficientes para caracterizar as condições fisiológicas do coração dos peixes. Mas de acordo com Glass et al. (1991) e Rantin et al. (1993), o uso de uma simples derivação pode fornecer importantes informações sobre a função cardíaca, desde que o procedimento seja bem padronizado para a espécie em estudo.

Nos matrinxãs do grupo Ct, a hipóxia provocou reduções no intervalo P-R (tempo de condução átrio-ventricular), na amplitude da onda P (despolarização atrial) e no QTc (repolarização atrial e despolarização ventricular corrigido pela raiz quadrada do intervalo R-R) concomitantemente com elevações na duração da onda T (repolarização ventricular), no intervalo R-R (ritmo cardíaco) e nas amplitudes da onda T e do complexo QRS (despolarização ventricular). Assim, em matrinxã, a hipóxia, por si mesma, provoca mudanças na condução do estímulo responsável pelas contrações atriais e ventriculares. Em peixes a hipóxia gradual geralmente provoca um aumento do intervalo R-R devido ao desenvolvimento da bradicardia reflexa com aumento do tônus colinérgico, conforme observado para os matrinxãs do presente estudo e discutido anteriormente. Conseqüentemente, houve uma redução do QTc, já que o intervalo Q-T não apresentou alteração significativa no decorrer da hipóxia gradual e o QTc é função inversa da

raiz quadrada do intervalo R-R. Durante a bradicardia, a acetilcolina liberada nas terminações do vago aumenta acentuadamente a permeabilidade ao  $K^+$ , permitindo rápido vazamento deste íon para o exterior. Isso conduz a hiperpolarização dos tecidos excitáveis, fazendo com que fiquem muito menos excitáveis e o vazamento interno de  $Na^+$  necessita de muito mais tempo para alcançar o potencial limiar para a excitação, o que diminui intensamente a frequência da ritmicidade dessas fibras lentificando a  $f_H$  (GUYTON & HALL, 2002).

Em relação ao intervalo P-R, que demonstra o tempo de condução elétrica átrio-ventricular, a redução ao longo da hipóxia gradual pode ser decorrente do aumento da liberação de catecolaminas frente ao estresse hipóxico (REID et al., 1998). As catecolaminas aceleram a despolarização das células do nodo sino-atrial, aumentando o automatismo destes sítios (GIZZI, 1997). O aumento do tônus simpático pode contribuir para alterações eletrofisiológicas no miocárdio (LIU & LI, 2005).

Em *B. amazonicus*, a hipóxia produziu aumentos nas amplitudes da onda T e do complexo QRS nas tensões de  $O_2$  de 40 e 20 mmHg e redução da amplitude da onda P em 20 mmHg. Essas alterações nos registros eletrocardiográficos seriam decorrentes da falta de um suprimento adequado de  $O_2$  ao miocárdio, devido à redução do consumo de  $O_2$  apresentado por matrinxã durante a hipóxia severa. Se a condução do impulso se torna irregular devido a bloqueios pequenos, múltiplos e locais, na condução dos impulsos, haverá variações na voltagem e desvios do eixo (GUYTON & HALL, 2002). Desse modo, um aporte inadequado de  $O_2$  pode causar disfunção no grupo específico de miócitos responsáveis por coordenar o início da despolarização ou repolarização e acionar outras regiões do miocárdio (GUERRA, 1997). Isso poderá levar alterações na morfologia e amplitude das ondas.

Segundo Chapovetsky & Katz (2003), a amplitude do complexo QRS em sapos depende do número de células funcionalmente ativas e capazes de transmitir o sinal elétrico. De acordo com Mourad (1990), é bem estabelecido que a bradicardia vagal é acompanhada por um aumento do potencial de ação (P.A.) elétrico ventricular com redução da onda P atrial, o que indica um prejuízo da condução internodal e um aumento do tempo diastólico. Em miócitos cardíacos isolados, a hipóxia aumenta a frequência de abertura dos canais de  $Na^+$  amplificando a corrente desse íon (JU et al., 1996). Um P.A. mais intenso em hipóxia severa poderia aumentar a amplitude do complexo QRS, como observado nos matrinxãs do presente estudo nas tensões de  $O_2$  de 40 e 20 mmHg. Além disso, conforme relatado por Kishimoto et al. (2008), a amplitude do QRS aumenta durante a miocardite em decorrência de um edema intramiocárdico ou lesões miocárdicas precoces. A presença de tais lesões não podem ser descartas no coração dos matrinxãs submetidos à hipóxia severa.

A hipóxia em teleósteos causa um aumento da amplitude de onda T (Labat, 1966 *apud* Aissaoui et al., 1998), conforme observado para matrinxãs. De forma semelhante,

exemplares de tambaqui, *Colossoma macropomum*, apresentaram alterações significativas na amplitude e, conseqüentemente, na área da onda T em hipóxia severa (CORREA, 1996). A isquemia miocárdica pode afetar a morfologia da onda T em uma variedade de formas: as ondas T podem se tornar altas, achatadas, invertidas, ou bifásicas (CHANNER & MORRIS, 2002). Em matrinxã, a onda T bifásica teve sua amplitude aumentada, principalmente em hipóxia severa. No presente estudo, o aumento na amplitude da onda T foi acompanhada por um aumento na sua duração na tensão de O<sub>2</sub> de 20 mmHg. Dessa forma, a hipóxia severa aumenta o tempo de repolarização ventricular e as fibras ventriculares demoram mais para relaxar. As alterações eletrofisiológicas durante a isquêmica promovem um atraso no início da repolarização ventricular e o prolongamento deste processo, que se fará de forma lenta, aumentando a duração da sístole elétrica (GOLDWASSER, 2002).

Nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> todas essas alterações também foram observadas com exceção do intervalo P-R, que não apresentou diferenças em seus valores ao longo da hipóxia. Adicionalmente, nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub>, a hipóxia severa induziu elevações na duração da onda P, nos intervalos R-R, Q-T e J-T e no segmento S-T. A análise de variância ANOVA two-way mostrou que há um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do HgCl<sub>2</sub> na água, em reduzir os valores do QTc e da amplitude da onda P e aumentar os intervalos R-R, Q-T, J-T e as amplitudes de T e do complexo QRS. Assim, tais alterações seriam decorrentes exclusivamente da falta de um suprimento adequado de O<sub>2</sub> ao miocárdio ou de efeitos secundários desencadeados pela hipóxia gradual. Mais uma vez os resultados do presente estudo apontam para uma possível diminuição, induzida pela exposição ao HgCl<sub>2</sub>, dos limiares de compensação e crítico em matrinxãs também em relação aos parâmetros eletrocardiográficos analisados. Um aumento na duração da onda P representaria um maior tempo para a despolarização atrial. Assim, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> prejudicou o sistema de condução atrial a partir da tensão de O<sub>2</sub> de 60 mmHg.

Na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> o HgCl<sub>2</sub> promoveu prolongamentos do intervalo Q-T (V<sub>APD</sub> - duração da despolarização e repolarização ventricular) e do segmento S-T (platô do P.A.) que não foram observados nos controles. A V<sub>APD</sub> corresponde à somatória do complexo QRS (despolarização dos ventrículos), do segmento S-T (que corresponde ao fim da onda S até o início da onda T) e da onda T (repolarização ventricular). Como não foram identificadas alterações na duração do complexo QRS ao longo da hipóxia gradual no grupo HgCl<sub>2</sub>, o aumento da V<sub>APD</sub> resultou do retardo na repolarização ventricular e do aumento do platô do P.A. ventricular. A falta de O<sub>2</sub> no músculo cardíaco deprime seu metabolismo e, conseqüentemente, dificulta a repolarização ventricular. A repolarização da membrana não ocorre nas áreas de isquemia miocárdica grave (GUYTON & HALL, 2002). Por outro lado, comparando-se ambos os grupos experimentais, os matrinxãs expostos ainda exibiram valores significativamente superiores do intervalo P-R e do

segmento S-T e valores inferiores de duração da onda T em todas as tensões de O<sub>2</sub> analisadas. Conforme revelado pela análise ANOVA two-way, a exposição ao HgCl<sub>2</sub>, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água, promoveu aumentos na duração dos intervalos R-R, P-R e Q-T e do segmento S-T com concomitante redução na duração da onda T. Não foram identificadas interações significativas entre os fatores hipóxia e HgCl<sub>2</sub> para nenhum dos parâmetros eletrocardiográficos analisados sugerindo que as alterações foram decorrentes exclusivamente do suprimento inadequado de O<sub>2</sub> ao miocárdio ou do efeito direto do HgCl<sub>2</sub> nos miócitos.

Conforme demonstrado no capítulo VI, o HgCl<sub>2</sub> prejudicou a função do RS dos miócitos de matrinxã causando um possível vazamento de Ca<sup>2+</sup> do interior dessa organela. Como o HgCl<sub>2</sub> é capaz de depletar os estoques de Ca<sup>2+</sup>, pode haver uma diminuição no acoplamento elétrico atribuído ao aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular que afeta, por sua vez, as junções “gap” promovendo o fechamento destas. Isso poderia resultar em um prolongando o segmento S-T e o intervalo P-R observados no presente estudo. De acordo com revisão feita por Viken et al. (2010), o Hg inorgânico e o MeHg é capaz de afetar negativamente o funcionamento das junções “gap”.

Quando o intervalo P-R (A<sub>APD</sub>) está prolongado e a excitação dos ventrículos ainda é produzida diz-se que há um bloqueio incompleto cardíaco de primeiro grau (GUYTON & HALL, 2002). Assim o bloqueio de primeiro grau é definido como um retardo da condução do átrio para o ventrículo, sem verdadeiro bloqueio na condução. Assim, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> provocou uma baixa velocidade de condução do átrio até o ventrículo do matrinxã. Outro indicativo de bloqueio átrio ventricular nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> foi o aparecimento de ondas de despolarizações atriais (ondas P) sucessivas entre duas despolarizações ventriculares (complexo QRS) quando os peixes foram submetidos à hipóxia severa. Em revisão feita por Vassalo (1996) sobre as ações tóxicas agudas do Hg sobre o aparelho cardiovascular, corações isolados de rato perfundidos pela técnica de Langendorff exibiram na presença do Hg atividade espontânea e redução da frequência acompanhada de aumento do tempo de condução atrioventricular (aumento do intervalo P-R). Também foram relatadas arritmias de diversos tipos (extra-sístoles, taqui e bradicardias, bloqueios A-V de diversos graus e fibrilação ventricular). Nas maiores concentrações de Hg (10µM) os autores ainda relataram uma dissociação átrio-ventricular com aparecimento de aumento da frequência atrial, enquanto que a frequência ventricular permanecia reduzida.

Esses achados corroboram os resultados obtidos no presente estudo, onde extra-sístoles foram muito mais freqüentes nos matrinxãs expostos ao HgCl<sub>2</sub> na hipóxia severa. Glass et al. (1991) utilizando-se da mesma técnica empregada no presente estudo observou que em carpa, *C. carpio*, a bradicardia hipóxica foi acompanhada de inversões na onda T e extra-sístoles ventriculares. De acordo com Guyton & Hall (2002), muitas das contrações ventriculares prematuras resultam de sinais reentrantes, que se originam em torno dos limites de áreas cardíacas isquêmicas. Além disso, a irritação tóxica do nodo átrio-ventricular ou miocárdio

provocada por drogas podem causar as extra-sístoles. Segundo Massaroni et al. (1995) essas arritmias provocadas pelo  $\text{HgCl}_2$  no coração de rato estão relacionadas à ação do metal em deprimir a corrente de  $\text{Na}^+$ , a atividade do retículo sarcoplasmático e da bomba de  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase. Adicionalmente, as tiras cardíacas isoladas do coração de matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  apresentaram muitas contrações espontâneas quando estimuladas numa frequência sub-fisiológica (capítulo VI) o que aponta para um efeito do metal nas células marca-passos espalhadas pelo ventrículo alterando o limiar do potencial das mesmas. Vale ressaltar que a exata localização do marca-passo no coração de peixes é espécie-dependente, mas a presença do nodo sino-atrial e do átrio-ventricular nesses animais é bem conhecida (RANTIN et al., 1995). Feixes de condução rápida como as fibras de Purkinje e o feixe de Hiss não foram identificados histologicamente em peixes, mas podem estar presentes desde que a excitação segue os mesmos caminhos dentro do ventrículo (SATCHELL, 1991).

Os matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  apresentaram valores médios do segmento S-T significativamente superiores aos do grupo controle. Entretanto, houve encurtamento na duração da onda T e nenhuma alteração dos intervalos J-T e Q-T sugerindo um alargamento da fase inicial de repolarização ventricular e um encurtamento da fase final desta repolarização. Segundo DRIEDZIC & GESSER (1994), um P.A. mais duradouro resulta na manutenção de um potencial de membrana positivo e, conseqüentemente, na maior permanência dos canais de cálcio voltagem-dependentes no estado aberto. Há evidências de o Hg aumenta a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L por sua ação direta em grupamentos sulfidrilas (-SH) no interior do canal (ROSSI et al., 1993) ou via produção de ERO que são capazes de oxidar esses canais (HOOL, 2007). Conforme discutido detalhadamente no capítulo IV, o protocolo do pós-pausa na presença de rianodina, sugeriu um aumento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L induzido pelo  $\text{HgCl}_2$  no miocárdio dos matrinxãs. Mesmo com uma possível entrada maior de  $\text{Ca}^{2+}$ , evidenciada pelo alargamento do platô do P.A., nenhuma alteração na força de contração e nos parâmetros tempo-dependentes foi observada possivelmente devido aos outros efeitos induzidos pelo  $\text{HgCl}_2$  como a redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou a redução da atividade da ATPase miosínica, conforme discutido no capítulo VI. Por outro lado, o  $\text{HgCl}_2$  facilitou a repolarização ventricular possivelmente por aumentar a condutância dos canais de  $\text{K}^+$ . Segundo Jungwirth et al. (1991) o Hg aumenta a condutância da membrana celular ao íon  $\text{K}^+$ .

## 5. CONCLUSÕES

Os efeitos do  $\text{HgCl}_2$  sobre a função cardio-respiratória de *B. amazonicus* são sumarizados no esquema proposto na figura 27.

A exposição por 96 horas a concentração nominal e sub-letal de  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  foi capaz de promover, em normóxia, hiperventilação e redução da PIB além de um prejuízo na condução elétrica, causando um bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau e prolongando o platô do P.A. do músculo cardíaco, impossibilitando, assim, o funcionamento normal da bomba cardíaca. O  $\text{HgCl}_2$  ainda foi capaz de modular o padrão de resposta das variáveis cardio-respiratórias frente à hipóxia gradual, tornando a espécie, que é pouco tolerante a hipóxia, mais susceptível. Os matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$  foram incapazes de elevar a níveis controle a  $\dot{V}_G$  e o  $V_T$  em hipóxia severa reduzindo consideravelmente a magnitude do aumento desses parâmetros ao exibirem hipoventilação nas tensões de  $\text{O}_2$  de 40 e 20 mmHg. Dessa forma, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  impossibilitou a manutenção de uma resposta ventilatória normal frente à hipóxia. O  $\text{HgCl}_2$  ainda elevou em mais de 100% o valor da tensão crítica de  $\text{O}_2$  e reduziu a capacidade de manter a taxa metabólica, a extração de  $\text{O}_2$  e a frequência cardíaca constantes até as tensões de  $\text{O}_2$  alcançadas pelos matrinxãs controles.

A exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  prejudicou a função cárdio-respiratória de matrinxã reduzindo seus limiares de compensação e crítico frente à hipóxia, o que pode diminuir as chances de sobrevivência da espécie, principalmente na época reprodutiva. Apesar de *B. amazonicus* viver em águas rápidas e bem oxigenadas, é uma espécie reofílica e os mecanismos compensatórios frente à hipóxia podem ser fundamentais durante o período reprodutivo, no qual esses animais deparam com ambientes de oxigenação bastante variável, em direção a cabeceira dos rios. Cabe ressaltar que, somente com o processo de migração os matrinxãs conseguem atingir o amadurecimento das gônadas. Dessa forma, a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , por evocar respostas cardio-respiratórias como hiperventilação e bradicardia hipóxica procuciada já na tensão de  $\text{O}_2$  de 80 mmHg ( $\sim 4,20 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ), pode reduzir a disponibilidade de energia que seria despendida no amadurecimento gonadal.

Adicionalmente, todas as medidas foram realizadas com o peixe em repouso. Portanto, é esperado que os efeitos negativos do  $\text{HgCl}_2$  nos ajustes cardio-respiratórios devem ser muito mais pronunciados quando o animal está em seu ambiente natural, nadando ativamente, como é o padrão característico do matrinxã. Assim, a mais alta  $P_{\text{cO}_2}$ , a bradicardia precoce, a incapacidade de manter elevações na  $\dot{V}_G$ , na  $f_R$  e no  $V_T$  frente a hipóxia severa devem ser agravados ou mais pronunciados durante a performance natatória, de forma que, o matrinxã provavelmente vai ter muita dificuldade em aumentar a taxa metabólica para acompanhar o aumento da demanda energética em exercício, conforme foi evidenciado em *L. cephalus* coletados de rios impactados por metais pesados de acordo com o trabalho de McKenzie e colaboradores (2007) anteriormente citado.

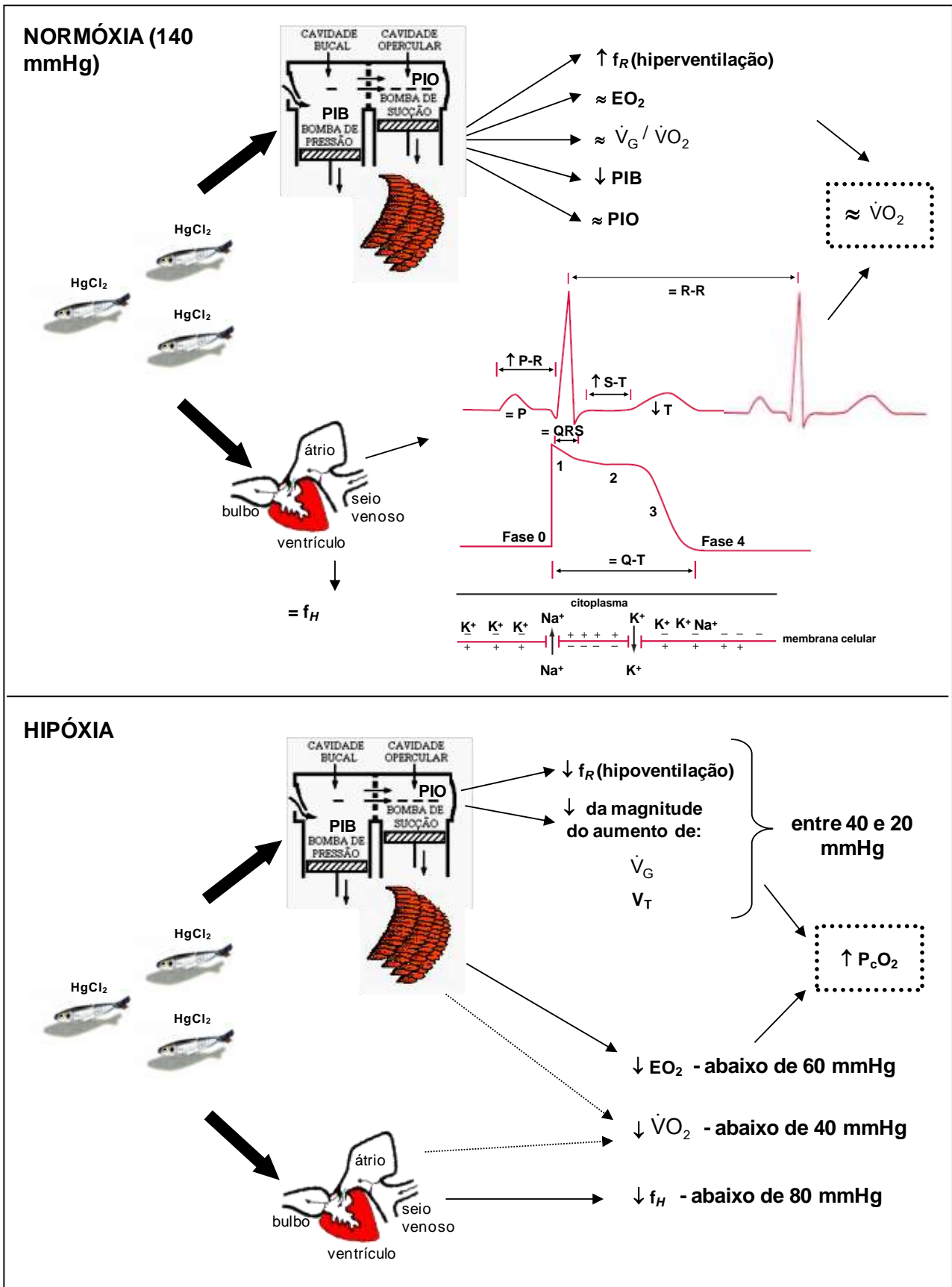
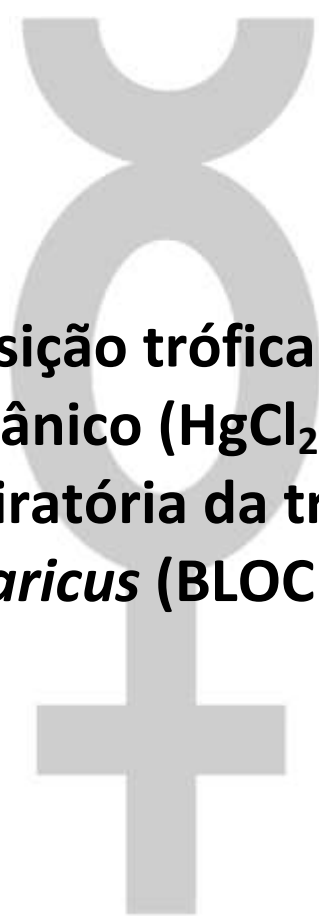


Figura 27 - Diagrama ilustrativo dos efeitos da exposição a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 horas sobre o sistema cardio-respiratório de matrinxã, *B. amazonicus*.



## CAPÍTULO IX

**Efeitos da exposição trófica e sub-crônica ao mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre a função cárdio-respiratória da traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**



## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao mercúrio (Hg), através da dieta, sobre as respostas cárdio-respiratórias à hipóxia gradual em traíra, *Hoplias malabaricus*. Exemplares adultos de ambos os sexos, foram divididos em 2 grupos (n=12). Um dos grupos foi utilizado como controle e o outro foi exposto ao Hg via alimento. A exposição ao Hg, foi realizada por meio de uma dieta contendo exemplares vivos pequenos (~ 6 g) de matrinxãs (*Brycon amazonicus*) que foram expostos por 96 h a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> em sistema estático. A contaminação trófica foi realizada durante um período de 30 dias, correspondendo a 10 doses (4 matrinxãs/traíra a cada 96 h, correspondendo a 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup>). Os animais controle foram alimentados na mesma proporção com matrinxãs não expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Em normóxia (140 mmHg) e nas subseqüentes tensões de O<sub>2</sub> hipóxicas de 120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg foram feitas as determinações dos seguintes parâmetros cárdio-respiratórios: taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ), tensão crítica de O<sub>2</sub> (P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>), ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), freqüência respiratória (f<sub>R</sub>), volume ventilatório (V<sub>T</sub>), extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>), necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), pressões intra-bucal (PIB) e intra-opercular (PIO), freqüência cardíaca (f<sub>H</sub>) e análise dos componentes do eletrocardiograma (duração e amplitude das ondas P, T e complexo QRS, duração do segmento S-T e dos intervalos P-R, R-R, Q-T e J-T). Em resposta a hipóxia severa, os peixes de ambos os grupos experimentais aumentaram a  $\dot{V}_G$ , f<sub>R</sub>,  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ , PIB, PIO e o V<sub>T</sub> e diminuíram a  $\dot{V}O_2$  e a f<sub>H</sub> (bradicardia). A exposição ao Hg promoveu: aumento da P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> de 21 para 41 mmHg; hipoventilação com redução da f<sub>R</sub> em todas as tensões de O<sub>2</sub> testadas; redução da  $\dot{V}O_2$  nas tensões de 140 a 20 mmHg; diminuição da EO<sub>2</sub> nas tensões de 140 a 40 mmHg; aumento da  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  entre as tensões de 140 a 60 mmHg; aumentos da PIB e PIO e redução da f<sub>H</sub> entre as tensões de 140 a 20 mmHg. As traíras expostas ao Hg não conseguiram elevar a  $\dot{V}_G$  e o V<sub>T</sub> em resposta à hipóxia, entre as tensões de 60 a 20 mmHg, aos níveis alcançados pelos peixes do controle, além de não conseguirem manter a  $\dot{V}O_2$ , a EO<sub>2</sub> e a f<sub>H</sub> constantes até a tensão de 40 mmHg, onde tais parâmetros já apresentavam reduções significativas em relação a normóxia. O Hg ainda provocou várias alterações no eletrocardiograma dentre as quais se destacam: prejuízo na condução elétrica conforme evidenciado pelo prolongamento do intervalo P-R, caracterizando um bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau e pelos aumentos na duração da onda P e do complexo QRS fazendo com que a despolarização do átrio e do ventrículo fosse retardada; aumento do intervalo Q-T e do segmento S-T, indicando respectivamente uma maior duração da despolarização e repolarização ventricular e um maior platô do potencial de ação do músculo cardíaco e concomitante facilitação da repolarização ventricular reduzindo a duração da onda T. A análise de variância ANOVA two-way mostrou que há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg para os parâmetros  $\dot{V}O_2$ ,  $\dot{V}_G$ , V<sub>T</sub>, EO<sub>2</sub> e f<sub>H</sub>, indicando que o padrão de resposta de tais parâmetros frente à hipóxia gradual é influenciado e depende da presença do Hg na dieta. Tais resultados sugerem que a exposição trófica ao Hg prejudica a função cárdio-respiratória da traíra em normóxia e frente a hipoxia reduzindo a plasticidade exibida pela espécie em tolerar ambientes hipóxicos, o que pode limitar as chances de sobrevivência das traíras, considerando que *H. malabaricus* comumente habita águas hipóxicas e frequentemente sujeitas à contaminação mercurial.

## 1 INTRODUÇÃO

O Hg é absorvido pelos peixes através da cadeia alimentar e/ou diretamente através da água ao longo do seu ciclo de vida. A mais importante via de entrada do Hg no corpo humano é a ingestão de alimentos contaminados, em especial peixes, nos quais o metal se acumula ao longo da cadeia trófica, sendo que peixes predadores apresentam uma concentração maior que aqueles de níveis tróficos inferiores (KIDD et al., 1995; SNODGRASS et al., 2000). Estas observações fornecem evidências de biomagnificação, ou seja, aumentos incrementais na concentração de Hg com os sucessivos níveis tróficos (MIRLEAN et al., 2005).

Valores máximos de referência de Hg em peixes de águas doces não contaminadas apresentam-se abaixo de  $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$  (MALM, 1998), embora valores consideravelmente maiores tenham sido encontrados para peixes carnívoros e piscívoros. Teores de Hg total acima do limite permitido de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  para peixes carnívoros (ANVISA, 1998) vem sendo encontrados em exemplares de traíra coletados em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. A concentração de Hg em músculo de traíras variou de 0,24 a  $2,77 \text{ mg.kg}^{-1}$  na Represa Billings em São Paulo (ROCHA et al., 1985); de 0,02 a  $7,92 \text{ mg.kg}^{-1}$  nos rios Bento Gomes, Cuiabá e Paraguai no Mato-Grosso (VIEIRA, 1991) e de 0,12 a  $1,54 \text{ mg.kg}^{-1}$  no Rio Negro na Amazônia (DOREA et al., 2006).

Em mamíferos destacam-se como efeitos tóxicos do Hg sobre o sistema cardiovascular a redução da pressão arterial e da frequência cardíaca, aterosclerose da carótida, infarto do miocárdio, disfunção endotelial, atrofia e fibrose cardíacas e apoptose dos miócitos (MASSARONI et al., 1995; MOREIRA-RODRIGUES et al., 2010; ROSSONI et al., 1999; WIGGERS et al., 2008). O consumo de peixes é recomendado por diminuir os riscos de doenças coronarianas (BURR et al., 1989). No entanto, devido à contaminação dos peixes por Hg, muitos autores ponderam sobre os benefícios desse consumo. Estudos correlacionam o consumo de peixes com o aumento de incidência de infarto agudo do miocárdio e aterosclerose (KÖNIG et al., 2005; VIRTANEN et al., 2005; YOSHIZAWA et al., 2002).

Apesar do conhecimento de que Hg pode ser considerado um importante fator de risco ou um fator sinérgico para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em mamíferos, não há trabalhos na literatura que descrevam os efeitos do Hg sobre o sistema cardio-respiratório de peixes que são troficamente expostos ao metal e que, freqüentemente, são aproveitados como fonte protéica pelo homem. Dessa forma, estudos como o presente podem ajudar a elucidar não somente os efeitos nocivos do consumo de peixes contaminados pelo Hg sobre o aparelho cardiovascular humano, como também avaliar os possíveis prejuízos da exposição trófica ao Hg na saúde, sucesso e biodiversidade dos próprios peixes.

Cabe ressaltar que diferentemente do que ocorre em mamíferos, os ambientes aquáticos são tipicamente instáveis e marcados por intensas flutuações em suas propriedades físico-químicas tais como  $\text{O}_2$  dissolvido (PERRY & LAURENT, 1993), o que faz com que demanda

imposta ao sistema cardio-respiratório dos peixes varie consideravelmente, implicando em desafios múltiplos que não somente a contaminação por Hg através da dieta.

Dentre os fatores acima citados, as alterações periódicas do O<sub>2</sub> dissolvido na água têm grande impacto no grau de atividade dos peixes e, portanto, na demanda da função cardíaca e respiratória (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Isto é mais acentuado em ambientes dulciaquícolas tropicais onde variações extremas de O<sub>2</sub> ocorrem ao longo de um único dia, além do fato de que ações antrópicas, muitas vezes, produzem a hipóxia levando a diminuição da biodiversidade (CONNOLLY et al., 2004; WU et al., 2003). Outra característica peculiar e que constitui mais um desafio a ser superado pelos peixes é que o custo energético envolvido na ventilação branquial varia de 2 a 50% do consumo total de energia, dependendo da espécie e de suas características ecofisiológicas e em humanos esse valor não ultrapassa 1% em repouso (RANTIN et al., 1992). Essa diferença resulta da baixa solubilidade do O<sub>2</sub> na água e da alta viscosidade e densidade da água (DEJOURS, 1988).

A traíra, *Hoplias malabaricus*, é um peixe mais adaptado a ambientes lênticos, de pouca correnteza ou de águas paradas, normalmente sujeitas a bruscas mudanças de O<sub>2</sub>, a exemplo do que acontece na região amazônica, Pantanal Mato-grossense e nos lagos do vale do Rio Doce (KALININ, 1991). É uma espécie muito resistente a hipóxia apresentando um gasto energético associado à ventilação de 3% em normóxia e de 13% em hipóxia, valores relativamente baixos em comparação a outras espécies (RANTIN et al., 1992). A tolerância à hipóxia está correlacionada com algumas adaptações tais como: baixo metabolismo aeróbico, alta afinidade hemoglobina-oxigênio e extensa área de superfície respiratória (DRIEDZIC et al., 1978; FERNANDES et al., 1994; WOOD & LENFANT, 1979). Esta espécie, sendo ictiófaga, aparentemente não só é capaz de lidar com condições de hipóxia severa, como também está mais susceptível a contaminação, via alimento, por metais pesados como Hg, capazes de se biomagnificar ao longo da cadeia trófica, o que aproxima o presente estudo da realidade.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da contaminação alimentar por mercúrio inorgânico (HgCl<sub>2</sub>) nas variáveis respiratórias (taxa metabólica; tensão crítica de O<sub>2</sub>; ventilação branquial; necessidade ventilatória; extração de O<sub>2</sub>; frequência respiratória; volume ventilatório; pressão intra-bucal; pressão intra-opercular e ventilação total) e nos parâmetros cardíacos (frequência cardíaca; intervalo R-R; duração da onda P, complexo QRS e da onda T; intervalo P-R; intervalo Q-T; intervalo J-T; segmento S-T e amplitudes das ondas P e T) de traíra, *H. malabaricus*, tanto em normóxia (140 mmHg) como em hipóxia gradual (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Exemplares adultos e de ambos os sexos de traíra, *Hoplias malabaricus*, foram obtidos da piscicultura Parque do Lago, Dourado, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 500 litros com recirculação de água dechlorinada (pH 7,0-7,5; DO<sub>2</sub> 6,5-7,3 mg.L<sup>-1</sup>; dureza 48-56 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade 40-43 mg.L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e condutividade 120-128 μS.cm<sup>-1</sup>), aeração constante (condições normóxicas, P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 45 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante o período de aclimação, as traíras foram alimentadas com pequenos matrinxãs (4-6 cm), *Brycon amazonicus*, uma vez por semana, na proporção de 2% da biomassa, totalizando o uso cerca de 200 matrinxãs.

### 2.2 Desenho Experimental

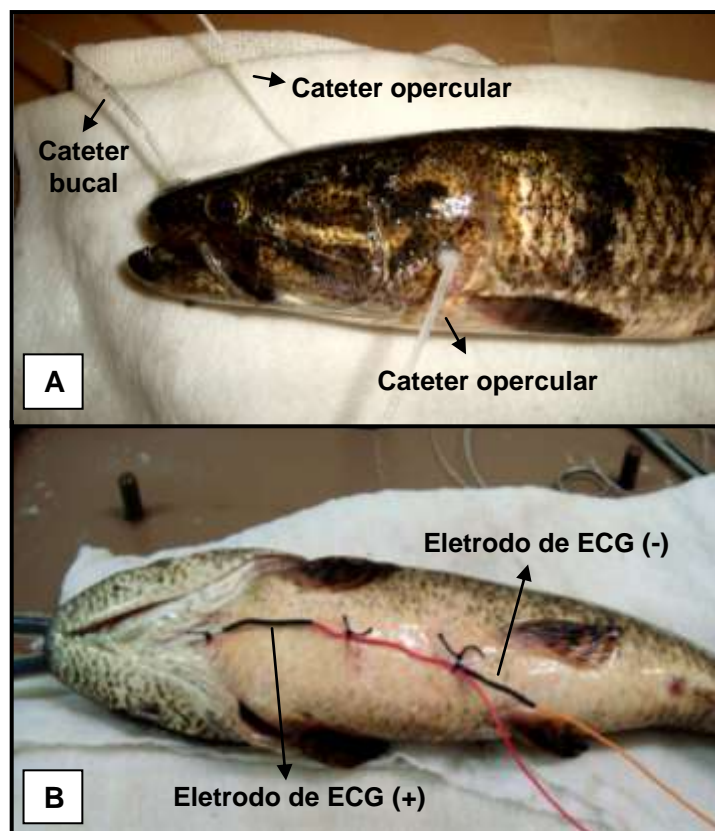
Antes do início do experimento, as traíras foram pesadas ( $W_T = 313,72 \pm 15,64$  g;  $L = 31,17 \pm 0,47$  cm) e aleatoriamente divididas em dois grupos de doze peixes cada um. Um grupo foi utilizado como controle (Ct) e o outro foi exposto ao mercúrio via alimento (Hg). A contaminação alimentar por mercúrio foi realizada utilizando exemplares vivos e pequenos (5-6 g) de matrinxãs (*B. amazonicus*) que foram expostos por 96 horas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> em sistema estático. A contaminação trófica e subcrônica foi realizada durante um período de 30 dias, correspondendo a 10 doses (4 matrinxãs/traíra, ~ 2% da biomassa.dia<sup>-1</sup>), oferecidas após um período de 96 horas de jejum. Os animais controle foram alimentados com a mesma espécie e sob tais condições, porém com exemplares não expostos ao HgCl<sub>2</sub>.

Para as 20 traíras de ambos os grupos experimentais (Ct e Hg) desse experimento, cerca de 800 exemplares vivos de pequenos matrinxãs foram utilizados na sua dieta ao longo dos 30 dias (para detalhes da exposição e da dose de HgCl<sub>2</sub> utilizada na dieta das traíras, ver Capítulo III, item 2.2.2). Nos quatro dias subseqüentes a última dose, os peixes permaneceram em jejum para evitar a regurgitação das presas e restos alimentares durante os ensaios *in vivo*, uma vez que esta espécie reage ao estresse regurgitando seu conteúdo estomacal (ZAVALA-CAMIN, 1996). Nos peixes de ambos os grupos experimentais foram avaliados parâmetros respiratórios e a atividade cardíaca em normóxia e em hipóxia gradual, conforme metodologia descrita a seguir.

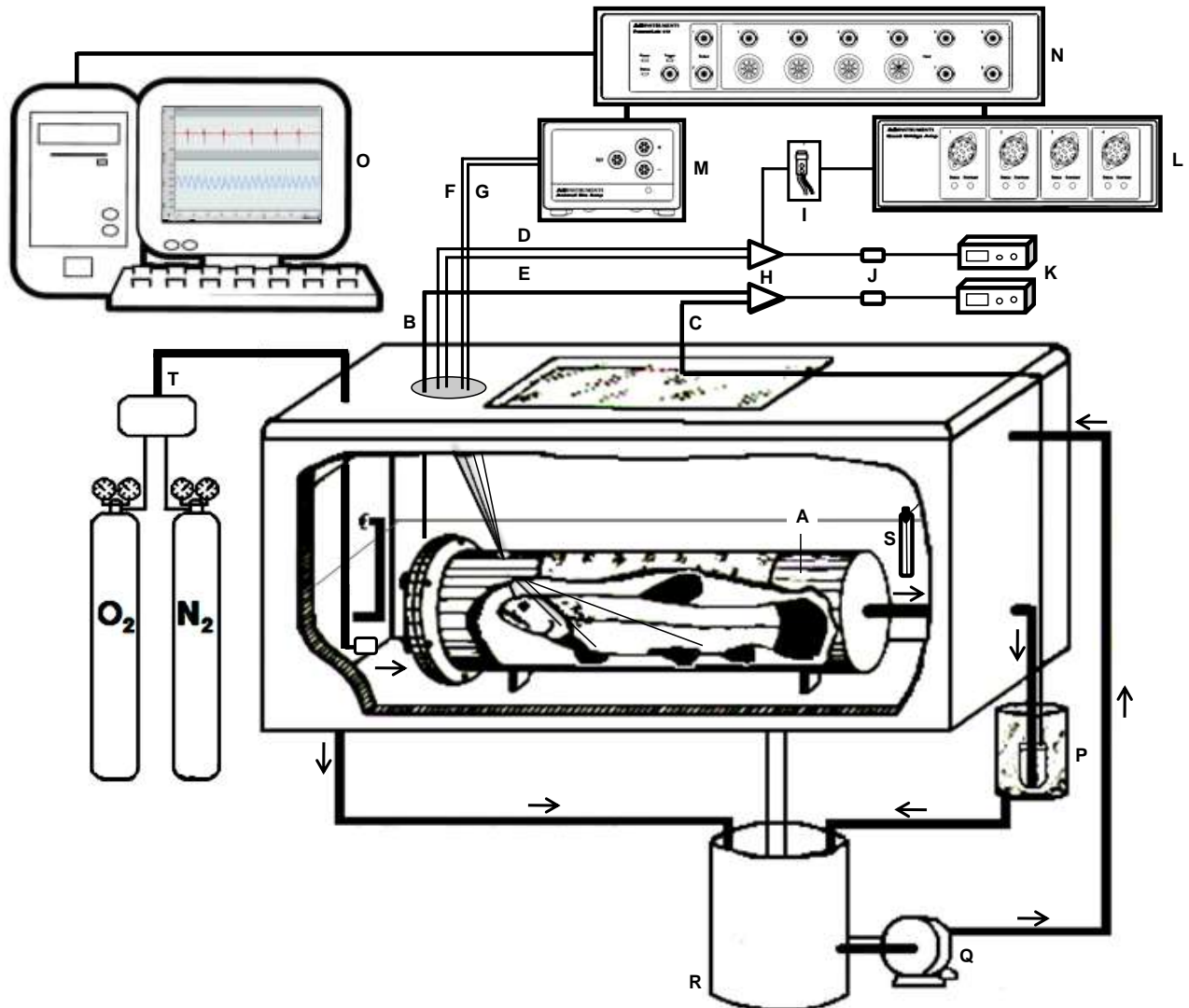
### 2.3 Preparações e Procedimentos Experimentais

As preparações empregadas para a aquisição dos parâmetros respiratórios foram baseadas nas metodologias de Hughes et al. (1983), Hughes & Saunders (1970) e Rantin et al. (1992). As preparações para obtenção dos eletrocardiogramas (ECG) foram baseadas na metodologia utilizada por Glass et al. (1991) e adaptada por Rantin et al. (1993). Todos os procedimentos experimentais bem como todos os parâmetros analisados foram minuciosamente descritos no capítulo anterior (ver Capítulo VIII, item 2.3).

Resumidamente, após a anestesia em benzocaína 0,01%, os peixes foram submetidos a uma cirurgia de implantação de cateteres de polietileno na cavidade bucal e nos opérculos e de eletrodos na região ventral do corpo para o registro do ECG (Fig. 1). Para *H. malabaricus*, o melhor sinal elétrico para o registro do ECG foi obtido posicionando-se o eletrodo positivo na região ventral exatamente onde as margens inferiores dos opérculos se unem. Após a cirurgia, os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante e imediatamente transferidos para a câmara experimental, mantida a 25°C, onde permaneceram, por um período de 12 horas, para a recuperação (Fig. 2).



**Figura 1** - Fotos mostrando em **A**: a posição de inserção dos cateteres de polietileno da boca e dos opérculos e, em **B**: os eletrodos de ECG positivo e negativo em traíra, *Hoplias malabaricus*.



**Figura 2** - Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias de *Hoplias malabaricus*. **A:** respirômetro; **B, C:** cateteres de polietileno para tomada da água que entra ( $P_{in}O_2$ ) e que sai ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, respectivamente; **D, E:** cateteres de polietileno para tomada da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ), respectivamente; **F, G:** eletrodos cardíacos positivo e negativo; **H:** torneiras de 3 vias; **I:** transdutor de pressão MLT0380/D; **J:** cuvetas termostatzadas com eletrodos de  $O_2$  FAC-001; **K:** analisadores de  $O_2$  FAC-204A; **L:** amplificador de pressão ML 224; **M:** amplificador de ECG ML 136; **N:** sistema de aquisição de dados Powerlab 8/30; **O:** computador para o registro de dados; **P:** frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; **Q:** bomba para circulação de água; **R:** balde para circulação de água; **S:** termostato para manutenção da temperatura; **T:** entrada de quantidades controladas de  $N_2$  ou ar comprimido. As setas indicam a direção do fluxo de água no sistema. (adaptado de MARICONDI-MASSARI, 1993).

Para *H. malabaricus* o fluxo do respirômetro de 3,5 L foi ajustado a uma taxa constante de 36 L.h<sup>-1</sup>, fluxo este capaz de manter a diferença de 10 a 15% entre as tensões de O<sub>2</sub> da água de entrada (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>) e de saída (P<sub>out</sub>O<sub>2</sub>) do respirômetro. Os registros cardio-respiratórios foram obtidos em normóxia (P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> ≅ 140 mmHg) e em hipóxia gradual (P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> de ≅ 120; 100; 80; 60; 40; 20 e 10 mmHg). Cada tensão de O<sub>2</sub> foi mantida por um período de 40 minutos antes de serem efetuados os registros. Diferentemente dos experimentos realizados com matrinxã, a hipóxia foi realizada até a P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> de 10 mmHg. Conforme amplamente descrito na literatura, a traíra é uma espécie resistente a baixos níveis de O<sub>2</sub> na água (FERNANDES et al., 1994; KALININ et al., 1993; SUNDIN et al., 1999).

Como detalhadamente descrito no capítulo anterior para os experimentos com matrinxã, para as traíras também foram avaliados os parâmetros respiratórios como taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$  - mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); tensão crítica de O<sub>2</sub> (P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> - mmHg); ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mL H<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>); necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  - mL H<sub>2</sub>O.mL O<sub>2</sub><sup>-1</sup>); extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub> - %); frequência respiratória (f<sub>R</sub> - ciclos respiratórios. min<sup>-1</sup>); volume ventilatório (V<sub>T</sub> - mL H<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>); pressão intra-bucal (PIB - mmHg); pressão intra-opercular (PIO - mmHg) e ventilação total (V<sub>tot</sub> - mmHg.min<sup>-1</sup>) e a atividade cardíaca através da determinação da frequência cardíaca (f<sub>H</sub> - bpm); intervalo R-R (s); duração da onda P (s); duração do complexo QRS (s); duração da onda T (s); intervalo P-R (s) também denominado A<sub>APD</sub> (duração do potencial de ação atrial); intervalo Q-T (s) também denominado V<sub>APD</sub> (potencial de ação ventricular); dispersão do intervalo Q-T, o QTc (s); intervalo J-T (s); segmento S-T (s); amplitude de P (%) e a amplitude de T (%) em cada uma das P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> testadas. Os ECGs também foram analisados para identificação de possíveis arritmias e extra-sístoles. Tais parâmetros foram determinados para ambos os grupos experimentais (Ct e Hg).

Os parâmetros descritos acima foram determinados através do monitoramento das P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> e P<sub>out</sub>O<sub>2</sub>, bem como das tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) e expirada (P<sub>e</sub>O<sub>2</sub>), conectando-se os cateteres de polietileno da boca, do opérculo e da caixa experimental a eletrodos (FAC-001, FAC, São Carlos, SP) de analisadores de O<sub>2</sub> (FAC-204A, FAC, São Carlos, SP). A f<sub>R</sub>, a PIB e a PIO foram determinadas conectando-se as cânulas implantadas na boca e no opérculo do animal a um transdutor de pressão (MLT0380/D, ADInstruments), previamente calibrado com um manômetro digital (AVS Projetos, São Paulo, SP), acoplado a um pré-amplificador (ML 224 Quad Bridge Amp, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado PowerLab (Powerlab 8/30, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). O ECG, por sua vez, foi obtido acoplado-se os eletrodos de ECG implantados no animal a um pré-amplificador (ML 136 Animal Bio Amp, ADInstruments) conectado ao mesmo sistema de aquisição e de análise de dados PowerLab. Dessa forma, foram registrados simultaneamente, em cada uma das P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> testadas, o ECG e a f<sub>R</sub> e a PIB ou o ECG e a PIO (Fig. 2).



## 2.4 Tratamento Estatístico dos Dados

Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. Os seguintes procedimentos foram adotados no presente estudo:

- Teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade foi realizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes de diferentes grupos experimentais (Ct e Hg) (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- A Análise de variância (ANOVA) one-way, complementada pelo teste de Dunnett de comparações múltiplas, para a identificação das diferenças significativas entre os valores obtidos em normóxia (140 mmHg) e os demais valores obtidos nas diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg) no decorrer da hipóxia gradual (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- Análise de variância Fatorial ou ANOVA two-way, com interação envolvendo dois critérios de classificação: oito níveis de O<sub>2</sub> na água (140, 120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg) e presença ou ausência de Hg na dieta (grupos Ct e Hg), ou seja, análise fatorial 8 x 2. A análise estatística two-way verificou se as médias dos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da presença de Hg na dieta, e as médias dos grupos experimentais (Ct e Hg), independentemente do nível de O<sub>2</sub> na água, foram ou não significativamente diferentes. Esta análise também estabeleceu se a resposta a hipóxia gradual depende da presença de Hg na dieta, uma vez que estes fatores podem ou não estar interagindo. A ANOVA two-way foi complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para a identificação das diferenças específicas, verificando a existência de possíveis interações significativas entre os valores de um mesmo nível de O<sub>2</sub> na água com os diferentes grupos experimentais ou entre diferentes níveis de O<sub>2</sub> dentro de um mesmo grupo experimental (SigmaStat v. 2.00, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

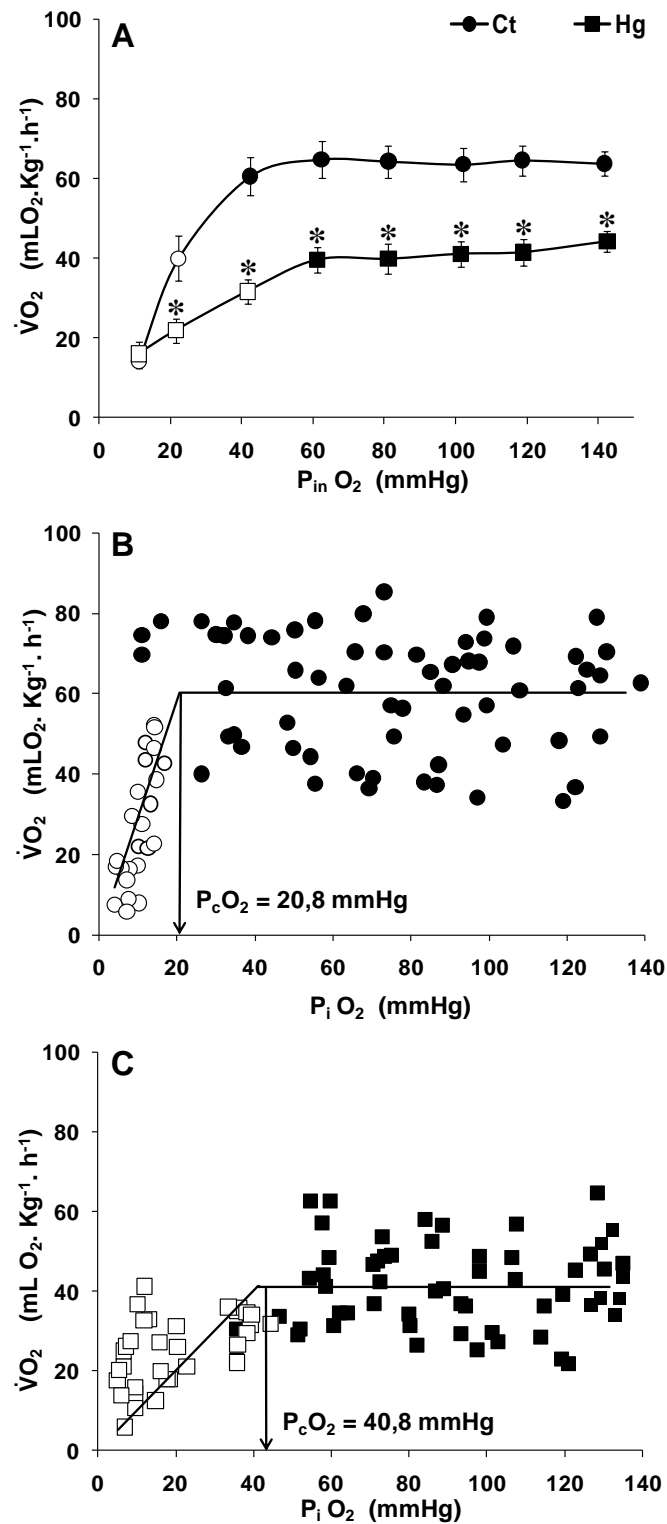
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Respostas Respiratórias

##### 3.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ )

A figura 3A ilustra os valores médios da  $\dot{V}O_2$  dos grupos Ct e Hg frente às diferentes tensões de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ). A  $\dot{V}O_2$  de *H. malabaricus* do grupo Ct manteve-se constante até a tensão de 40 mmHg, com valor médio de  $63,6 \pm 4,1$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ . Somente nas menores tensões de  $O_2$  utilizadas de 20 e 10 mmHg observou-se uma redução significativa dos valores da  $\dot{V}O_2$ , atingindo, os respectivos valores médios de  $39,9 \pm 5,6$  e  $14,1 \pm 1,6$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$  (reduções de ~ 37% e 78%, respectivamente). No grupo Hg os valores de  $\dot{V}O_2$  não apresentaram diferença significativa até a tensão de 60 mmHg, quando comparados ao valor médio observado em normóxia ( $44,2 \pm 2,7$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ ). A partir da tensão de 40 mmHg ( $31,7 \pm 1,4$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ ), os valores de  $\dot{V}O_2$  apresentaram uma redução significativa atingindo, na  $P_{in}O_2$  de 10 mmHg, o valor mínimo de  $16,0 \pm 1,9$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ , o que representa uma redução de ~ 64% em relação aos valores obtidos em normóxia. Quando comparados ambos os grupos experimentais, os valores de  $\dot{V}O_2$  do grupo exposto ao Hg apresentaram-se significativamente inferiores (de 30 a 45%) nas tensões de 140 a 20 mmHg. A análise de variância two-way dos parâmetros respiratórios (Tab. 2) indicou que houve interação significativa entre a exposição ao Hg e a hipóxia para este parâmetro, bem como um efeito de cada um dos fatores separadamente em reduzir a  $\dot{V}O_2$ , sendo que o fator hipóxia diminui a  $\dot{V}O_2$ , independentemente da presença do Hg, em 20 e 10 mmHg.

A  $P_cO_2$  determina a tensão de  $O_2$  abaixo da qual o peixe não consegue mais acionar eficientemente seus mecanismos de compensação à hipóxia e, assim, manter seu consumo de  $O_2$  constante. Para tanto, a  $P_cO_2$  foi calculada utilizando a tensão de  $O_2$  da água inspirada pelo animal ( $P_{insp}O_2$ ). As tensões médias de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ) de  $142,1 \pm 0,1$ ;  $118,8 \pm 0,9$ ;  $101,8 \pm 1,0$ ;  $81,1 \pm 0,8$ ;  $61,7 \pm 0,7$ ;  $42,0 \pm 0,6$ ;  $21,9 \pm 0,5$  e  $11,1 \pm 0,4$  mmHg resultaram, em *H. malabaricus*, nos seguintes valores médios de tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_{insp}O_2$ ):  $127,4 \pm 1,3$ ;  $101,5 \pm 1,9$ ;  $87,4 \pm 1,8$ ;  $68,8 \pm 2,1$ ;  $50,8 \pm 1,9$ ;  $33,3 \pm 1,5$ ;  $14,8 \pm 1,0$  e  $7,3 \pm 0,6$  mmHg. Para *H. malabaricus*, a  $P_cO_2$  calculada para o grupo controle foi de 20,8 mmHg (Fig. 3B) e para o grupo exposto ao Hg foi de 40,8 mmHg (Fig. 3C), cujo aumento foi de aproximadamente 96%. A análise desses resultados evidenciou que, tanto no grupo controle quanto no exposto ao Hg, a  $\dot{V}O_2$  manteve-se constante até as respectivas  $P_cO_2$ , diminuindo significativamente abaixo destas.



**Figura 3 - (A)** Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$  - mL  $O_2$   $kg^{-1}$   $h^{-1}$ ) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. **(B, C)** Efeito da redução das tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada ( $P_i O_2$ ) sobre a  $\dot{V}O_2$  dos grupos Ct e Hg, respectivamente. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05). As setas representam a  $P_c O_2$ .

### 3.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ )

Os valores médios da  $\dot{V}_G$ , da  $f_R$  e do  $V_T$  dos peixes do grupo controle (grupo Ct - dieta constituída de pequenos exemplares vivos de matrinxãs) e do grupo exposto ao mercúrio (grupo Hg - dieta constituída de pequenos exemplares vivos de matrinxãs expostos, por 96 horas, a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ ), quando submetidos à diminuição gradual da tensão de  $\text{O}_2$  da água, estão apresentados na figura 4.

A  $\dot{V}_G$  no grupo controle não apresentou diferença significativa entre os valores obtidos em normóxia ( $237,9 \pm 25,4 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) até a tensão de 80 mmHg ( $437,3 \pm 46,0 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), abaixo da qual, os valores de  $\dot{V}_G$  foram significativamente maiores quando comparados com os valores obtidos em normóxia, sendo o maior valor observado em 10 mmHg ( $2469,2 \pm 262,9 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), correspondendo a um aumento de aproximadamente 10,4 vezes neste parâmetro (Fig. 4A).

No grupo exposto ao Hg a diminuição da tensão de  $\text{O}_2$  da água provocou um aumento da  $\dot{V}_G$  a partir da  $P_{\text{inO}_2}$  de 20 mmHg, até o valor máximo de  $2544,9 \pm 425,9 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , na menor  $P_{\text{inO}_2}$  testada (10 mmHg), valor esse 11,7 vezes maior que o obtido em normóxia ( $216,7 \pm 26,4 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) (Fig. 4A).

Quando comparados ao controle, os peixes expostos ao Hg apresentaram valores de  $\dot{V}_G$  significativamente inferiores nas tensões de 60, 40 e 20 mmHg, sofrendo reduções de aproximadamente 56%, 61% e 48%, respectivamente (Fig. 4A).

A análise de variância two-way dos parâmetros respiratórios, apresentada na tabela 2, indicou que houve interação significativa entre a exposição ao Hg e a hipóxia, ou seja, as alterações na  $\dot{V}_G$  frente à hipóxia dependem da presença do Hg na dieta. Adicionalmente, o fator hipóxia aumentou significativamente a  $\dot{V}_G$  a partir da tensão de 60 mmHg, independentemente da presença do Hg na dieta. Já a presença do Hg na dieta diminuiu significativamente a  $\dot{V}_G$  independentemente dos níveis de  $\text{O}_2$  da água.

Nos peixes do grupo controle a  $f_R$  obtida em normóxia foi de  $42,0 \pm 3,4$  ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ , mantendo-se constante somente até a  $P_{\text{inO}_2}$  de 80 mmHg. Nas demais tensões, os valores de  $f_R$  foram superiores aos registrados em normóxia, atingindo um aumento de ~1,8 vezes em 20 mmHg, quando a  $P_{\text{cO}_2}$  foi atingida, e de ~1,6 vezes em hipóxia severa a 10 mmHg (Fig. 4B).

No grupo exposto ao Hg, a  $f_R$  observada em normóxia foi de  $27,0 \pm 1,8$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>. Os valores de  $f_R$  aumentaram significativamente a partir de 60 mmHg atingindo valores máximos a 10 mmHg ( $56,0 \pm 1,4$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>), valor este 2 vezes maior que o observado em normóxia (Fig. 4B).

Comparando-se os dados obtidos em ambos os grupos experimentais (Fig. 4B), observou-se que os valores de  $f_R$  apresentados pelos peixes do grupo exposto ao Hg foram significativamente inferiores aos apresentados pelo grupo controle em todas as tensões de O<sub>2</sub> aplicadas 140, 120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg (reduções de 35, 34, 32, 30, 32, 32, 27 e 16%, respectivamente).

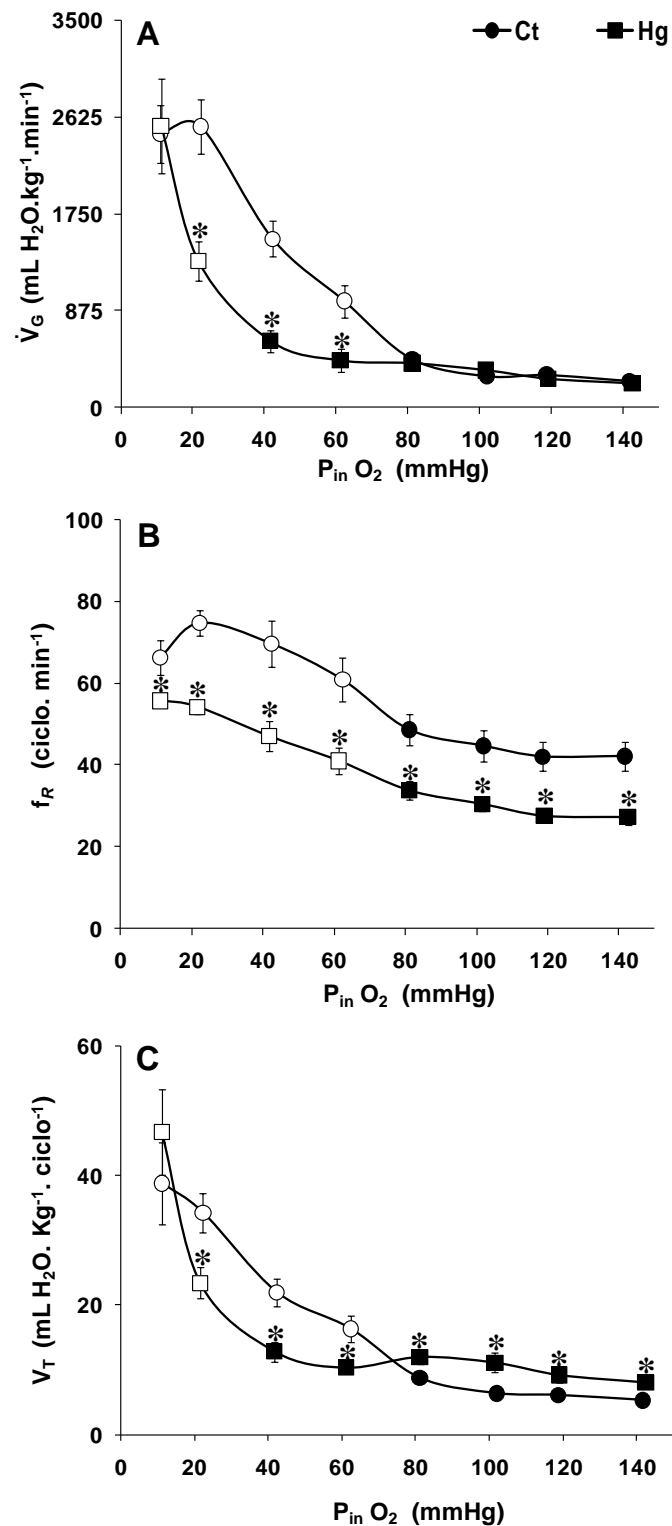
A análise de variância two-way indicou que não houve interação entre a exposição ao Hg e à hipóxia para este parâmetro (Tab. 2). O fator hipóxia aumentou significativamente a  $f_R$  a partir da tensão de 60 mmHg, independentemente da presença do Hg na dieta. Já a presença do Hg reduziu a  $f_R$ , promovendo uma hipoventilação, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> da água.

Nos peixes do grupo controle, o valor do  $V_T$  observado em normóxia foi de  $5,3 \pm 0,6$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>. Abaixo 80 mmHg, houve aumento significativo neste parâmetro sendo o maior valor observado na tensão de 10 mmHg ( $38,8 \pm 6,3$  mL H<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>), valor ~7,3 vezes maior que aqueles obtidos em normóxia (Fig. 4C).

A redução gradual da  $P_{in}O_2$  provocou um aumento significativo do  $V_T$  do grupo exposto ao Hg a partir de 20 mmHg. O valor de  $V_T$  observado em normóxia foi de  $8,0 \pm 0,8$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>. Na menor  $P_{in}O_2$  utilizada (10 mmHg), o  $V_T$  atingiu o valor máximo de  $46,7 \pm 6,6$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>, valor este 5,8 vezes maior que o obtido em normóxia (Fig. 4C).

Nas tensões de O<sub>2</sub> iniciais (140, 120, 100 e 80 mmHg), os valores de  $V_T$  obtidos para o grupo exposto ao Hg foram significativamente maiores que aqueles observados para o grupo controle, correspondendo a aumentos de aproximadamente 52, 51, 74 e 37%, respectivamente. Entretanto nas tensões de 60 a 20 mmHg, os valores de  $V_T$  obtidos para o grupo exposto ao Hg foram significativamente menores que aqueles observados para o grupo controle, correspondendo a reduções de 37, 36, 41 e 32%, respectivamente (Fig. 4C).

A análise de variância two-way indicou que houve interação significativa entre a exposição ao Hg e à hipóxia, ou seja, o comportamento da  $V_T$  em resposta à hipóxia depende da presença de Hg na dieta (Tab. 2). Adicionalmente, o fator hipóxia aumentou significativamente o  $V_T$  a partir da tensão de 60 mmHg, independentemente da presença do Hg na dieta. Já a presença do Hg, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> da água, não alterou os valores do  $V_T$ .



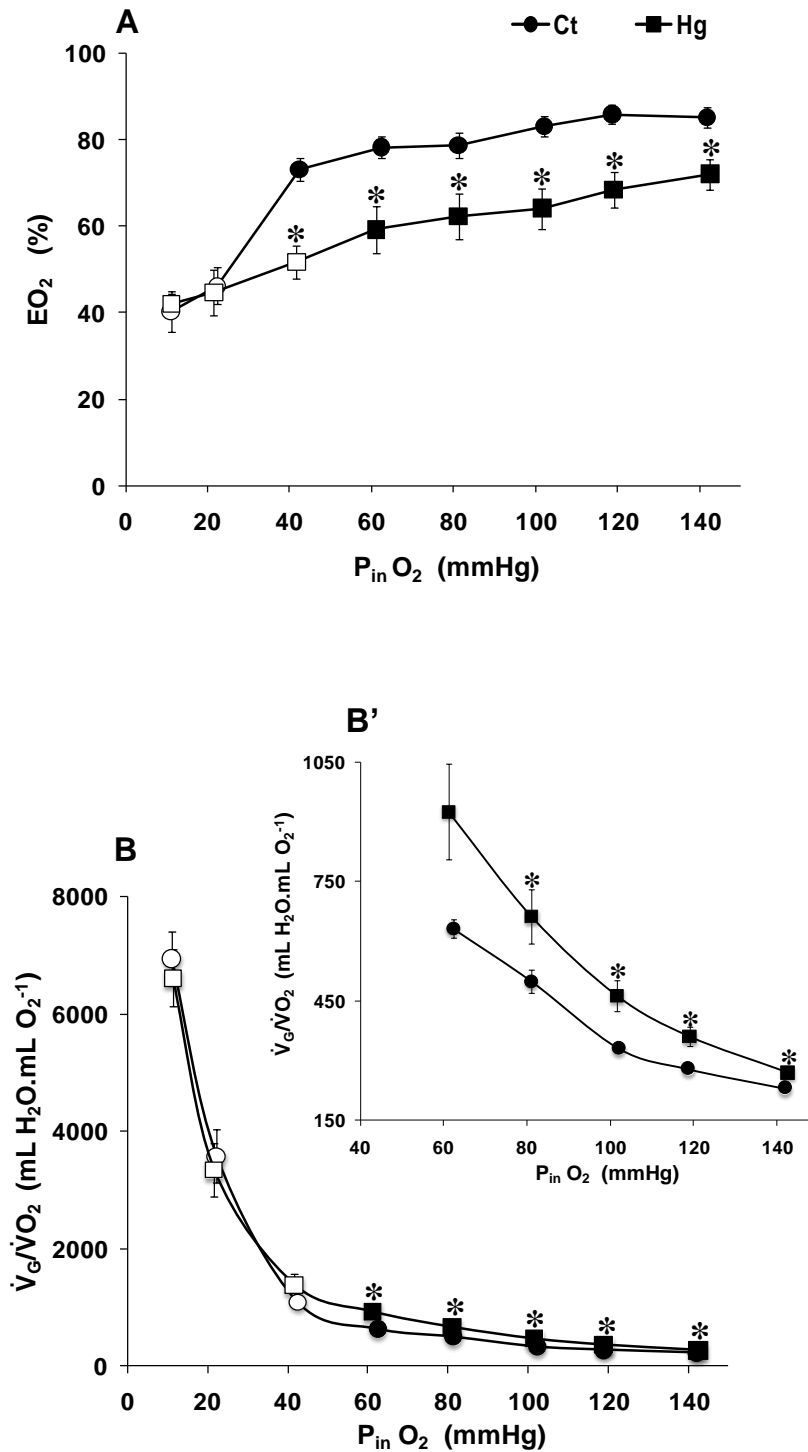
**Figura 4 - (A)** Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), **(B)** freqüência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e **(C)** ventilação total ( $V_T$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.1.3 Extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ )

Os valores médios de EO<sub>2</sub> e de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  dos grupos Ct e Hg, em resposta a diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro, estão apresentados figura 5.

Conforme observado na figura 5A, nos peixes do grupo Ct, a EO<sub>2</sub> manteve-se aproximadamente constante, em torno de 80% desde a normóxia (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> = 140 mmHg) até a tensão de 40 mmHg. Abaixo deste valor, próximo a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> (20,8 mmHg), observou-se uma redução significativa na EO<sub>2</sub>, atingindo o valor mínimo na tensão de 10 mmHg (40,3 ± 4,6 %), correspondendo a uma redução de aproximadamente 53%. Nos peixes do grupo exposto ao Hg, a EO<sub>2</sub> obtida em normóxia (72,1 ± 3,5 %) manteve-se constante até a tensão de 60 mmHg, abaixo da qual e próximo a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> (40,8 mmHg), os valores da EO<sub>2</sub> obtidos foram significativamente menores do que aqueles observados em normóxia. Os menores valores de EO<sub>2</sub> foram observados na tensão de 10 mmHg (42,0 ± 2,3 %), correspondendo a uma redução de aproximadamente 42%. Quando comparados ambos os grupos experimentais, os valores de EO<sub>2</sub> do grupo exposto ao Hg apresentaram-se significativamente inferiores (de 27 a 48%) nas tensões de 140 a 40 mmHg. A análise two-way (Tab. 2) indicou que houve interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg para a EO<sub>2</sub>. O fator hipóxia reduziu a EO<sub>2</sub> partir da tensão de 40 mmHg, independentemente da presença do Hg na dieta. Já a presença do Hg na dieta também diminuiu significativamente a EO<sub>2</sub> independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> da água.

No grupo controle, a  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  em normoxia foi de 229,8 ± 6,1 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>. Abaixo da tensão de 60 mmHg, os valores da necessidade ventilatória apresentaram um aumento significativo, atingindo o maior valor na tensão de 10 mmHg (6941,7 ± 469,4 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>), o que corresponde a um aumento de ~30,2 vezes ao valor da  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  obtido em normóxia (Fig. 5B). No grupo exposto ao Hg, aumentos significativos da  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  em relação aos valores obtidos em normóxia (270,3 ± 15,0 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) foram observados em P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> abaixo de 60 mmHg. Os maiores valores de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  foram obtidos na tensão de 10 mmHg (6611,4 ± 484,9 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>), um aumento de ~24,4 vezes aquele observado em normóxia (Fig. 5B). Nas tensões de 140, 120, 100, 80 e 60 mmHg, as médias de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  do grupo exposto ao Hg (270,3 ± 15,1; 360,6 ± 24,2; 463,4 ± 39,0; 661,5 ± 68,9 e 925,6 ± 119,8 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, respectivamente) foram significativamente superiores aos valores observados no grupo controle (229,7 ± 6,1; 278,4 ± 5,5; 330,1 ± 8,6; 498,4 ± 29,8 e 631,1 ± 23,8 mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, respectivamente). A análise two-way indicou que não houve interação entre os fatores hipóxia e Hg, sendo verificado apenas um efeito da hipóxia, independentemente da presença de Hg na dieta, em aumentar a  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  a partir de 40 mmHg (Tab. 2).



**Figura 5 - (A)** Extração de oxigênio (EO<sub>2</sub> - %) e **(B)** necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  - mLH<sub>2</sub>O.mL O<sub>2</sub><sup>-1</sup>) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. **(B')** detalhe da necessidade ventilatória entre as tensões de O<sub>2</sub> de 140 a 60 mmHg. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).



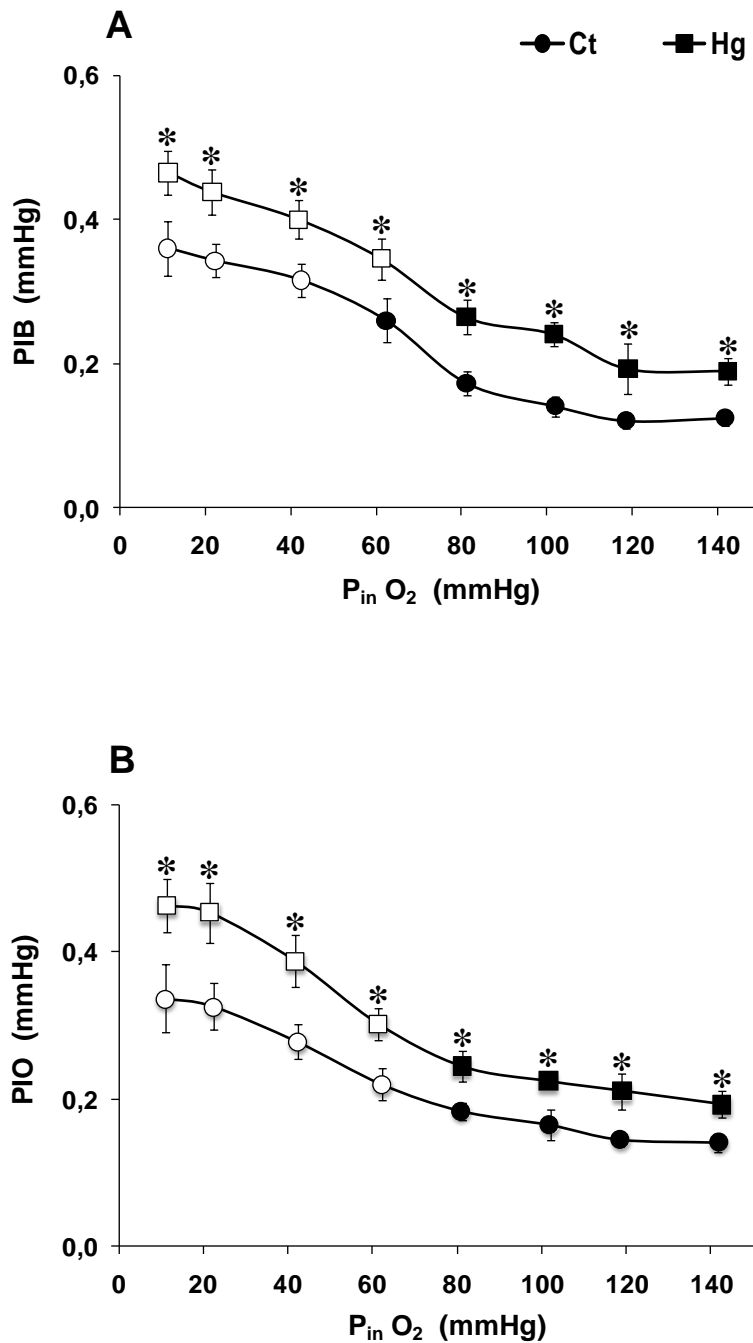
### 3.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO)

A figura 6 ilustra a PIB e PIO dos grupos Ct e Hg em função da diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>).

Houve um aumento significativo da PIB do grupo Ct a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg, partindo do valor de 0,12 ± 0,01 mmHg, observado em normóxia, até o valor máximo de 0,36 ± 0,04 mmHg, observado na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada no experimento (10 mmHg). A PIB do grupo Hg aumentou significativamente a partir de 60 mmHg, com valores normóxicos de 0,19 ± 0,02 mmHg e atingindo 0,47 ± 0,03 mmHg na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 10 mmHg, sendo que os valores deste grupo foram significativamente superiores (em média 45 %) aos do Ct em todas as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizadas (Fig. 6A).

A redução da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> provocou um aumento significativo da PIO dos grupos Ct e Hg a partir de 60 mmHg (Fig. 6B). O valor de PIO observado em normóxia foi de 0,14 ± 0,01 mmHg para o grupo Ct e de 0,19 ± 0,02 mmHg para o grupo Hg. Na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 10 mmHg, a PIO atingiu os valores máximos de 0,34 ± 0,04 e 0,46 ± 0,03 mmHg para os grupos Ct e Hg, respectivamente. Quando comparados ambos os grupos experimentais, os valores de PIO do grupo exposto ao Hg apresentaram-se significativamente superiores (em média 38%) nas tensões de 140 a 10 mmHg.

A análise de variância two-way indicou que a interação entre a exposição ao Hg e à hipóxia não foi significativa para PIB e PIO (Tab. 2), ou seja, o comportamento de tais parâmetros frente à hipóxia não depende da presença de Hg na dieta de *H. malabaricus*. Essa análise também revelou que o fator hipóxia aumentou significativamente a PIB e a PIO a partir da tensão de 60 mmHg, independentemente da presença do Hg na dieta. Já a presença do Hg na dieta também aumentou significativamente tais parâmetros, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> da água.

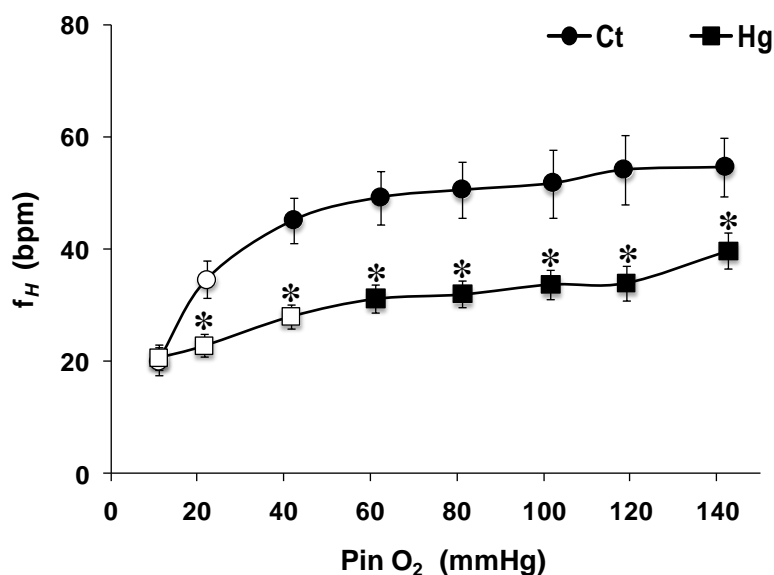


**Figura 6 - (A)** Pressão intra-bucal (PIB - mmHg) e **(B)** pressão intra-opercular (PIO - mmHg) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostas a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

### 3.2 Caracterização Eletrocardiográfica

#### 3.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ )

Os valores médios de frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) *in vivo* de *H. malabaricus* dos grupos controle e exposto ao mercúrio via alimento (Hg) nas diferentes tensões de  $O_2$  estão apresentados na figura 7. A  $f_H$  do grupo controle manteve-se constante entre as tensões de  $O_2$  de 140 e 40 mmHg, com valores entre 49 a 55 bpm. Nas  $P_{in}O_2$  de 20 e 10 mmHg ocorreu uma bradicardia significativa e a  $f_H$  atingiu o valor mínimo de  $20,0 \pm 2,5$  bpm, correspondente a uma redução de aproximadamente 64 % em relação ao valor observado em normóxia ( $55,0 \pm 5,2$  bpm). No grupo exposto ao Hg, a  $f_H$  manteve-se constante somente até a  $P_{in}O_2$  de 60 mmHg (de 31 a 40 bpm), abaixo da qual sofreu reduções significativas atingindo o valor mínimo de  $21,0 \pm 2,2$  bpm em 10 mmHg, correspondendo a uma redução de ~47 % em relação ao valor observado em normóxia ( $40,0 \pm 3,1$  bpm). Os valores de  $f_H$  do grupo exposto ao Hg foram significativamente inferiores (em média 35%) em relação aos registrados para o grupo controle nas tensões de 140 a 20 mmHg. A análise two-way indicou que houve interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg para  $f_H$ , além do um efeito de cada um dos fatores separadamente em reduzir este parâmetro (Tab 2).

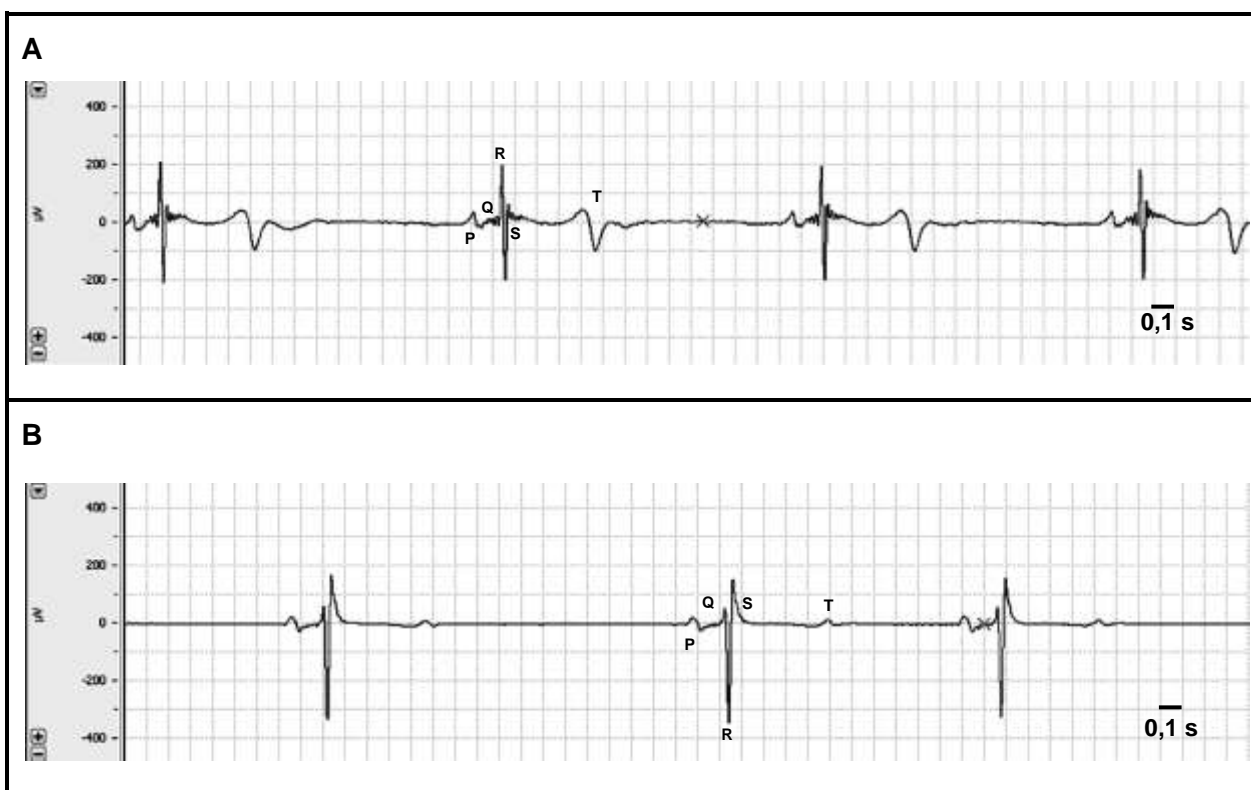


**Figura 7** - Frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct,  $n = 12$ ) e com matrinxãs expostos a  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 96 h (Hg,  $n = 12$ ) durante 30 dias ( $\sim 2\% \text{ biomassa.dia}^{-1}$ ) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

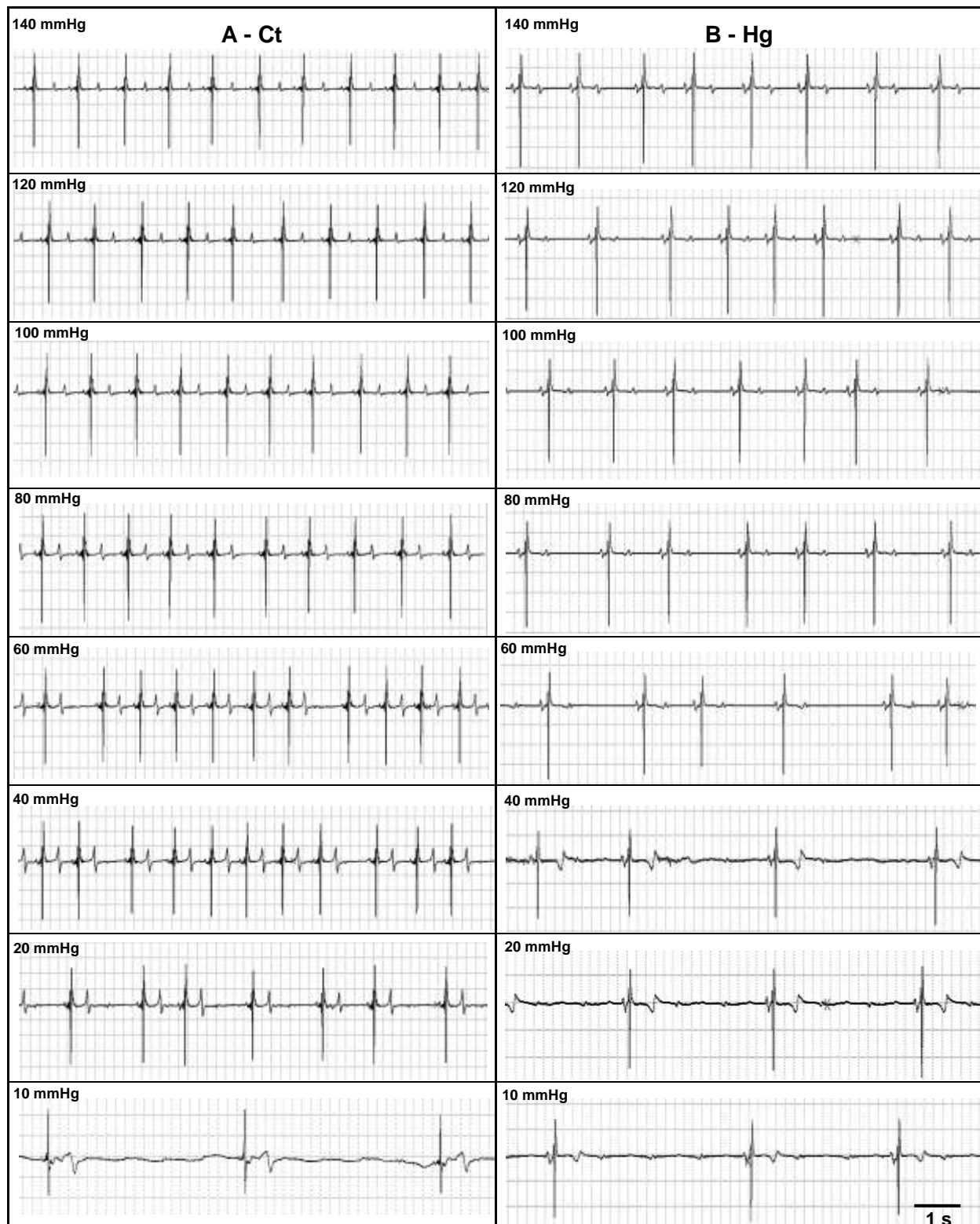
### 3.2.2 Análises eletrocardiográficas

A figura 8 mostra o registro eletrocardiográfico de um exemplar *H. malabaricus* do grupo controle (Fig. 8A) e de um exemplar do grupo exposto ao Hg (Fig. 8B), caracterizando a morfologia das ondas do ECG em normóxia. Os principais efeitos do Hg incluem: aumentos do intervalo R-R, da duração da onda P, da duração e da amplitude do complexo QRS e das durações dos intervalos P-R, Q-T e S-T, além de reduções na duração e na amplitude da onda T. A figura 9 mostra o traçado básico do ECG obtidos para *H. malabaricus* dos grupos controle (Fig. 9A) e exposto ao Hg (Fig. 9B) nas diferentes tensões de O<sub>2</sub> testadas. Como principais alterações promovidas pela hipóxia, em ambos os grupos experimentais, destacam-se: reduções na duração da onda P e no intervalo P-R e elevações no intervalo R-R e na amplitude da onda T.

Através da análise desses registros é possível a visualização das alterações nos padrões das ondas, nas durações e amplitudes das ondas, nas durações dos segmentos e intervalos de onda e na frequência de batimentos cardíacos tanto ao longo da hipóxia gradual como a diferença entre os traçados de ECG dos peixes dos grupos Ct e Hg.



**Figura 8 – (A)** Registro eletrocardiográfico (onda P, complexo QRS e onda T) de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg); **(B)** Registro eletrocardiográfico (onda P, complexo QRS e onda T) de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo exposto ao Hg em normóxia (140 mmHg).



**Figura 9 - (A)** Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg); **(B)** Registros eletrocardiográficos de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo exposto ao Hg em normóxia (140 mmHg) e durante as reduções graduais nas tensões de O<sub>2</sub> da água (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg).

A tabela 1 mostra os valores médios das durações das ondas P, complexo QRS, e T, dos intervalos P-R, R-R, Q-T (e QTc), J-T; segmento S-T e das amplitudes das ondas P, complexo QRS, T obtidos durante a normóxia e hipóxia gradual nos grupos Ct e Hg.

O valor médio da duração da onda P, em normóxia, foi de  $0,093 \pm 0,003$  s para o grupo controle e de  $0,106 \pm 0,004$  s para o grupo exposto ao Hg. Durante a hipóxia gradual, na tensão de  $O_2$  mais severa ( $P_{in}O_2$  de 10 mmHg), a duração da onda P apresentou uma redução significativa (~20 %) em relação ao valor inicial obtido em normóxia em ambos os grupos experimentais. Entre as tensões de 140 a 20 mmHg, os peixes do grupo Hg apresentaram aumentos significativos nos valores médios da duração da onda P, da ordem de 14 a 24% em relação ao grupo controle.

Não foram observadas diferenças significativas na duração do complexo QRS no decorrer da hipóxia gradual nos grupos Ct e Hg. Entretanto, os valores médios da duração do complexo QRS do grupo exposto ao Hg apresentaram-se significativamente superiores (na ordem de 36 a 95%) em todas as tensões de  $O_2$ .

De forma semelhante ao observado para duração do complexo QRS, não foram observadas diferenças significativas na duração da onda T no decorrer da hipóxia gradual nos grupos Ct e Hg. Entretanto, os valores médios da duração da onda T do grupo exposto ao Hg foram significativamente inferiores (na ordem de 35 a 49%) em relação aos registrados para o grupo controle nas tensões de 140 a 10 mmHg.

No grupo controle houve uma diminuição significativa do intervalo P-R a partir da  $P_{in}O_2$  de 80 mmHg, partindo do valor de  $0,190 \pm 0,006$  s, observado em normóxia, até o valor mínimo de  $0,145 \pm 0,008$  s, observado na menor  $P_{in}O_2$  utilizada no experimento (10 mmHg). O intervalo P-R do grupo Hg diminuiu significativamente a partir de 40 mmHg, com valores normóxicos de  $0,214 \pm 0,006$  s e atingindo o valor mínimo de  $0,179 \pm 0,008$  s na  $P_{in}O_2$  de 10 mmHg. Em todas as  $P_{in}O_2$  utilizadas, os valores do intervalo P-R do grupo exposto ao Hg foram significativamente superiores (de 11 a 23 %) aos do grupo controle.

No grupo controle ocorreu um aumento significativo do intervalo R-R a partir da  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg, partindo do valor de  $1,2 \pm 0,1$  s, observado em normóxia, até o valor máximo de  $3,1 \pm 0,4$  s, observado na menor  $P_{in}O_2$  utilizada no experimento (10 mmHg). O intervalo R-R do grupo Hg aumentou significativamente a partir de 40 mmHg, com valores normóxicos de  $1,7 \pm 0,1$  s e atingindo o valor máximo de  $3,1 \pm 0,2$  na  $P_{in}O_2$  de 10 mmHg. Esta análise evidenciou que os aumentos do intervalo R-R ocorreram simultaneamente com a bradicardia em cada um dos grupos experimentais. Os animais expostos ao Hg apresentaram intervalos R-R com maiores durações (cerca de 40%) que os apresentados pelos animais do grupo controle nas tensões de  $O_2$  de 140 a 20 mmHg (facilmente visualizado nas Figs. 8 e 9).

**Tabela 1** - Análises eletrocardiográficas de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg); #: indica diferença significativa entre os grupos experimentais Ct e Hg (p < 0,05).

Parâmetro	P <sub>in</sub> O <sub>2</sub>	Ct	Hg	Parâmetro	P <sub>in</sub> O <sub>2</sub>	Ct	Hg
Duração da onda P (s)	140	0,093 ± 0,003	0,106 ± 0,004 #	QTc (s)	140	0,537 ± 0,017	0,531 ± 0,017
	120	0,091 ± 0,003	0,108 ± 0,004 #		120	0,516 ± 0,010	0,527 ± 0,014
	100	0,089 ± 0,004	0,110 ± 0,004 #		100	0,518 ± 0,008	0,513 ± 0,011
	80	0,085 ± 0,004	0,105 ± 0,006 #		80	0,515 ± 0,007	0,516 ± 0,011
	60	0,082 ± 0,003	0,101 ± 0,006 #		60	0,514 ± 0,016	0,514 ± 0,010
	40	0,081 ± 0,004	0,101 ± 0,005 #		40	0,508 ± 0,006	<b>0,476 ± 0,015 #</b>
	20	0,081 ± 0,003	0,098 ± 0,006 #		20	<b>0,412 ± 0,017</b>	<b>0,428 ± 0,016</b>
	10	<b>0,076 ± 0,005</b>	<b>0,085 ± 0,004</b>		10	<b>0,383 ± 0,020</b>	<b>0,418 ± 0,015</b>
Duração do complexo QRS (s)	140	0,069 ± 0,008	0,096 ± 0,004 #	Intervalo JT (s)	140	0,529 ± 0,031	0,521 ± 0,036
	120	0,070 ± 0,008	0,097 ± 0,004 #		120	0,529 ± 0,028	0,512 ± 0,035
	100	0,065 ± 0,008	0,097 ± 0,006 #		100	0,533 ± 0,030	0,504 ± 0,034
	80	0,067 ± 0,007	0,094 ± 0,004 #		80	0,535 ± 0,027	0,524 ± 0,039
	60	0,069 ± 0,010	0,094 ± 0,005 #		60	0,534 ± 0,019	0,529 ± 0,043
	40	0,068 ± 0,007	0,098 ± 0,005 #		40	0,536 ± 0,026	0,553 ± 0,030
	20	0,065 ± 0,007	0,114 ± 0,005 #		20	0,547 ± 0,026	0,552 ± 0,030
	10	0,061 ± 0,007	0,119 ± 0,005 #		10	0,572 ± 0,025	0,608 ± 0,022
Duração da onda T (s)	140	0,344 ± 0,034	0,175 ± 0,025 #	Segmento ST (s)	140	0,284 ± 0,032	0,379 ± 0,029 #
	120	0,343 ± 0,029	0,174 ± 0,017 #		120	0,261 ± 0,031	0,363 ± 0,028 #
	100	0,346 ± 0,030	0,196 ± 0,026 #		100	0,250 ± 0,022	0,363 ± 0,025 #
	80	0,352 ± 0,030	0,216 ± 0,031 #		80	0,247 ± 0,033	0,366 ± 0,023 #
	60	0,365 ± 0,025	0,228 ± 0,031 #		60	0,239 ± 0,030	0,365 ± 0,028 #
	40	0,365 ± 0,025	0,232 ± 0,025 #		40	0,242 ± 0,033	0,359 ± 0,015 #
	20	0,386 ± 0,022	0,241 ± 0,025 #		20	0,247 ± 0,038	0,360 ± 0,029 #
	10	0,422 ± 0,044	0,273 ± 0,024 #		10	0,248 ± 0,031	0,354 ± 0,014 #
Intervalo PR ou A <sub>APD</sub> (s)	140	0,190 ± 0,006	0,214 ± 0,006 #	Amplitude de P (%)	140	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	120	0,173 ± 0,006	0,192 ± 0,007 #		120	108,77 ± 4,00	100,22 ± 2,70
	100	0,169 ± 0,006	0,192 ± 0,007 #		100	108,89 ± 2,45	102,02 ± 4,52
	80	<b>0,161 ± 0,006</b>	0,191 ± 0,007 #		80	110,51 ± 3,05	99,66 ± 7,46
	60	<b>0,156 ± 0,006</b>	0,187 ± 0,007 #		60	111,11 ± 4,30	99,32 ± 8,19
	40	<b>0,153 ± 0,010</b>	<b>0,179 ± 0,006 #</b>		40	108,72 ± 6,02	95,07 ± 7,41
	20	<b>0,148 ± 0,005</b>	<b>0,174 ± 0,006 #</b>		20	104,03 ± 5,26	86,50 ± 10,35
	10	<b>0,145 ± 0,008</b>	<b>0,179 ± 0,008 #</b>		10	88,61 ± 7,41	77,20 ± 9,81
Intervalo RR (s)	140	1,252 ± 0,118	1,733 ± 0,145 #	Amplitude do QRS (%)	140	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	120	1,320 ± 0,120	1,739 ± 0,140 #		120	100,78 ± 2,92	123,54 ± 9,53 #
	100	1,320 ± 0,126	1,799 ± 0,151 #		100	98,76 ± 3,91	123,93 ± 8,70 #
	80	1,392 ± 0,123	1,920 ± 0,189 #		80	99,84 ± 4,02	130,48 ± 13,48 #
	60	1,357 ± 0,151	1,979 ± 0,163 #		60	96,13 ± 6,25	136,04 ± 16,33 #
	40	1,406 ± 0,105	<b>2,444 ± 0,173 #</b>		40	102,50 ± 7,55	140,04 ± 16,22 #
	20	<b>2,052 ± 0,197</b>	<b>2,797 ± 0,230 #</b>		20	98,68 ± 6,35	134,94 ± 12,37 #
	10	<b>3,153 ± 0,393</b>	<b>3,068 ± 0,178</b>		10	92,90 ± 12,76	139,09 ± 14,37 #
Intervalo QT ou V <sub>APD</sub> (s)	140	0,588 ± 0,028	0,704 ± 0,039 #	Amplitude de T (%)	140	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	120	0,579 ± 0,029	0,708 ± 0,039 #		120	126,06 ± 9,60	96,08 ± 5,01 #
	100	0,579 ± 0,029	0,690 ± 0,037 #		100	144,40 ± 16,57	93,18 ± 9,29 #
	80	0,570 ± 0,020	0,710 ± 0,033 #		80	154,97 ± 19,47	96,61 ± 6,96 #
	60	0,563 ± 0,024	0,724 ± 0,033 #		60	149,74 ± 17,88	96,22 ± 8,26 #
	40	0,572 ± 0,020	0,699 ± 0,029 #		40	150,62 ± 14,08	<b>140,90 ± 10,48</b>
	20	0,585 ± 0,025	0,706 ± 0,034 #		20	<b>172,80 ± 20,30</b>	<b>147,14 ± 19,70</b>
	10	0,637 ± 0,031	0,734 ± 0,027 #		10	<b>180,05 ± 19,55</b>	<b>144,38 ± 10,80</b>

Não foram observadas diferenças significativas na duração do intervalo Q-T no decorrer da hipóxia gradual nos grupos Ct e Hg. Em todas as tensões de O<sub>2</sub> testadas, o grupo exposto ao Hg apresentou uma elevação significativa da ordem de 1,2 vezes na duração deste intervalo.

O valor médio do QTc (dispersão do intervalo Q-T), em normóxia, foi de aproximadamente 0,5 s nos grupos Ct e Hg, valor este que se manteve constante até as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 e 60 mmHg, respectivamente. Abaixo de tais tensões ocorreu uma redução significativa deste parâmetro que atingiu um valor mínimo de aproximadamente 0,4 s tanto no grupo controle quanto no exposto ao Hg.

Em relação ao intervalo J-T, não foram observadas diferenças significativas na sua duração tanto no decorrer da hipóxia gradual como entre os grupos experimentais.

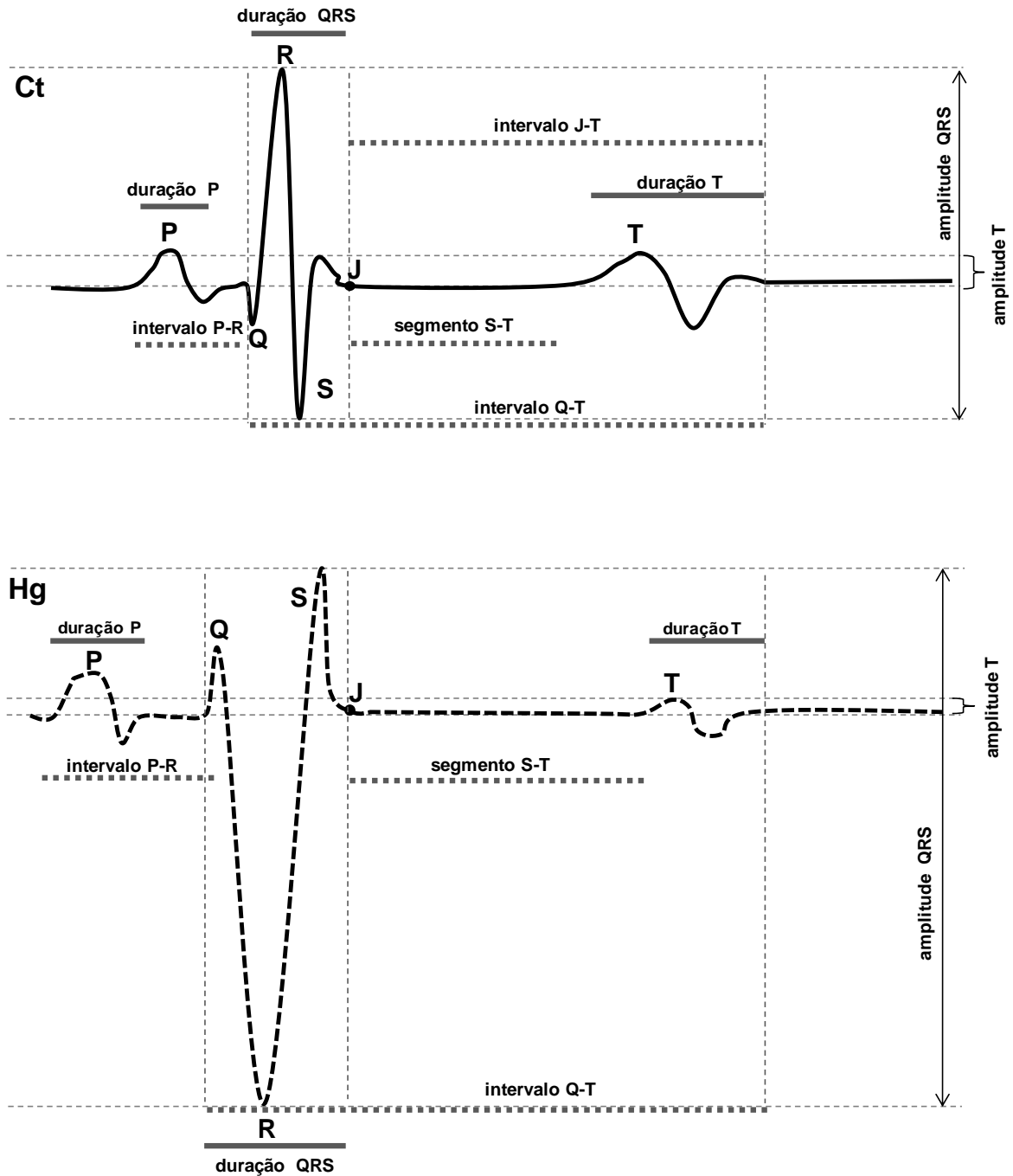
Não foram observadas diferenças significativas na duração do segmento S-T no decorrer da hipóxia gradual nos grupos Ct e Hg. Em todas as tensões de O<sub>2</sub> testadas, o grupo exposto ao Hg apresentou um aumento significativo de aproximadamente 1,4 vezes na duração deste segmento.

No decorrer da hipóxia gradual, não houve alterações significativas nas porcentagens dos valores iniciais (140 mmHg) da amplitude da onda P e do complexo QRS. Quando comparados ambos os grupos experimentais, alterações na amplitude da onda P também não foram identificadas. Entretanto, os animais expostos ao Hg apresentaram amplitudes de QRS significativamente maiores (de 23 a 40 %) que as apresentadas pelos animais do grupo controle em todas as tensões de O<sub>2</sub> na hipóxia gradual.

Tanto no grupo controle quanto no exposto ao Hg, a amplitude da onda T manteve-se constante até P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 e 60 mmHg, respectivamente. Abaixo de tais tensões, foram observados aumentos significativos nas porcentagens dos valores iniciais (140 mmHg) da amplitude da onda T, atingindo os valores máximos de 180% no grupo controle e de 144% no grupo exposto ao Hg.

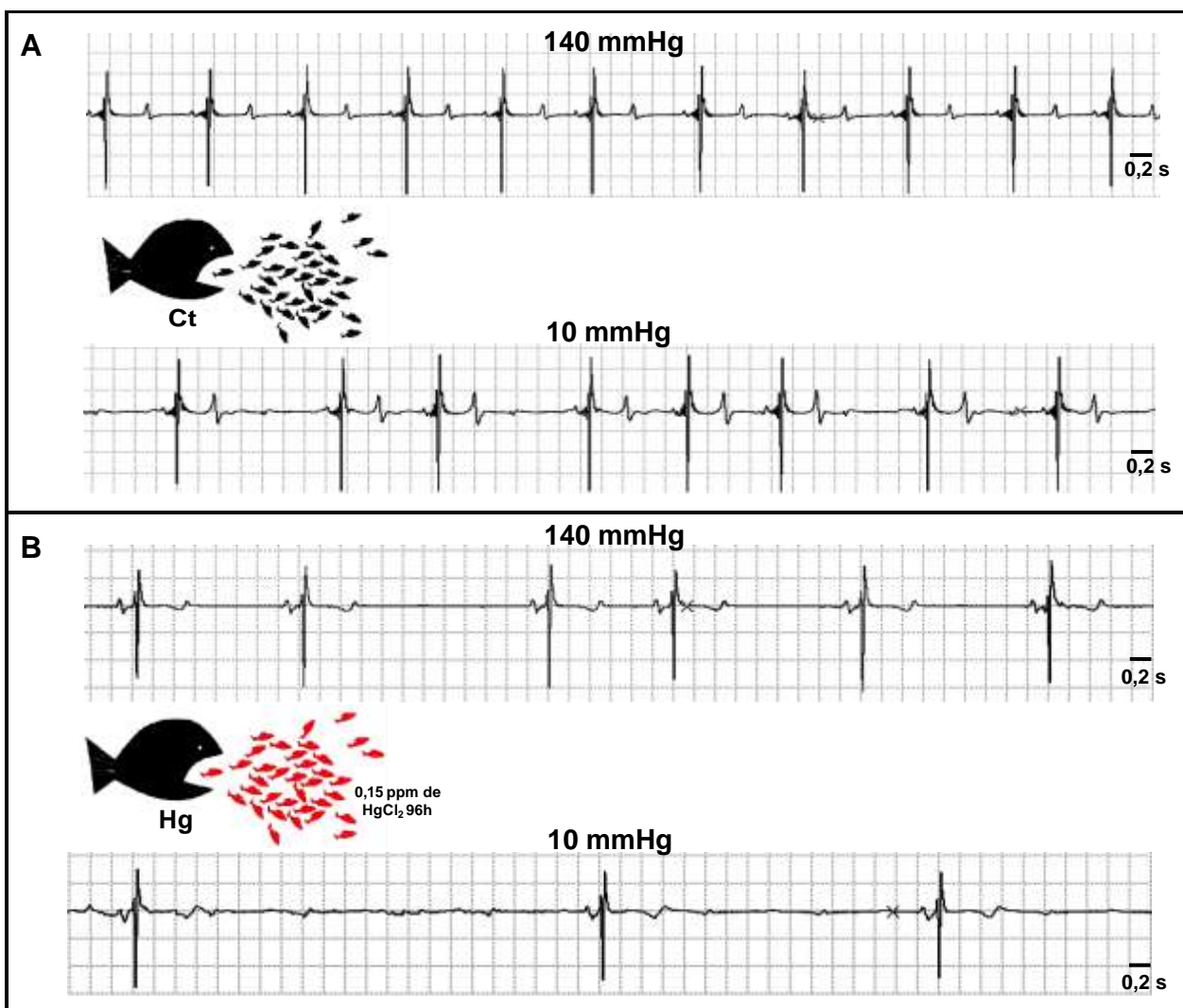
A análise de variância two-way indicou que a interação entre a exposição ao Hg e à hipóxia não foi significativa para nenhum dos parâmetros acima descritos (Tab. 3), ou seja, o comportamento da atividade elétrica do coração de *H. malabaricus* frente à hipóxia não depende da presença de Hg na dieta. Entretanto houve um efeito significativo da hipóxia, independentemente da presença do Hg na dieta, em reduzir os valores de P, P-R e QTc e aumentar R-R e a amplitude da T. Além disso, também foi evidenciado um efeito do Hg, independentemente da hipóxia, em aumentar a duração da onda P, a duração e a amplitude complexo QRS, a duração dos intervalos R-R, Q-T e S-T e em diminuir a amplitude da onda P e a amplitude e a duração da onda T. Os principais efeitos da exposição ao Hg sobre o traçado eletrocardiográfico de *H. malabaricus* estão apresentados na figura 10.





**Figura 10** – Traçado eletrocardiográfico exibido pelos exemplares de *H. malabaricus* do grupo controle (traçado contínuo) e do grupo exposto ao Hg (traçado pontilhado) em normóxia. Como principais efeitos do Hg são mostrados: o aumento da duração da onda P e do intervalo P-R, aumento da duração e da amplitude do complexo QRS, aumento do segmento S-T e do intervalo Q-T e diminuição da duração e da amplitude da onda T.

A figura 11 mostra o registro eletrocardiográfico de um peixe do grupo controle (Fig. 11A) e de um exemplar do grupo exposto ao Hg (Fig. 11B) caracterizando a ritmo cardíaco em normóxia e em hipóxia. Os peixes do grupo controle apresentaram arritmias ao longo da hipóxia gradual, especialmente em hipóxia severa. Cerca de 85% dos peixes expostos ao Hg apresentaram arritmias não só ao longo da hipóxia gradual como também em normóxia e apresentaram o complexo QRS invertido (Fig. 8B). Não foram observadas extra-sístoles nos registros de ECG de ambos os grupos experimentais frente à hipóxia gradual.



**Figura 11** – (A) Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo controle em normóxia (140 mmHg) e em hipóxia (10 mmHg); (B) Registro eletrocardiográfico de um exemplar de *H. malabaricus* do grupo exposto ao Hg em normóxia (140 mmHg) e em hipóxia (10 mmHg).

**Tabela 2** - Análise de variância ANOVA two-way das variáveis respiratórias e da frequência cardíaca de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da presença de Hg na dieta, ou nos grupos Ct e Hg, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e Hg (p < 0,05).

FATORES	PARÂMETROS				
	$\dot{V}O_2$ (mLO <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\dot{V}_G$ (mLH <sub>2</sub> O.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	f <sub>R</sub> (ciclos.min <sup>-1</sup> )	V <sub>T</sub> (mLH <sub>2</sub> O.ciclo <sup>-1</sup> )	EO <sub>2</sub> (%)
<b>Efeito da hipóxia</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>
140	54,02 ± 2,59	227,32 ± 83,60	34,64 ± 2,42	6,66 ± 1,52	78,60 ± 2,67
120	53,07 ± 2,50	275,17 ± 92,04	34,75 ± 2,48	7,62 ± 1,60	77,17 ± 2,67
100	52,36 ± 2,57	308,82 ± 92,04	37,50 ± 2,48	8,72 ± 1,56	73,62 ± 2,62
80	52,10 ± 2,60	418,31 ± 91,58	41,12 ± 2,42	10,34 ± 1,70	70,54 ± 2,67
60	52,25 ± 2,57	<b>692,27 ± 96,53</b>	<b>50,90 ± 2,31</b>	<b>13,32 ± 1,53</b>	68,74 ± 2,82
40	44,92 ± 2,50	<b>1060,64 ± 97,13</b>	<b>58,31 ± 2,53</b>	<b>17,37 ± 1,65</b>	<b>62,48 ± 3,25</b>
20	<b>30,92 ± 2,65</b>	<b>1930,70 ± 109,46</b>	<b>64,44 ± 2,42</b>	<b>28,82 ± 1,83</b>	<b>45,40 ± 2,98</b>
10	<b>15,09 ± 2,82</b>	<b>2507,08 ± 105,98</b>	<b>60,97 ± 2,37</b>	<b>42,74 ± 1,83</b>	<b>37,82 ± 2,77</b>
<b>Efeito do Hg</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	ns	<b>P &lt; 0,001</b>
Dieta controle	54,18 ± 1,33	1092,86 ± 48,06	56,08 ± 1,22	17,21 ± 0,82	70,52 ± 1,36
Dieta com Hg	<b>34,50 ± 1,26</b>	<b>762,22 ± 48,20</b>	<b>39,58 ± 1,20</b>	16,70 ± 0,84	<b>58,08 ± 1,44</b>
<b>Hipóxia x Hg</b>	<b>P = 0,011</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	ns	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P = 0,002</b>

FATORES	PARÂMETROS			
	$\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ (mLH <sub>2</sub> O.mLO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	PIB (mmHg)	PIO (mmHg)	f <sub>H</sub> (bpm)
<b>Efeito da hipóxia</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>
140	250,07 ± 124,89	0,158 ± 0,017	0,167 ± 0,020	46,10 ± 2,73
120	319,51 ± 133,14	0,157 ± 0,018	0,178 ± 0,021	43,55 ± 2,65
100	396,79 ± 121,76	0,191 ± 0,018	0,195 ± 0,023	42,40 ± 2,58
80	579,98 ± 130,45	0,219 ± 0,018	0,214 ± 0,023	40,86 ± 2,65
60	764,72 ± 131,09	<b>0,303 ± 0,019</b>	<b>0,261 ± 0,021</b>	40,11 ± 2,65
40	<b>1237,38 ± 130,45</b>	<b>0,358 ± 0,017</b>	<b>0,333 ± 0,019</b>	37,68 ± 3,11
20	<b>3464,72 ± 141,74</b>	<b>0,390 ± 0,018</b>	<b>0,390 ± 0,020</b>	<b>30,09 ± 2,65</b>
10	<b>6776,56 ± 170,80</b>	<b>0,412 ± 0,017</b>	<b>0,400 ± 0,019</b>	<b>21,10 ± 2,65</b>
<b>Efeito do Hg</b>	ns	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>
Dieta controle	1698,97 ± 70,63	0,230 ± 0,009	0,224 ± 0,011	45,72 ± 1,38
Dieta com Hg	1748,47 ± 65,58	<b>0,317 ± 0,008</b>	<b>0,310 ± 0,010</b>	<b>29,75 ± 1,33</b>
<b>Hipóxia x Hg</b>	ns	ns	ns	<b>P = 0,0046</b>

**Tabela 3** - Análise de variância ANOVA two-way das análises eletrocardiográficas de traíras, *H. malabaricus*, alimentadas com matrinxãs controles (Ct, n = 12) e com matrinxãs expostos a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 96 h (Hg, n = 12) durante 30 dias (~ 2% biomassa.dia<sup>-1</sup>) e submetidas à hipóxia gradual. Valores médios ± E.P.M. de cada um dos parâmetros nos diferentes níveis de O<sub>2</sub> na água, independentemente da presença de Hg na dieta, ou nos grupos Ct e Hg, independentemente dos níveis de O<sub>2</sub> na água. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (140 mmHg) ou entre os grupos Ct e Hg (p < 0,05).

FATORES	PARÂMETROS					
	P (s)	QRS (s)	T (s)	P-R (s)	R-R (s)	Q-T (s)
<b>Efeito da hipóxia</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	ns	ns	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	ns
140	0,100 ± 0,003	0,082 ± 0,005	0,260 ± 0,020	0,202 ± 0,006	1,50 ± 0,14	0,646 ± 0,022
120	0,099 ± 0,003	0,084 ± 0,004	0,259 ± 0,020	0,182 ± 0,005	1,53 ± 0,13	0,644 ± 0,022
100	0,099 ± 0,003	0,081 ± 0,004	0,271 ± 0,020	0,181 ± 0,004	1,56 ± 0,12	0,634 ± 0,021
80	0,095 ± 0,003	0,080 ± 0,004	0,284 ± 0,019	<b>0,176 ± 0,004</b>	1,65 ± 0,12	0,640 ± 0,021
60	0,094 ± 0,003	0,082 ± 0,004	0,296 ± 0,020	<b>0,172 ± 0,004</b>	1,67 ± 0,12	0,644 ± 0,021
40	0,091 ± 0,003	0,083 ± 0,004	0,299 ± 0,020	<b>0,166 ± 0,004</b>	1,92 ± 0,12	0,636 ± 0,021
20	0,895 ± 0,003	0,087 ± 0,005	0,314 ± 0,021	<b>0,161 ± 0,005</b>	<b>2,42 ± 0,13</b>	0,646 ± 0,020
10	<b>0,080 ± 0,003</b>	0,089 ± 0,004	0,348 ± 0,021	<b>0,162 ± 0,005</b>	<b>3,11 ± 0,13</b>	0,686 ± 0,020
<b>Efeito do Hg</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	ns	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>
Dieta controle	0,084 ± 0,001	0,067 ± 0,002	0,366 ± 0,010	0,162 ± 0,002	1,66 ± 0,063	0,584 ± 0,01
Dieta com Hg	<b>0,102 ± 0,001</b>	<b>0,101 ± 0,002</b>	<b>0,217 ± 0,009</b>	0,189 ± 0,002	<b>2,18 ± 0,066</b>	<b>0,710 ± 0,01</b>
<b>Hipóxia x Hg</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

FATORES	PARÂMETROS					
	QTc (s)	J-T (s)	S-T (s)	P <sub>amp</sub> (%)	QRS <sub>amp</sub> (%)	T <sub>amp</sub> (%)
<b>Efeito da hipóxia</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	ns	ns	<b>P = 0,005</b>	ns	<b>P &lt; 0,001</b>
140	0,534 ± 0,009	0,525 ± 0,022	0,331 ± 0,021	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
120	0,522 ± 0,009	0,520 ± 0,021	0,312 ± 0,019	104,50 ± 4,23	112,16 ± 5,54	111,07 ± 9,36
100	0,516 ± 0,008	0,519 ± 0,020	0,307 ± 0,019	105,45 ± 4,42	111,35 ± 6,10	118,78 ± 9,36
80	0,515 ± 0,008	0,529 ± 0,021	0,306 ± 0,019	105,08 ± 3,79	115,16 ± 6,43	125,79 ± 9,36
60	0,514 ± 0,008	0,531 ± 0,022	0,302 ± 0,020	105,22 ± 3,97	116,08 ± 6,60	122,98 ± 9,65
40	<b>0,492 ± 0,009</b>	0,545 ± 0,021	0,301 ± 0,019	101,89 ± 4,07	121,27 ± 6,23	<b>145,76 ± 9,42</b>
20	<b>0,420 ± 0,009</b>	0,564 ± 0,022	0,304 ± 0,019	95,26 ± 4,09	116,81 ± 7,02	<b>159,96 ± 8,92</b>
10	<b>0,401 ± 0,009</b>	0,590 ± 0,022	0,304 ± 0,019	<b>82,93 ± 4,58</b>	116,00 ± 7,02	<b>162,22 ± 10,01</b>
<b>Efeito do Hg</b>	ns	ns	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,001</b>
Dieta controle	0,488 ± 0,004	0,539 ± 0,01	0,252 ± 0,01	105,07 ± 2,01	98,69 ± 3,13	147,32 ± 4,64
Dieta com Hg	0,490 ± 0,004	0,542 ± 0,01	<b>0,364 ± 0,01</b>	<b>94,98 ± 2,10</b>	<b>128,49 ± 3,23</b>	<b>114,29 ± 4,64</b>
<b>Hipóxia x Hg</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Respostas Respiratórias

#### 4.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ )

De acordo com Vosylienè et al. (1999) *apud* Jezierska & Sarnowski (2002) as funções respiratórias dos peixes são muito suscetíveis à intoxicação por metais. Mesmo quando a via de exposição é a dieta, os metais podem induzir estresse respiratório ao danificar as brânquias e promover *desequilíbrio ácido-base*, disfunções osmorregulatórias e hematológicas prejudicando o transporte de  $O_2$  e a respiração celular (CHOWDHURY et al., 2004; SZEBEDINSZKY et al., 2001). O presente estudo reforça tais hipóteses, uma vez que a exposição ao Hg, por via trófica, foi capaz de modular a resposta à hipoxia em traíra prejudicando vários parâmetros respiratórios. Na ausência de Hg na dieta, a  $\dot{V}O_2$  de *H. malabaricus* manteve-se constante ( $\sim 64 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) até a tensão de  $O_2$  na água de aproximadamente 40 mmHg (equivalente a uma  $P_{\text{insp}}O_2$  de  $\sim 15$  mmHg) o que demonstra que a traíra é uma espécie oxi-reguladora, capaz de manter a  $\dot{V}O_2$ , independente da concentração de  $O_2$  no meio. Somente nas  $P_{\text{in}}O_2$  de 20 e 10 mmHg, a  $\dot{V}O_2$  diminuiu progressivamente. O valor da  $P_cO_2$  calculado para as traíras do grupo controle foi de 20,8 mmHg, abaixo do qual a  $\dot{V}O_2$  tornou-se dependente da concentração de  $O_2$  na água devido a uma redução na eficiência dos mecanismos homeostáticos envolvidos na captação de  $O_2$  pelas brânquias e na difusão desse gás para os tecidos.

Comparativamente aos valores de  $\dot{V}O_2$  apresentados pela traíra que é uma espécie sedentária, peixes tropicais considerados ativos exibem, em normóxia, taxas metabólicas mais elevadas, como é o caso do dourado, *Salminus maxillosus*, cujo valor de  $\dot{V}O_2$  é de  $\sim 100 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (SOUZA et al., 2001), do curimatã, *Prochilodus scrofa*, cuja  $\dot{V}O_2$  é de  $\sim 90 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (FERNANDES et al., 1995) e do matrinxã que apresentou uma  $\dot{V}O_2$  de  $\sim 110 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  conforme descrito no capítulo anterior (ver capítulo VIII). O baixo valor de  $\dot{V}O_2$  pode indicar uma necessidade de energia relativamente baixa para manter o metabolismo em traíras. Yang & Somero (1993) sugerem que a baixa taxa metabólica é uma adaptação exibida por algumas espécies às condições ambientais em que vivem, caracterizadas pela baixa disponibilidade de  $O_2$  e de alimento.

O presente estudo reforça os resultados prévios de Rantin & Johansen (1984) e Rantin et al. (1993), os quais mostraram que a espécie *H. malabaricus* é oxi-reguladora, com um consumo de  $O_2$  constante na faixa de 50 a 70  $\text{mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  até as  $P_cO_2$  de 25 e 20 mmHg,

respectivamente. Por outro lado, Kalinin et al. (1993) encontraram um valor de  $\dot{V}O_2$  de  $\sim 40$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$  e de  $P_cO_2$  de 18 mmHg para exemplares adultos de traíra pesando em média 364,7  $\pm$  38,5 g, massa corpórea semelhante a das traíras utilizadas no presente estudo (387,9 + 14,5 g). O trabalho de Kalinin (1991) mostrou ainda que a traíra, quando submetida à hipóxia gradual, manteve sua  $\dot{V}O_2$  constante inclusive na tensão de 20 mmHg equivalente a uma  $P_{insp}O_2$  de 15,4 +1,1 mmHg. Entretanto, no presente estudo, a  $\dot{V}O_2$  sofreu redução significativa já em 20 mmHg, equivalente aqui a uma  $P_{insp}O_2$  de 14,8  $\pm$  1,0 mmHg. Assim, nos dois casos, apesar das divergências, pode-se dizer que a traíra manteve a  $\dot{V}O_2$  constante até a  $P_{insp}O_2$  de aproximadamente 15 mmHg.

As pequenas diferenças observadas nos valores da  $\dot{V}O_2$  e da  $P_cO_2$  para traíra pode ser o resultado de que os peixes utilizados em tais trabalhos foram coletados em diferentes regiões. Embora *H. malabaricus* seja considerada uma única espécie nominal, ela apresenta padrões cariotípicos diversificados entre populações isoladas nas diferentes bacias hidrográficas, ou até mesmo entre populações de distribuição simpátrica. Análises citogenéticas convencionais nesse complexo de espécies têm demonstrado ampla diversidade cromossômica, com variações numéricas (2n=39 a 2n=42) e estruturais, e diferentes sistemas de cromossomos sexuais, o que permitiu a identificação de sete citótipos distintos (BERTOLLO et al., 2000). Além disso, as traíras foram alimentadas com pequenos exemplares vivos de matrinxãs na proporção de 4 presas/traíra a cada 96 h, enquanto que nos demais trabalhos citados anteriormente, as traíras foram alimentadas semanalmente com exemplares de várias espécies forrageiras como lambaris e acarás ou apenas com filé de peixe. A taxa de alimentação e a qualidade da presa podem interferir na taxa metabólica (GINGERICH et al., 2009; JOBLING, 1981; JOBLING & SPENCER, 1980). Os peixes tendem a exibir uma estratégia hipometabólica como uma resposta energética compensatória às oportunidades de alimentação reduzida, já os peixes com oportunidade de alimentação ilimitada exibem uma resposta compensatória em uma direção positiva a fim de manter ou aumentar consumo de  $O_2$  (FU et al., 2005).

Adicionalmente, Rantin & Johansen (1984) que encontraram um valor de  $P_cO_2$  de 25 mmHg para traíra, utilizaram a tensão de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ) para determinar a  $P_cO_2$  a 20°C, enquanto que no presente estudo utilizou-se a  $P_{insp}O_2$  a 25°C, o que dificulta uma comparação mais precisa. Segundo Hughes et al. (1983), os valores de  $P_cO_2$  obtidos através da utilização da  $P_{insp}O_2$  são significativamente inferiores aos obtidos quando se utiliza apenas a  $P_{in}O_2$ . Isso se deve ao fato de que parte da água expirada pelo animal retorna à cavidade bucal através de um fluxo reverso pelas brânquias e/ou como resultado de uma “re-respiração” de parte da água expirada pelo peixe, denotando-se assim a necessidade de se monitorar a tensão de  $O_2$  da água inspirada (KALININ, 1991).

A dependência da  $\dot{V}O_2$  da  $PO_2$  ambiental é importante na seleção do habitat para os vertebrados aquáticos. (ULTSCH et al., 1978). De acordo com Rantin & Johansen (1984), os teleósteos mostram uma considerável variação nas  $P_cO_2$ , mas na maioria dos oxi-reguladores os valores da  $P_cO_2$  estão entre 40 e 20 mmHg. Espécies que vivem em rios, geralmente pobres em oxigênio, como tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Cyprinus carpio*) apresentaram uma  $P_cO_2$  de aproximadamente 19 mmHg (FERNANDES et al., 1989; OTT et al., 1980), valor similar ao observado para traíra no presente estudo (20,8 mmHg). Segundo Fernandes & Rantin (1989), espécies tropicais estão mais sujeitas à hipóxia ambiental e os baixos valores de  $P_cO_2$  podem representar uma vantagem adaptativa, permitindo uma maior capacidade de manter a tomada  $\dot{V}O_2$  em ambientes hipóxicos.

O presente estudo revela que a exposição ao Hg, por via trófica, não apenas reduziu os valores de  $\dot{V}O_2$  nas tensões de  $O_2$  de 140 a 20 mmHg como também aumentou significativamente a  $P_cO_2$ , reduzindo a capacidade da traíra de manter a tomada de  $O_2$  constante, e, conseqüentemente, as suas chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos e impactados pelo Hg, como frequentemente observado na região amazônica, Pantanal e rios do sudeste localizados próximos a áreas com intensa atividade industrial. Sob condições de estresse, a  $P_cO_2$  tende a aumentar, refletindo a diminuição da capacidade do peixe em lidar com perturbações ambientais (DUBE & HOSETTI, 2010). Os estudos sobre as respostas metabólicas de peixes aos metais têm mostrado resultados variáveis e focam, sobretudo, na exposição via água, ao invés da contaminação alimentar. Não há estudos sobre os efeitos da contaminação trófica por Hg sobre a função cardiovascular e/ou respiratória em peixes. Além disso, a maioria dos estudos avalia os efeitos do Hg sobre o crescimento, bioacumulação e alterações comportamentais, bioquímicas e histológicas de peixes (AMLUND et al., 2007; BERNTSSEN et al., 2003; 2004; ELIA et al., 2010; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2006).

Enquanto os estudos com outros metais pesados, como Cu e Cd, indicam um aumento da taxa metabólica em peixes expostos (COUTURE & KUMAR 2003; De BOECK et al., 1995; ESPINA et al., 2000; SHERWOOD et al., 2000), Hopkins et al. (2003) não encontraram diferença significativa no consumo de  $O_2$  entre peixes mosquito, *Gambusia holbrooki*, coletados de uma população exposta cronicamente ao  $HgCl_2$  e de uma população referência. Por outro lado, Tatara et al. (2001) verificaram um aumento na taxa metabólica de *G. holbrooki*, após a exposição a  $100 \mu g.L^{-1}$  de  $HgCl_2$  por 24 horas. Essa diferença provavelmente é o resultado dos dois meios de contaminação mercurial: pela absorção gastrointestinal (HOPKINS et al., 2003) e através do epitélio branquial (TATARA et al., 2001.). Handy et al. (1999) também não observaram alteração na  $\dot{V}O_2$  de truta arco-íris após 3 meses de exposição ao cobre na dieta ( $500 mg.kg^{-1}$ ). A elevação da  $\dot{V}O_2$  ou a ausência de custo energético adicional após a exposição aos metais resultariam,

respectivamente, ou do aumento do metabolismo na tentativa de eliminação do metal ou da indução das vias de biotransformação e dos mecanismos de reparo celular altamente eficientes devido à aclimação após o longo prazo de exposição ao metal (STAUB et al., 2004).

Entretanto, os dados do presente estudo sugerem resultados discordantes com a literatura. De acordo com St-Amand et al (199) uma aclimação bem sucedida ao Hg deveria valer-se de uma indução da síntese de componentes da cadeia respiratória para substituir aqueles inibidos pelo Hg ou da síntese dos mecanismos de desintoxicação, como por exemplo, a síntese de metalotioneína, que é considerada o mais importante processo de desintoxicação do Hg. Para ser eficaz, todos esses processos bioquímicos necessitam de energia fornecida pela respiração, ressaltando-se que a taxa metabólica refere-se à quantidade de energia necessária para a manutenção das funções vitais de um organismo, num determinado tempo (WAHRLICH & ANJOS, 2001). No presente estudo, o hipometabolismo pode indicar a incapacidade das traíras contaminadas pelo Hg em induzir um sistema eficiente de desintoxicação e adaptar seu metabolismo ao estresse fisiológico causado pelo metal, mesmo que induções significativas da MT, GST e GSH no fígado e nas brânquias tenham sido verificadas, embora não tenham sido suficientes em conter os danos oxidativos em tais tecidos (para detalhes ver Capítulo V).

Por outro lado dois estudos corroboram a queda da  $\dot{V}O_2$  observada em traíras em resposta à exposição ao Hg via dieta. Jezierska & Sarnowski (2002) avaliaram os efeitos da exposição ao Hg, Cd e Cu sobre o consumo de  $O_2$  em larvas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e de carpa (*Cyprinus carpio*). As larvas (0,9-1,39 g) foram expostas por 1 h em soluções individuais de Hg, Cd e Cu ou em misturas Hg+Cd, Cd+Cu ou Hg+Cu, nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg.L<sup>-1</sup>. Tanto as soluções individuais dos metais como as suas misturas reduziram a  $\dot{V}O_2$  de maneira dose-dependente, corroborando os resultados do presente estudo. As misturas foram mais tóxicas que os metais individuais causando uma redução mais acentuada na  $\dot{V}O_2$  e as larvas de carpa comum foram mais sensíveis ao Cd, enquanto as de truta arco-íris foram mais sensíveis ao Hg. O declínio na  $\dot{V}O_2$  também foi observado por Radhakrishnaiah et al. (1993) em larvas de carpa após 1, 15 e 30 dias de exposição a 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de Hg.

Um dos efeitos do mercúrio é a inibição da fosforilação oxidativa no complexo III da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, especificamente entre a ubiquinona e o citocromo b5 (ERCAL et al., 2001). Após 49 dias de contaminação com metilmercúrio através da dieta (13 ug.g<sup>-1</sup>), houve redução de 80% no estágio 3 da respiração mitocondrial e inibição de 60% da atividade da citocromo c oxidase em fibras musculares do paulistinha, *Danio rerio* (CAMBIER et al., 2009). Uma redução na taxa metabólica não indica necessariamente uma hipóxia tecidual, mas ambas podem estar relacionadas (ULTSCH et al., 1980).



Outra hipótese para explicar a reduzida taxa metabólica em resposta à exposição ao Hg é o conhecido efeito do metal em inibir a acetilcolinesterase (AChE). O Hg inorgânico é capaz de se ligar a grupamentos sulfidrilas da AChE promovendo a inibição irreversível, desnaturação e agregação protéica (FRASCO et al., 2007). A tomada de oxigênio pelas brânquias é amplamente determinada pela área de superfície funcional respiratória, a qual pode ser aumentada pela epinefrina, através de vasodilatação, ou diminuída pela acetilcolina, através de vasoconstrição. Assim, a inibição da AChE nas brânquias poderia resultar em continua estimulação das junções neuro-musculares, levando à constrição na base das artérias eferentes dos filamentos branquiais, reduzindo o fluxo de sangue através das lamelas secundárias (McKIM et al., 1987). Como o Hg inorgânico é capaz de inibir a atividade da AChE em peixes (GILL et al., 1990; SURESH et al., 1992; VIEIRA et al., 2009), tal inibição poderia estar causando a redução na eficiência da tomada de oxigênio observada no presente estudo, relacionada a uma redução na área da superfície funcional respiratória. Segundo Liao et al (2006), a exposição do peixe medaka japonês (*Oryzias latipes*) a 2,5 e 40 ng.L<sup>-1</sup> de cloreto de metilmercúrio, durante 8 dias, levou a uma redução média de 46 a 60%, respectivamente, na atividade da AChE nas brânquias, no fígado e no músculo. Em traíras que receberam 14 doses de 75 ng.g<sup>-1</sup> de metilmercúrio através de uma dieta com lambaris (*Astyanax* sp) contaminados intraperitonealmente houve inibição de 36% da colinesterase muscular (ALVES COSTA et al., 2007).

Deng et al. (2008) relataram que larvas do ciprinídeo *Pogonichthys macrolepidotus* após 21 dias de dieta contendo 11,7 µg.g<sup>-1</sup> de metilmercúrio exibiram severas anomalias nas brânquias como necrose, edema, fusão das lamelas secundárias e de filamentos e hiperplasia das células epiteliais. Tais alterações podem causar desequilíbrio osmótico e iônico, aumento da distância de difusão água-sangue e redução da capacidade de difusão do O<sub>2</sub>, além de redução da perfusão dos filamentos branquiais e das lamelas secundárias, reduzindo drasticamente a eficiência das trocas gasosas. Se tais alterações também tiverem ocorrido em *H. malabaricus*, mesmo através da exposição via dieta, explicariam os menores valores de  $\dot{V}O_2$  em resposta à exposição ao Hg nas tensões de O<sub>2</sub> de 140 a 20 mmHg e o aumento da P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>. Adicionalmente, segundo Youson & Neville (1987), o metal acumulado no epitélio branquial pode reduzir a captação de O<sub>2</sub>. No presente estudo, após a exposição sub-crônica ao HgCl<sub>2</sub>, por via trófica, o tecido branquial foi o que mais acumulou mercúrio apresentando o fator de transferência trófica (FTT) mais elevado (para detalhes ver capítulo III).

Para as traíras expostas ao Hg via dieta, não só foi observado um maior valor de P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> como a taxa metabólica, já reduzida em relação ao controle, manteve-se constante somente até a tensão de O<sub>2</sub> de 60 mmHg, diferentemente do controle onde foram observadas reduções na  $\dot{V}O_2$  somente nas tensões de 20 e 10 mmHg. A análise de variância ANOVA two-way mostrou que para a taxa metabólica, há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg. Dessa

forma, o padrão de resposta da  $\dot{V}O_2$  frente à hipóxia depende da presença de Hg na dieta, ou seja, o Hg na dieta impede a manutenção de uma taxa metabólica constante em 40 mmHg.

A ocorrência de tais alterações pode estar relacionada a mudanças na capacidade do sangue em transportar  $O_2$ . Alves Costa et al. (2007) mostraram que em traíras que receberam 14 doses de  $75 \text{ ng.g}^{-1}$  de metilmercúrio através de uma dieta constituída de exemplares de lambaris (*Astyanax* sp) contaminados intraperitonealmente houve inibição de aproximadamente 50% da atividade da ácido delta-aminolevulínico-desidratase ( $\delta$ -ALAD). A ALAD, também conhecida como porfobilinogênio sintetase, é a segunda enzima da via de biossíntese do grupamento heme. Sua atividade catalítica é a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico, com a formação de uma molécula de porfobilinogênio, primeiro precursor do grupo heme, porfirinas, citocromos e cobalaminas (PLEWINSKA et al., 1991; WETMUR et al., 1986). A atividade da ALAD é inibida por oxidação de seus grupos tióis críticos pela ação de vários metais pesados (WETMUR et al., 1986).

Se o Hg na dieta induz uma redução da formação dos grupos heme pela inibição da ALAD, então haverá prejuízo imediato no transporte de  $O_2$ , o que pode ser uma das causas da inabilidade das traíras expostas troficamente ao Hg em manter a tomada de  $O_2$  constante a 40 mmHg e, conseqüentemente, elevando a  $P_cO_2$ . Assim, os animais expostos ao Hg poderiam estar em hipoxemia, o que pode acarretar um deslocamento da cascata de  $O_2$  para baixo e, como consequência, um declínio no suprimento de  $O_2$  para as mitocôndrias, contribuindo para a redução da taxa metabólica observada. Adicionalmente, Mela et al. (2007) mostraram que a exposição alimentar e sub-crônica ao metilmercúrio provocou sérios danos no rim anterior de *H. malabaricus* e lesões neste tecido hematopoiético podem conduzir a uma falha no “turnover” dos eritrócitos. Tais achados foram corroborados pelo aumento do volume corpuscular médio (MCV) das traíras expostas troficamente ao metilmercúrio no trabalho de Oliveira Ribeiro et al. (2006), onde os autores ressaltam que o metilmercúrio poderia aumentar o número de eritrócitos velhos circulantes e induzir um quadro de anemia. Tal hipótese poderia ter contribuído para o aumento da  $P_cO_2$  observado nas traíras expostas troficamente ao Hg no presente estudo.

#### 4.1.2 Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ )

A  $\dot{V}_G$  de *Hoplias malabaricus* em normóxia, determinada no presente estudo, foi semelhante à encontrada por Rantin et al. (1992) e Kalinin et al. (1993; 1996) para mesma espécie e por Lomholt & Johansen (1979) e Saunders et al. (1962) para a carpa, *C. carpio*. Entretanto, o valor da  $\dot{V}_G$  para traíra ( $238 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) é menor do que os valores

encontrados para espécies que habitam águas rápidas e bem oxigenadas como pacu, *P. mesopotamicus* (546 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; GUERRA, 1992), curimatá, *P. scrofa* (451 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; FERNANDES et al., 1995), dourado, *S. maxillosus* (914 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; SOUZA et al., 2001) e matrinxã (746 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; presente estudo, capítulo VIII). De acordo com Rantin et al. (1992), os baixos valores de  $\dot{V}_G$  de traíra podem ser decorrentes da alta afinidade de sua hemoglobina ao O<sub>2</sub>, facilitando o transporte do gás.

Tanto as traíras do grupo controle quanto as do exposto troficamente ao Hg exibiram aumentos significativos na  $\dot{V}_G$  no decorrer da hipóxia gradual, sendo registradas elevações na ordem de aproximadamente 11 vezes na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> estudada (10 mmHg), em relação a normóxia (140 mmHg), em ambos os grupos experimentais. A comparação entre as respostas ventilatórias de *H. malabaricus* e das principais espécies de teleósteos estudadas indica aumentos moderados na  $\dot{V}_G$  dessa espécie em resposta à hipóxia. Como exemplo, pode-se citar os aumentos na  $\dot{V}_G$  da ordem de 25,6 vezes em *Ictalurus nebulosus* e de 38,6 vezes em *Catostomus commersoni* (SAUNDER, 1962) e de 15 vezes em *Oreochromis niloticus* (FERNANDES & RANTIN, 1987).

As respostas ventilatórias desempenham um papel fundamental na permanência de peixes em águas pobres em O<sub>2</sub>, pois são respostas imediatas enquanto que vários dias podem ser necessários para o completo ajuste da capacidade de transporte de O<sub>2</sub> do sangue (WEBER, 1982; KALININ, 1991). De acordo com a "equação fundamental da fisiologia respiratória" de Dejourn (1981) { $\dot{V}O_2 = \dot{V}_G \cdot EO_2 \cdot P_{insp}O_2 = 1$ }, a manutenção da tomada de O<sub>2</sub> constante quando a concentração de O<sub>2</sub> do meio declina só é possível se ocorrer um aumento na ventilação branquial e/ou na extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>). Como a capacidade de aumento na EO<sub>2</sub> é muito limitada em peixes, o aumento na  $\dot{V}_G$  é necessário para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  e constitui a mais efetiva compensação durante reduzidas disponibilidades de O<sub>2</sub> na água (KALININ, 1996). O aumento na ventilação branquial em resposta à redução na tensão de oxigênio ambiental foi observado em várias espécies de peixes, como em traíra (*Hoplias malabaricus*) e trairão (*Hoplias lacerdae*) (RANTIN et al., 1992), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (KALININ et al., 2000), entre outras.

De acordo com Cameron (1971), Fernandes & Rantin (1989), Gerald & Cech (1970), Kalinin (1991), Rantin et al. (1992), a  $\dot{V}_G$  em resposta à hipóxia é imediatamente aumentada através da elevação da f<sub>R</sub> e/ou V<sub>T</sub>. No presente estudo, o aumento exibido por ambos os grupos na  $\dot{V}_G$  foi caracterizado pelo maior aumento no volume ventilatório (cerca de 7,3 vezes no grupo Ct e 5,8 vezes no grupo Hg) em relação à frequência respiratória (cerca de 1,6 vezes no grupo Ct e 2,0 vezes no grupo Hg). Em resposta à hipóxia, diferentes estratégias são utilizadas

pelos peixes para ajustar a ventilação branquial. Um tipo de resposta é o aumento na  $\dot{V}_G$  devido a um maior aumento na  $f_R$  do que no  $V_T$ , assim como observado na carpa comum, *Cyprinus carpio* (MARVIN & HEATH, 1968), bluegill, *Lepomis macrochirus* (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979) e pacu, *Piaractus mesopotamicus* (AGUIAR et al., 2002). Contudo, a resposta mais comumente observada em teleósteos é um maior aumento no  $V_T$ , quando comparado com a  $f_R$ . Alguns exemplos de espécies que apresentam esse tipo de resposta são: tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (FERNANDES & RANTIN, 1989), curimatá, *Prochilodus scrofa* (FERNANDES et al., 1995) e cascudo, *Hypostomus regani* (MATTIAS et al., 1998).

Do ponto de vista metabólico, este maior aumento no  $V_T$  em relação à  $f_R$  é, aparentemente, a forma mais eficaz de aumentar a  $\dot{V}_G$ , uma vez que o custo energético deste processo é, geralmente, muito alto em teleósteos. Conforme descrito por Ballintijn & Hughes (1965), o aparelho respiratório dos teleósteos consiste em duas bombas que são a cavidade bucal e as cavidades operculares separadas pelas brânquias. Nessas bombas, um grande número de músculos estão trabalhando em um sistema complexo de ossos, ligamentos e articulações e são divididos em músculos que expandem as cavidades respiratórias e aqueles que reduzem seus volumes, requerendo, portanto, energia, proveniente da quebra do ATP durante a contração muscular.

Durante a normóxia, os valores da  $\dot{V}_G$  de ambos os grupos experimentais não diferiram de forma significativa, possivelmente devido a elevada  $V_T$  compensando a baixa  $f_R$  no grupo exposto ao Hg. Durante o desenvolvimento da hipóxia gradual, a exposição ao Hg fez com que a magnitude do aumento da  $\dot{V}_G$  em resposta à hipóxia fosse menor (5,8 vezes) do que aquela apresentada pelo grupo controle (7,3 vezes), representando um decréscimo de 20% na capacidade de elevar a ventilação branquial, o que reforça a hipótese de prejuízo à função respiratória causado pela presença do metal na dieta. Além disso, as traíras do grupo controle, exibiram aumentos pronunciados na  $\dot{V}_G$  a partir da tensão de 60 mmHg, enquanto que nas traíras do grupo Hg, elevações significativas na  $\dot{V}_G$  só foram registradas em 20 e 10 mmHg, de tal forma que entre as tensões de 60 a 20 mmHg os valores da  $\dot{V}_G$  das traíras expostas ao Hg foram significativamente inferiores em relação aos peixes controle. Assim, a exposição trófica ao Hg causou uma perda na capacidade de aumento da  $\dot{V}_G$  em resposta a hipóxia. Segundo Steffensen et al. (1982), a  $\dot{V}_G$  aumenta em resposta à hipóxia até um determinado nível, que não é excedido com adicionais reduções na tensão de  $O_2$  do ambiente, isto é, a compensação ventilatória cessa por tornar-se insuficiente para manter o transporte de  $O_2$ . Os resultados do presente estudo sugerem que o Hg na dieta prejudica essa compensação tornando-a mais sutil, de uma magnitude

menor, deslocando a curva da  $\dot{V}_G$  em resposta à hipóxia gradual para baixo. Tais evidências caracterizam o Hg como um fator limitante adicional a função respiratória, mesmo quando presente na dieta, fazendo com que uma espécie predadora e altamente resistente à baixa disponibilidade de  $O_2$ , sinta de forma mais pronunciada os efeitos da hipóxia.

Nas traíras expostas ao Hg, os menores valores da  $\dot{V}_G$  entre as tensões de 60 e 20 mmHg podem estar associados a um prejuízo nos mecanismos compensatórios que conservam o  $V_T$  aumentado a níveis controle em tais tensões. Um desses mecanismos é a própria disponibilidade energética, que talvez não tenha sido suficiente para sustentar elevações no  $V_T$  e na  $\dot{V}_G$  a níveis do controle nessas tensões. Cabe ressaltar que o Hg reduziu a taxa metabólica das traíras tanto em normóxia como em hipóxia gradual. Adicionalmente, entre as tensões de 140 a 80 mmHg, os animais expostos ao Hg apresentaram maiores valores no  $V_T$  em relação aos animais controle. Dessa forma, nos peixes expostos ao Hg, um gasto energético adicional já começa ser empregado em normóxia, permitindo assim, a passagem de um maior volume de  $H_2O$  pelas brânquias mantendo a tomada de  $O_2$ , mesmo com uma menor  $EO_2$ , nas tensões de  $O_2$  iniciais. Entretanto, no decorrer da hipóxia, esse gasto energético não foi suportado, o que pode ser comprovado nas tensões de 60 e 20 mmHg, onde os valores de  $V_T$  e  $\dot{V}_G$  apresentam-se inferiores. A análise de variância ANOVA two-way mostrou que para a  $V_T$  e  $\dot{V}_G$ , há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg. Dessa forma, o padrão de resposta da  $V_T$  e  $\dot{V}_G$ , frente à hipóxia depende da presença de Hg na dieta, ou seja, o Hg impede a manutenção de tais parâmetros a níveis controle entre as tensões de 60 a 20 mmHg.

Nas traíras expostas troficamente ao Hg, esse gasto energético adicional nas tensões iniciais de  $O_2$  com o aumento do  $V_T$  pode ser entendido como um mecanismo de compensação para a reduzida  $f_R$  e uma estratégia de economia de energia para manter a taxa metabólica constante. Segundo Rantin *et al.* (1992), a razão para tal estratégia pode ser uma redução do custo energético dessa resposta, assumindo que a conservação de uma velocidade de contração muscular constante é energeticamente menos dispendiosa, ao passo que, uma elevada frequência de contração é limitada pelo trabalho contra uma alta viscosidade interna dos músculos e uma alta viscosidade da água. Os peixes expostos à hipóxia ambiental apresentam respostas que visam à economia energética e a tentativa de aumentar a capacidade de extração de  $O_2$  (MUUSZE *et al.*, 1998). Corroborando essa hipótese, a exposição ao Hg promoveu hipoventilação em todas as tensões de  $O_2$  testadas. Alguns trabalhos demonstraram que misturas de metais pesados e o cobre diminuíram a frequência respiratória de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (VOSYLIENÉ & KAZLAUSKIENĖ, 1999; VOSYLIENÉ *et al.*, 2003). De acordo com Ballintijn (1969), a respiração de baixa intensidade, é a forma mais eficiente do ponto de vista de

economia de energia de contração muscular, uma vez que há a redução do número de músculos que participam do processo.

Outra explicação, que não a economia energética, para essa hipoventilação seria o efeito do Hg na redução da atividade da AChE (GILL et al., 1990; SURESH et al., 1992; VIEIRA et al., 2009), levando a uma hiperestimulação colinérgica e um acúmulo de acetilcolina. O sistema cardio-respiratório dos peixes é controlado pelo sistema nervoso parassimpático via nervo vago. (BARRETT & TAYLOR, 1985; TAYLOR et al., 1999), dessa forma um aumento no tônus colinérgico leva a uma redução na frequência de ventilação. Assim, uma possível redução na atividade da AChE pelo Hg poderia ter resultado em um bloqueio da neurotransmissão nas junções neuromusculares do aparelho ventilatório causando uma hipoventilação. Oliveira Ribeiro et al. (2008) mostraram que paulistinhas (*Danio rerio*) alimentados com ração contendo  $13,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de metilmercúrio por 63 dias exibiram intensa desorganização das miofibrilas e maior espaçamento entre os feixes de fibras tanto no músculo branco como no vermelho. Adicionalmente, nos músculos contaminados foi observado dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, redução no número de mitocôndrias e desorganização das cristas mitocondriais. Assim, não se pode descartar os possíveis danos do tecido muscular induzidos pelo Hg na dieta como contribuintes no prejuízo da função dos músculos envolvidos na ventilação e, conseqüentemente, levando a uma incapacidade das traíras do grupo exposto em manter a  $f_R$  semelhante aos controles.

Em peixes, poluentes neurotóxicos, como é o Hg, podem provocar uma grande variedade de respostas cardiovasculares e respiratórias integradas por afetarem diferentes sítios no sistema nervoso central que são responsáveis pelo controle da frequência da ventilação, da tosse, do volume de ventilação, do consumo de oxigênio entre outros (BRADBURY et al., 1991a; BRADBURY et al., 1991b; McKIM et al. 1987). Nesse sentido, Tsai et al. (1995) demonstraram que a exposição a  $0,015$  e  $0,030 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 6 meses levou uma redução dose-dependente nos níveis de serotonina no hipotálamo de tilápia mossâmbica, *Oreochromis mossambicus*. A serotonina eleva a frequência ventilatória em peixes estimulando diretamente receptores serotoninérgicos nos vasos e nas brânquias ou neurônios não específicos ou ainda estimulando diretamente os quimiorreceptores de  $\text{O}_2$  (BURLINSON et al., 1995; JANVIER et al., 1996). Dessa forma, um possível efeito inibitório do Hg sobre o sistema serotoninérgico também poderia ter contribuído para a hipoventilação observada nas traíras expostas troficamente ao metal no presente estudo. A análise ANOVA two-way indicou que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do Hg na dieta, em elevar a  $f_R$ , e um efeito do Hg, independentemente da hipóxia, em diminuir a  $f_R$ , mostrando que os fatores Hg e hipóxia não interagem significativamente e que a hipoventilação é resultado exclusivamente da ação do Hg.

Hochachka et al. (1996) propuseram uma teoria para a tolerância de alguns tipos celulares à hipóxia, na qual a resposta celular à redução dos níveis de oxigênio ocorreria em duas fases, defesa e resgate. Na primeira fase, uma série de processos moleculares de defesa, como o declínio quase total da síntese protéica e a redução da permeabilidade da membrana citoplasmática, economizariam grande parte da energia necessária para o metabolismo celular em condições normais, permitindo a sobrevivência das células durante um período prolongado de hipóxia ou anóxia diante dos níveis extremamente baixos do “turnover” de ATP. Na segunda fase, mecanismos de sinalização com ativação de fatores chaves de transcrição, como o fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1), seriam ativados e os mecanismos da demanda e suprimento de energia para o metabolismo celular seriam suprimidos durante o período hipóxico, transformando as taxas do “turnover” de ATP durante a normóxia, em um novo e estável estado hipometabólico.

O HIF-1 é um regulador central da resposta a mudanças na concentração de O<sub>2</sub> e tem um papel importante nos processos fisiológicos e patológicos em humanos. Este fator de transcrição é expresso quando as células de mamíferos são submetidas a condições de hipóxia e ativa cerca de 70 genes alvos regulados por oxigênio (SEMENZA, 2000; WENGER & GASSMANN, 1997). Estudos recentes descreveram homólogos do HIF em peixes com funções similares àquelas dos mamíferos sobre a expressão gênica, sendo expressos em vários tecidos como fígado, coração, rins e brânquias (NIKINMAA et al., 2004; POWELL & HAHN, 2002; SOITAMO et al., 2001). Dentre essas funções destacam-se a expressão de genes envolvidos na produção de eritrócitos, vascularização, apoptose e metabolismo de carboidratos, catecolaminas e do ferro (NIKINMAA & REES, 2005) e de acordo com Soitamo et al. (2001), em truta arco-íris, a expressão do HIF ocorre dentro de 1 a 4 horas de exposição à hipóxia, coordenando rapidamente respostas compensatórias. Hipóxia e contaminação por mercúrio geralmente co-ocorrem na natureza, mas pouco se sabe sobre os efeitos interativos desses dois fatores de estresse nas populações de peixes. Por outro lado, a função do HIF em peixes pode ser sensível ao estado redox celular (NIKINMAA et al., 2004). Influências antropogênicas sobre o ambiente que causam estresse oxidativo tais como a contaminação por metais, podem prejudicar a função do HIF. Em peixes, a expressão gênica oxigênio-dependente e, possivelmente, a tolerância à hipóxia, podem ser prejudicadas pela poluição (NIKINMAA & REES, 2005). Segundo Li et al. (2006), a adição de Fe, Ni, Co e Cr divalentes atenuam a indução do HIF em resposta à hipóxia em culturas de células humanas de carcinoma de pulmão.

No presente estudo, o Hg na dieta induziu estresse oxidativo no fígado, brânquias e no coração das traíras (ver capítulo V). Além disso, a exposição a cada nível de hipóxia testada durava cerca de 40 min, totalizando aproximadamente 5 horas de experimento a hipóxia gradual. Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de que a exposição trófica e sub-crônica ao Hg tenha prejudicado, via desequilíbrio do estado redox-celular, a expressão do HIF nos diversos

tecidos da traíra frente à hipóxia gradual. Isso poderia ter contribuído para o deslocamento para baixo as curvas da  $\dot{V}O_2$ ,  $\dot{V}_G$  e do  $V_T$  de tal forma a tornar os fatores hipóxia e Hg dependentes, o que foi confirmado pelas interações significativas evidenciadas pela análise ANOVA two-way para tais parâmetros. Além disso, tal análise evidenciou um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do Hg na dieta, em diminuir a  $\dot{V}O_2$  e aumentar a  $\dot{V}_G$  e o  $V_T$  e um efeito do Hg, independente da hipóxia, em diminuir a  $\dot{V}O_2$  e a  $\dot{V}_G$  sem alterar o  $V_T$ . Este último parâmetro, nas tensões de  $O_2$  iniciais (140 a 80 mmHg), apresentou uma elevação compensatória para manter a  $\dot{V}_G$  (sendo  $\dot{V}_G = V_T \cdot f_R$ ) a níveis controle diante de uma hipoventilação e, dessa forma, contrabalanceando o deslocamento para baixo de sua curva em resposta a hipóxia gradual entre as tensões de  $O_2$  de 60 a 20 mmHg. De acordo com Nikinmaa & Rees (2005), na hipóxia, é possível a haja um papel do HIF na regulação da ventilação pelas catecolaminas, na ativação na gliconeogênese influenciando e/ou influenciando os valores de hematócrito.

#### 4.1.3 Extração de $O_2$ da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) e necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ )

A  $EO_2$  de 85% observada, em normóxia, para *H. malabaricus* no presente estudo foi semelhante a  $EO_2$  registrada por Kalinin (1991) para a mesma espécie (~83%). Quando comparada a outras espécies de peixes, os valores de  $EO_2$  encontrados pra traíra apresentam-se bem mais elevados. Em normóxia, o pacu, *P. mesopotamicus* apresenta uma  $EO_2$  de 61% (GUERRA, 1992), o curimatá, *P. scrofa* de 63% (FERNANDES et al., 1995), a carpa, *C. carpio* de 72% (SAUNDERS, 1962) e o matrinxã, *B. amazonicus* de 55% (presente estudo, capítulo XIII). Essa alta  $EO_2$  por parte da traíra é também estabelecida pelos baixos valores de necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2 \cong 230 \text{ mLH}_2\text{O.mLO}_2^{-1}$ ), encontrados em normóxia no presente estudo, representando aproximadamente metade do valor da necessidade ventilatória encontrada para o matrinxã (capítulo XIII). Segundo Kerstens et al. (1979), os elevados valores de extração de  $O_2$  resultam em uma menor necessidade ventilatória, assim como observado no presente estudo. A baixa necessidade ventilatória é energeticamente menos cara, além de oferecer um grande potencial de aumento compensatório na ventilação durante a hipóxia, uma possível adaptação para espécies tolerantes a hipóxia severa como a traíra.

O aumento da ventilação em resposta à hipóxia é frequentemente acompanhado por uma diminuição na  $EO_2$  da corrente ventilatória. Essa reduzida eficiência na troca de gases pode ter várias causas inter-relacionadas, como, por exemplo, a aumentada velocidade da água reduz o tempo de difusão e provavelmente altera a geometria das brânquias ou pode ocorrer



equiparação abaixo do ótimo entre a ventilação e a perfusão de sangue nas lamelas secundárias (KALININ, 1991; STEFFENSEN et al., 1982). Tais aumentos na  $\dot{V}_G$  acompanhados por reduções na  $EO_2$  foram observados no presente estudo para as traíras de ambos os grupos experimentais, sendo que a exposição ao Hg antecipou essa redução já na tensão de 40 mmHg contra a queda da  $EO_2$  só em 20 mmHg no grupo Ct, ou seja, o padrão de comportamento da  $EO_2$  em resposta à hipóxia depende da presença de Hg na dieta de *H. malabaricus*, como evidenciado pela análise variância ANOVA two-way que mostrou interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg, onde o Hg impediu a manutenção de uma  $EO_2$  constante até a tensão de 40 mmHg. Entre as tensões de  $O_2$  de 140 a 40 mmHg, as traíras expostas ao Hg tiveram menor capacidade de extrair  $O_2$  da água em comparação com o grupo Ct. Cabe ressaltar que as brânquias das traíras do grupo Hg apresentaram aumento na peroxidação lipídica e protéica, indicativas de injúria tecidual. A destruição celular ocasionada pelo estresse oxidativo induzido pelo Hg pode ter reduzido a eficiência na troca gasosa impossibilitando as brânquias de manter a  $EO_2$  a níveis similares ao do grupo Ct. Confirmando essa hipótese, análise two-way ainda indicou que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do Hg na dieta, e um efeito do Hg, independentemente da hipóxia, em reduzir a  $EO_2$ .

A eficiência das brânquias como órgão trocador de  $O_2$  pode ser avaliada por meio da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ), também chamada de requerimento branquial de convecção de água (DEJOURS, 1981). Aumentos no requerimento branquial em função da redução na disponibilidade de  $O_2$  do meio são indicativos da redução na eficiência de extração de  $O_2$  da corrente ventilatória, ou seja, uma maior quantidade de água deve passar pela superfície funcional respiratória para que a mesma quantidade de  $O_2$  seja obtida. No presente estudo, ambos os grupos experimentais apresentaram aumentos significativos na  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  (~ 30 vezes), não havendo diferenças entre eles na menor tensão de  $O_2$  testada (10 mmHg). A análise ANOVA two-way indicou que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do Hg na dieta, em elevar o requerimento branquial a partir da tensão de 40 mmHg, sem que haja um efeito apenas do fator Hg, independentemente dos níveis de  $O_2$  na água e uma interação significativa entre os fatores Hg e hipóxia. Entretanto, entre as tensões de 140 a 60 mmHg, as traíras expostas ao Hg apresentaram valores de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  de 20 a 46% superiores aos exibidos pelo grupo Ct, indicando que a quantidade de água que deve passar sobre as brânquias em cada hora para satisfazer a demanda média de  $O_2$  é maior que no controle já em normóxia e nas tensões hipóxicas iniciais, provavelmente devido os efeitos do Hg descritos acima. Desta forma, pode-se inferir que a contaminação trófica por Hg implica em um maior gasto energético para a troca gasosa, mesmo em normóxia.

#### 4.1.4 Pressão intra-bucal (PIB) e pressão intra-opercular (PIO)

Poucos dados estão disponíveis sobre o comportamento da PIB e da PIO frente à hipóxia gradual e/ou a exposição a contaminantes ambientais. Hughes & Shelton (1957, 1958) introduziram o conceito de que corrente respiratória é mantida pela ação de 2 bombas, uma que força a água através das brânquias (bomba de pressão bucal) e outra que puxa a água através de sua abertura (bomba de sucção opercular), sendo que o tamanho relativos das duas bombas pode ser variado. Em comparação com o matrinxã (capítulo VIII), a traíra exibiu menores valores de PIB e PIO o que provavelmente é decorrente das diferenças morfológicas do tamanho da boca e da abertura opercular exibidas por essas espécies. Sendo a pressão inversamente proporcional ao volume, é de se esperar que a traíra tenha menores valores de PIB e PIO por apresentar maiores volumes de cavidades bucal e opercular em comparação ao matrinxã. Segundo Van Wassenbergh et al. (2006), a relação quantitativa entre pico de pressão bucal e pico de velocidade da água é alterada por diferenças na morfologia craniana entre espécies. A forte relação entre os registros de atividade elétrica dos músculos respiratórios (eletromiografia) e a pressão bucal sugere que esta é provavelmente uma função direta da força de contração muscular, sendo a magnitude da pressão uma função da área da abertura bucal e da taxa de expansão bucal (WAINWRIGHT & TURINGAN, 1996). Assim, os baixos valores de PIB e PIO condizem com o baixo custo ventilatório exibido pela espécie e a alta capacidade e elasticidade em aumentar o  $V_T$  diante da hipóxia gradual. Em ambos os grupos experimentais, *H. malabaricus* apresentou elevações na PIB e PIO em hipóxia severa, o que reflete um eficiente trabalho da musculatura ventilatória mesmo abaixo da  $P_cO_2$ , estabelecendo, deste modo, a tendência observada nos resultados da  $\dot{V}_G$  e do  $V_T$ . Tal estratégia é, provavelmente, um dos fatores responsáveis pela alta tolerância à hipóxia apresentada pela traíra.

Várias observações com teleósteos sugerem que as alterações nos níveis de  $O_2$  interno e externo são fatores predominantes que afetam e estimulam a ventilação em peixes. A rápida percepção dessas variações no meio circundante é importante para os animais que habitam águas pobres em  $O_2$  ou estão sujeitos a freqüentes períodos hipóxicos, pois a eficiência da cascata de  $O_2$  depende do acionamento de mecanismos fisiológicos regulatórios como, por exemplo, as respostas ventilatórias (RANTIN et al., 1993). Alguns autores sugerem que os quimiorreceptores de  $O_2$  que controlam os reflexos cardiovasculares e ventilatórios não estão presentes apenas nas brânquias, mas sim em sítios extra-branquiais como a cavidade orobranquial (FLORINDO et al., 2006; MILSON et al., 2002). De acordo com Sundin et al. (1999), a traíra possui quimiorreceptores de  $O_2$  orientados tanto interna como externamente em todos os arcos branquiais que controlam a amplitude ventilatória e receptores de  $O_2$  extra-branquiais

sensíveis a alterações na concentração de  $O_2$  na água e que promovem aumentos adicionais na amplitude ventilatória, provavelmente inervados pelos nervos  $V$  e/ou  $VII$ . Assim, não se pode descartar a possibilidade de que quimiorreceptores localizados nas brânquias e na cavidade bucofaríngea possam regular o aumento da PIB e da PIO, de tal forma a favorecer um maior aumento da  $V_T$  em relação à  $f_R$  na elevação da  $\dot{V}_G$  no decorrer da hipóxia gradual. Os peixes expostos troficamente ao Hg apresentaram maiores valores de PIB e PIO em todas as tensões de  $O_2$  testadas, provavelmente devido a uma tentativa em aumentar o  $V_T$  a fim de manter a  $\dot{V}_G$  e o consumo de  $O_2$  quando em hipoventilação. Um dos possíveis efeitos do Hg, conforme anteriormente discutido, seria o de induzir uma hipoxemia através da sua ação em inibir a atividade da ALAD nos eritrócitos. Além disso, o Hg é capaz de se ligar na hemoglobina nos sítios de ligação do  $O_2$  reduzindo a capacidade de transporte do oxigênio (FANG & FALLIN, 1976; HUGGINS & LEVY, 1999). Essa hipótese foi reforçada pelos altos valores de PIB e PIO exibidos pelas traíras contaminadas pelo Hg, uma vez que quimiorreceptores orientados internamente ao sentirem a hipoxemia poderiam desencadear tais elevações.

Adicionalmente a análise de variância ANOVA two-way mostrou que não há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg nos valores da PIB e PIO, porém indicou que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do Hg na dieta, e um efeito do Hg, independentemente da hipóxia, em aumentar tais parâmetros a partir da tensão de  $O_2$  de 60 mmHg. Dessa forma, é provável que os quimiorreceptores orientados externamente tenham controlado o aumento reflexo da PIB e PIO frente à hipóxia gradual, enquanto que os orientados internamente, ao sentirem uma provável hipoxemia induzida pelo Hg, fizeram com que as traíras expostas apresentassem valores da PIB e PIO maiores que o controle, em todas as tensões de  $O_2$  analisadas, incluindo a normóxia (140 mmHg). Nas traíras expostas ao Hg, entre as tensões de 140 a 80 mmHg, as pressões intra-bucais (PIB) de cerca de 52-70% superiores àquelas dos animais controles e pressões intra-operculares (PIO) de cerca de 40% superiores mantiveram um elevado  $V_T$  na tentativa de manutenção do consumo de  $O_2$  e a  $\dot{V}_G$ . As elevações no  $V_T$  provavelmente foram decorrentes da estratégia da espécie em elevar a PIB e a PIO. Entretanto, nas tensões de 60 e 20 mmHg, onde os valores de  $V_T$  e  $\dot{V}_G$  apresentam-se inferiores, verificou-se uma PIB elevada em apenas cerca de 30% em relação ao controle e uma conservação da PIO em cerca de 40 % superior ao controle. Assim, nas traíras contaminadas pelo Hg, o gasto energético empregado na tentativa de acionar mecanismos compensatórios para manter a taxa metabólica a níveis controle, como uma elevação da PIB acima de 50%, não foi suportado. No presente estudo, essa menor elevação da PIB de aproximadamente 30% a partir da tensão de  $O_2$  de 60 mmHg pode ter resultado desvio para baixo das curvas da  $\dot{V}_G$  e do  $V_T$  em relação ao grupo controle.

Em peixes, o volume da cavidade bucal, pode ser aumentado pelo abaixamento da mandíbula e especialmente do assoalho da boca. Já o volume da cavidade opercular pode ser aumentado pelo movimento dos flancos opérculos enquanto que o refluxo da água ao longo das bordas é impedido por um prolongamento de pele que atua como uma válvula passiva (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). De acordo com Ballintijn (1972), os movimentos das cavidades bucal e opercular não são independentes. Há um acoplamento mecânico estreito, onde o arco hióide e especialmente o hiomandibular exercem um papel central. A contração desses músculos influencia o volume de ambas as bombas. O resultado é que não importa quais músculos são usados, o padrão de movimento não muda significativamente. Assim, a ventilação pode ser regulada não só através de uma mudança na intensidade da contração dos músculos que participam, mas também por uma mudança no número de músculos ativos. No presente estudo, as traíras expostas troficamente Hg, durante 30 dias, economizaram energia ao hipoventilarem concomitantemente com elevações da PIB, PIO e  $V_T$ , uma vez que durante uma baixa atividade respiratória, apenas alguns músculos estão ativos. Tendo em vista a grande fração do total de energia consumida nos mecanismos de desintoxicação do Hg, este mecanismo parece ter sido, em normóxia, uma adaptação frente à exposição sub-crônica ao metal, mas que não foi suficiente em manter o consumo de  $O_2$  a níveis controle.

Nas traíras expostas ao Hg, nas tensões de  $O_2$  abaixo de 60 mmHg, a menor magnitude do aumento da PIB e a conservação da amplitude da PIO em cerca de 40% superior aos níveis controle podem estar relacionados ao custo energético em acionar os diferentes grupos musculares responsáveis pelos movimento das bombas bucal e opercular. Apesar de haver um acoplamento mecânico dos movimentos das cavidades bucal e opercular, a abertura opercular basicamente é causada pelo músculo dilatador do opérculo enquanto que o abaixamento do assoalho bucal não é causado pela contração direta de um músculo ligado a mandíbula e sim por vários músculos inseridos em outros ossos e músculos e conectados a mandíbula por um grande número de ligamentos (BALLINTIJN, 1969; BALLINTIJN et al., 1972). Dessa forma, as traíras expostas ao Hg, já apresentando uma baixa taxa metabólica, não sustentaram esse gasto energético de manter elevada a PIB em valores de 52 a 70% superiores aos do grupo Ct, em baixas concentrações de  $O_2$  na água (abaixo de 60 mmHg).

## 4.2 Caracterização Eletrocardiográfica

### 4.2.1 Frequência cardíaca ( $f_H$ )

A  $f_H$  média de *H. malabaricus* em normóxia manteve-se em torno de 55 bpm, valor próximo àquele observado por Rantin et al. (1993; 1995), para a mesma espécie, de

aproximadamente 60 bpm. A  $f_H$  da traíra está próxima à verificada para espécies de peixes tropicais como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (50 bpm; RANTIN et al., 1998) e o tambaqui, *Colossoma macropomum* (48 bpm; RANTIN & KALININ, 1996) e abaixo da  $f_H$  média de espécies ativas como os atuns *Katsuwonus pelamis* e *Thunnus albacares* (BUSHNELL & BRILL, 1992; KORSMEYER et al., 1993). Em todas essas espécies, incluindo *H. malabaricus* do presente estudo, a resposta à redução da tensão de  $O_2$  foi uma bradicardia, que se tornou acentuada quando os peixes foram expostos a níveis de  $O_2$  na água próximos à tensão crítica ( $P_cO_2$ ). Durante a hipóxia ambiental, a resposta cardíaca mais frequentemente observada em peixes teleósteos é a bradicardia, acompanhada de aumento do volume sistólico conforme discutido no capítulo anterior. Farrell (1984) sugeriu que o reflexo bradicárdico produzido pela hipóxia pode ser valioso para assegurar a performance do coração durante a hipóxia do miocárdio. Assim, a redução da  $f_H$  de *H. malabaricus* nas tensões próximas da  $P_cO_2$ , tanto no grupo controle quanto no exposto ao Hg, provavelmente preserva o gasto energético do coração quando a disponibilidade do  $O_2$  se torna reduzida. Além disso, a bradicardia aumenta o tempo de residência do sangue dentro do ventrículo, o que poderia permitir um aumento da extração de  $O_2$  pelo próprio miocárdio esponjoso.

Por outro lado, em peixes resistentes a hipóxia severa, a bradicardia reflexa pode deprimir grandemente o trabalho cardíaco e o requerimento de ATP levando este último a um nível que seja suportado pela produção glicolítica de ATP eliminando, assim, a necessidade de  $O_2$  por várias horas (FARRELL, 2007). Glass et al. (1991) questionaram até que ponto a bradicardia hipóxica é apenas um reflexo compensatório e não uma consequência do sofrimento miocárdico imposto pelas baixas tensões de  $O_2$ , uma vez que a hipóxia severa é normalmente acompanhada de alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia miocárdica conforme discutido posteriormente.

Como em outros vertebrados, a frequência cardíaca de peixes teleósteos é determinada pela frequência intrínseca das células marca-passos no seio venoso e seu controle extrínseco pelo sistema nervoso autônomo ou fatores humorais (MARICONDI-MASSARI et al., 1998). A frequência cardíaca é utilizada como um índice dos efeitos tóxicos causados pelos poluentes ambientais em peixes e reduções na  $f_H$  tem sido observadas em peixes expostos a uma variedade de xenobióticos (HEAT, 1995; TEUSCHLER et al., 2005).

No presente estudo, a exposição ao Hg reduziu significativamente a  $f_H$  em todas as tensões de  $O_2$  experimentais, quando comparadas ao grupo controle. A análise two-way indicou ainda um efeito do Hg, independentemente dos níveis de  $O_2$  na água, em reduzir a  $f_H$ . Siblingrud (1990) comparando sujeitos com e sem amálgama dentária também observou que indivíduos expostos dessa forma ao Hg inorgânico apresentam uma menor frequência cardíaca. Adicionalmente, as traíras de ambos os grupos experimentais desenvolveram bradicardia em

resposta à hipóxia gradual. Entretanto, no grupo exposto ao Hg essa bradicardia teve início na tensão de  $O_2$  de 40 mmHg, enquanto que no grupo controle a bradiardia teve início somente em 20 mmHg. A análise de variância ANOVA two-way mostrou que há uma interação significativa entre os fatores hipóxia e Hg para este parâmetro, além de ter indicado que existe um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do Hg na dieta, em reduzir os valores de  $f_H$ . Dessa forma, o Hg impede a manutenção de uma  $f_H$  constante na tensão de 40 mmHg, alterando o padrão de resposta da  $f_H$  frente à hipóxia.

A frequência cardíaca ( $f_H$ ) em teleósteos é determinada pelo ritmo intrínseco do marca-passo sinoatrial, estando envolvidos nesta regulação as próprias células marca-passo, hormônios e fibras nervosas colinérgicas e adrenérgicas (FARRELL & JONES, 1992). Nesse sentido, conforme discutido anteriormente, a ação do Hg em inibir e/ou diminuir a atividade da AChE (ALVES COSTA et al., 2007; FRASCO et al., 2007) poderia explicar, ao menos em parte, os menores valores de  $f_H$  encontrados para as traíras expostas troficamente ao Hg, uma vez que a ACh ativa os receptores muscarínicos colinérgicos no nódo sinoatrial (SA) reduzindo a despolarização espontânea das células do marcapasso e diminuindo a frequência cardíaca. A inibição da AChE é particularmente crítica ao coração de peixes, já que o controle colinérgico vagal tem um papel inibitório fundamental, sendo que a modulação do tônus vagal é apontada como o principal mecanismo de controle da  $f_H$  (LAURENT et al., 1983). Como a bradicardia reflexa a hipóxia é controlada por receptores de  $O_2$  branquiais e mediada por fibras do vago (FARRELL, 2007), a inibição da AChE poderia potencializar o tônus vagal, levando a efeitos adversos na circulação sanguínea e em processos metabólicos, e provavelmente, contribuindo para o início da bradicardia já em 40 mmHg nas traíras expostas troficamente ao Hg. A inibição da função cardíaca pode interferir na tomada de  $O_2$  e a liberação de  $CO_2$  pelas brânquias e resultar em hipóxia tecidual (HUGHES, 1976).

Na literatura não há quase dados sobre o efeito do mercúrio na função cardíaca de animais, sendo que a maioria dos trabalhos relata apenas algumas alterações cardíacas exibidas por pessoas contaminadas pelo metal. Em 1929, Salant & Brodman publicaram um artigo mostrando que o mercúrio inibiu a função cardíaca em gatos num efeito parecido com a estimulação do nervo vago. Além disso, o mercúrio antagonizou o efeito da atropina sobre o coração. Grandes quantidades de atropina foram necessárias para manter a paralisia das terminações vagais no coração após a administração de mercúrio (SALANT & BRODMAN, 1929). Tais achados reforçam a idéia de inibição da AChE pelo mercúrio aumentando do tônus colinérgico vagal e, conseqüentemente, diminuindo a  $f_H$ , como observado no presente estudo nas traíras expostas ao Hg via dieta. No entanto, o efeito do Hg diretamente nos mecanismos contráteis contribuindo para redução da  $f_H$  não pode ser esquecido, conforme detalhadamente discutido no capítulo VII.

O Hg apresenta-se como fator de risco para várias doenças cardíacas tais como: doença cardíaca coronariana, hipertensão, infarto do miocárdio, acidentes cerebrovasculares, arritmias e arterosclerose generalizada (VIRTANEN et al., 2007). Tanto o Hg orgânico quanto o inorgânico se acumula no coração e é capaz de induzir disfunção mitocondrial com redução de ATP, diminuição do conteúdo de GSH e aumento da peroxidação lipídica causando estresse oxidativo (HOUSTON, 2007). Pesquisadores acreditam que um dos principais meios do Hg prejudicar o coração é através do seu efeito de induzir o estresse oxidativo (ERCAL et al., 2001; YALKO et al., 2005). O Hg promove a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), inativa antioxidantes naturais como a GSH, se liga ao selênio tornando-o indisponível como antioxidante e como co-fator da GPx. Todos esses mecanismos podem levar a um aumento na peroxidação lipídica e do estresse oxidativo e a subsequente disfunção cardíaca (HILL & SINGAL, 1996).

No presente estudo, a exposição ao mercúrio elevou significativamente os níveis de peroxidação lipídica e protéica no coração das traíras, indicando o estabelecimento de estresse oxidativo que compromete as funções celulares, além do metal ter se acumulado significativamente no miocárdio. Entretanto, em oposição aos dados acima descritos, a atividade da GPx, o conteúdo da GSH, bem como a razão GSH:GSSG, aumentaram significativamente após a exposição trófica ao Hg. Contudo, tais mecanismos compensatórios não foram eficientes em conter os danos oxidativos causados pela grande geração ERO induzidas pelo Hg. Dessa forma, as lesões oxidativas dos miócitos cardíacos podem ter sido, pelo menos em parte, responsáveis pela disfunção do miocárdio e redução da  $f_H$ . A destruição peroxidativa das membranas celulares compromete a função dos miócitos através de um aumento geral na permeabilidade aos íons, como o sódio, e, por fim, aos constituintes citoplasmáticos incluindo macromoléculas, devido à perda da integridade da dupla camada de fosfolipídios da membrana (TAYLOR & SHAPPELL, 1995). Adicionalmente, a oxidação protéica pode resultar em alterações irreversíveis, tais como formação de carbonilas, que exigem a remoção proteolítica seguida pela ressíntese da proteína afetada para a recuperação de sua função (CANTON et al., 2004) levando a diminuição e/ou inativação de atividade de enzimas e proteínas de membrana essenciais para o desenvolvimento da contração. Além disso, as modificações oxidativas diretamente na actina e tropomiosina, causam disfunção mecânica por seus papéis fundamentais na maquinaria contrátil e pelas patologias relacionadas com as suas mutações (KARIBE et al., 2001; TOWBIN & BOWLES, 2001).

A literatura ainda mostra que o Hg induz histopatologias nos miócitos cardíacos. Ratos que receberam injeções subcutâneas de  $\text{HgCl}_2$  na concentração de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  durante 21 dias, apresentaram fibrose no ventrículo esquerdo e um aumento acentuado na apoptose de miócitos (MOREIRA-RODRIGUES et al., 2010). A necropsia de um paciente contaminado acidentalmente através do consumo de carne de porcos alimentados com grãos tratados com

fungicidas contendo cloreto de etilmercúrio revelou que o miocárdio apresentou zonas de miocardite crônica intersticial com proliferação de fibroblastos (CINCA et al., 1979).

Assim, no presente estudo, o Hg pode ter lesionado o tecido cardíaco das traíras impossibilitando o funcionamento normal do coração. Alterações no trabalho cardíaco, uma baixa frequência cardíaca e uma diminuição da frequência de ventilação podem ocasionar prejuízos nos processos de fornecer O<sub>2</sub> para os diversos tecidos e órgãos (VOSYLIENÉ & KAZLAUSKIENÉ, 1999). De acordo com essa hipótese, tanto a bradicardia quanto a hipoventilação observadas, já em normóxia, nas traíras expostas troficamente ao Hg no presente estudo, acarretariam conseqüências negativas para a espécie tais como a redução da performance natatória, diminuição da atividade alimentar e da taxa de crescimento.

#### 4.2.2 Análises eletrocardiográficas

A análise interpretativa dos registros eletrocardiográficos é um instrumento que serve como base para determinar as variações elétricas que ocorrem no coração durante condições de estresse ambiental (GUERRA, 1997). Variações na morfologia, amplitude e na ordem de repolarização das ondas podem ocorrer devido a vários fatores tais como a colocação incorreta de eletrodos, lesões no miocárdio, isquemia, alterações nos sinais elétricos em respostas a perturbações ambientais, entre outros. Segundo LIU & LI (2005), diferenças na arquitetura do coração podem interferir na direção da repolarização ventricular. No entanto, devido à ampla diversidade anatômica encontrada em peixes, não existe um padrão de ondas exato para todas as espécies, conforme observado no presente estudo, no qual a caracterização eletrocardiográfica em normóxia para traíras diferiu daquela exibida pelos matrinxãs, no que se refere às durações das ondas e intervalos bem como a morfologia do traçado eletrocardiográfico. *H. malabaricus* exibiu, em normóxia, durações das ondas P, QRS e T de 93, 69 e 344, respectivamente, enquanto que *B. amazonicus* exibiu valores de 42, 66 e 167 ms para os respectivos parâmetros (ver detalhes no capítulo VIII).

A análise dos eletrocardiogramas de *H. malabaricus*, revelou que tanto a hipóxia gradual como a presença do Hg na dieta, afetou as durações dos intervalos e segmentos de ondas eletrocardiográficas. A hipóxia provocou, em ambos os grupos experimentais, reduções na duração da onda P (despolarização atrial), no intervalo P-R (tempo de condução átrio-ventricular) e no QTc (repolarização atrial e despolarização ventricular corrigido pela raiz quadrada do intervalo R-R) concomitantemente com elevações no intervalo R-R (ritmo cardíaco) e na amplitude



da onda T (repolarização ventricular). A análise de variância ANOVA two-way mostrou há um efeito da hipóxia gradual, independentemente da presença do Hg na dieta, em reduzir os valores de P, P-R e QTc e aumentar R-R e a amplitude da T. Assim, tais alterações seriam decorrentes exclusivamente da falta de um suprimento adequado de O<sub>2</sub> ao miocárdio, decorrente da própria redução do consumo de O<sub>2</sub> apresentado por *H malabaricus* durante a hipóxia severa ou mesmo de efeitos secundários desencadeados pela hipóxia gradual.

Nos peixes, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) são liberadas na circulação, a partir de células cromafins, durante numerosas situações de estresse como a hipóxia (REID et al., 1998). Segundo Barcellos et al. (2000), 60 segundos de hipóxia são suficientes para a liberação de cortisol em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). As catecolaminas aceleram a despolarização das células do nodo sino-atrial, aumentando o automatismo destes sítios (GIZZI, 1997). Isso poderia explicar a diminuição da duração da onda P e do intervalo P-R, nas traíras de ambos os grupos experimentais em hipóxia. A diminuição do tempo de despolarização atrial (onda P) foi observada apenas na menor tensão de O<sub>2</sub> testada (10 mmHg), enquanto que a diminuição da condução átrio-ventricular (intervalo P-R) foi observada a partir de 80 mmHg no grupo controle e a partir de 40 mmHg no grupo exposto ao Hg. Assim, parece que um possível aumento de liberação de catecolaminas induzido pela hipóxia, parece aumentar primeiramente o tempo de condução átrio ventricular nessa espécie, embora uma bradicardia reflexa, via nervo vago, tenha se desenvolvido em resposta à hipóxia.

Por outro lado, uma depressão momentânea do ritmo sinusal, geralmente de ação vagal, poderá produzir uma mudança de ciclo a ciclo na posição do marca-passo de escape, havendo despolarizações sinusal, atrial e juncional sequenciais. Constitui esse fenômeno um ritmo tipo "marca-passo migratório". De ciclo a ciclo, a morfologia e a polaridade da onda P modificam-se sempre em função do seu local de origem. Simultaneamente modifica-se o ciclo R-R, havendo também um progressivo encurtamento do intervalo P-R à medida que o foco caminha em direção à junção átrio-ventricular. Ocorre também de forma cíclica, um retorno às condições iniciais, ou seja, ao ritmo sinusal. Assim, o aspecto eletrocardiográfico torna-se curioso, com a onda P passando da positividade para a negatividade com morfologias intermediárias (CRANFIELD, 1975; MAIA, 1989). Isso foi observado no presente estudo, onde a onda P tornou-se bifásica no decorrer da hipóxia gradual e os intervalos R-R exibiram distâncias variadas. De acordo com Labat (1966), *apud* Aissaoui et al. (1998), a hipóxia, em teleosteos, causa um aumento da amplitude de onda T e uma diminuição na duração da onda P.

A diminuição da duração da onda P e do intervalo P-R podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com o aumento do número de arritmias observadas nas traíras do presente estudo, ao longo da hipóxia, independentemente da presença do Hg na dieta. Pode-se definir arritmia cardíaca como sendo qualquer alteração na regularidade, frequência ou local de origem

do impulso, ou toda a anormalidade na condução deste impulso, modificando a seqüência normal de despolarização do átrio e ventrículo. Portanto, uma arritmia é resultado de perturbações da geração ou condução do impulso, isolados ou em combinação (GIZZI, 1997). De acordo com Channer & Morris (2002), a isquemia do miocárdio ventricular pode ser arritmogênica e extra-sístoles são comuns. Os autores ainda ressaltam que uma bradicardia pronunciada e/ou um bloqueio átrio-ventricular decorrentes da isquemia podem provocar um ritmo de escape. Tais ritmos são resultantes da atividade espontânea de marca-passos subsidiários localizados dentro dos átrios, junção átrio-ventricular ou nos próprios ventrículos.

Mudanças na morfologia e área da onda T, bem como sua inversão, também são comuns durante a hipóxia severa em peixes. Deste modo, um aporte inadequado de O<sub>2</sub> pode causar disfunção no grupo de miócitos responsáveis por coordenar o início da repolarização. Sendo assim, a repolarização passaria a ser iniciada em outra região do miocárdio, ou grupo de miócitos. Resultados similares foram observados em tambaqui, *Colossoma macropomum* (CORREA, 1996), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (GUERRA, 1997), traíra, *Hoplias malabaricus* e trairão, *Hoplias lacerade* (RANTIN et al., 1995) sob condições de hipóxia severa. Esses autores ainda revelam uma inversão da onda T que passa de positiva, em normóxia, a negativa na hipóxia, abaixo das respectivas P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>. O presente estudo difere desses resultados uma vez que, já em normóxia, a onda T de *H. malabaricus* apresentou-se como bifásica e não como uma deflexão positiva. Essa diferença provavelmente é o resultado da utilização de sistema de aquisição de dados diferentes já que esses autores usaram eletrodos conectados a um fisiógrafo.

A isquemia miocárdica provoca alterações na onda T e no segmento S-T, mas ao contrário de um infarto do miocárdio não tem efeitos diretos sobre o complexo QRS, apesar de isquemia poder dar origem a bloqueios de ramo, o que prolonga o complexo QRS (CHANNER & MORRIS, 2002). A isquemia miocárdica pode afetar a morfologia da onda T em uma variedade de formas: as ondas T podem se tornar altas, achatadas, invertidas, ou bifásicas. Em traíra, a onda T bifásica teve sua amplitude aumentada, principalmente em hipóxia severa sem alterações no segmento S-T. Por outro lado, em carpas, reduções nas tensões de O<sub>2</sub> abaixo de 30 mmHg, resultaram em inversão da onda T e redução de sua amplitude e extra-sístoles atriais e ventriculares (RANTIN, 1993). Ainda segundo Channer & Morris (2002), cerca de 20% dos pacientes com depressão do segmento S-T e 15% com inversão de onda T vão experimentar angina grave, infarto do miocárdio ou morte dentro de 12 meses após a sua apresentação inicial, em comparação com 10% dos pacientes com um traço normal. Além disso, as alterações no segmento S-T e ondas T não são específicas para a isquemia, mas também podem ocorrer em associação com várias outras doenças, como a hipertrofia do ventrículo e hipocalemia.

No presente estudo, a hipóxia gradual também provocou um aumento do intervalo R-R e, conseqüentemente, uma redução do QTc, já que o intervalo Q-T não apresentou alteração

significativa no decorrer da hipóxia gradual e o QTc é função inversa da raiz quadrado do intervalo R-R. A bradicardia é comumente observada em peixes como um reflexo compensatório à hipóxia e os benefícios dessa bradicardia foram anteriormente discutidos. Quimiorreceptores de O<sub>2</sub> localizados nas brânquias são estimulados pela hipóxia e disparam seu reflexo através do ramo do vago cardíaco constituído de fibras colinérgicas diminuindo a  $f_H$  (RANTIN et al., 1995). Como descrito por Wardle & Kanwisher (1974) e Aissaoui et al. (1998), mudanças na  $f_H$  são atingidas principalmente por alterações no intervalo T-P. Apesar desse intervalo não ter sido avaliado no presente estudo, como não houve alterações no intervalo Q-T e no segmento S-T frente à hipóxia nas traíras de ambos os grupos experimentais, é possível que as alterações nos intervalos T-P tenham sido responsáveis pelo aumento do intervalo R-R no decorrer da hipóxia gradual. A atividade vagal sobre o tecido marcapasso nodal é provável que seja responsável pelo alongamento do intervalo T-P por hiperpolarização (Agnarsson et al., 1988).

Por outro lado, foi possível observar que a exposição trófica ao Hg, independentemente da hipóxia (evidenciado pela análise two-way), aumentou o intervalo R-R entre as tensões de O<sub>2</sub> de 140 a 20 mmHg, provavelmente devido à ação inibitória deste metal na AChE, potencializando o tônus vagal, conforme anteriormente discutido. A análise da frequência cardíaca normalmente envolve medidas da variabilidade do intervalo R-R (VILKMAN et al., 1999), pois o tônus autonômico influencia também a duração tanto do intervalo R-R quanto do intervalo Q-T (KORNITZER, 2001; WHITSEL et al., 2001). Os maiores valores de intervalo R-R apresentados pelos peixes tratados com Hg na maioria das tensões de O<sub>2</sub> testadas estão em concordância com os menores valores de frequência cardíaca ( $f_H$ ) registrados para este grupo. Desta forma, os fatores responsáveis pela diminuição da frequência cardíaca devem ser os mesmos responsáveis pelo aumento no intervalo R-R.

Em traíras, a exposição trófica ao Hg, independentemente da hipóxia (conforme revelado pela análise two-way), também promoveu aumentos na duração da onda P, na duração e na amplitude do complexo QRS e nas durações dos intervalos P-R, Q-T e S-T, além de reduções na duração e na amplitude da onda T. Um aumento na duração da onda P representa um maior tempo para a despolarização atrial, enquanto que um intervalo P-R ou A<sub>APD</sub> prolongado indica uma grande distância e uma baixa velocidade de condução do átrio até o ventrículo podendo caracterizar um bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau. O bloqueio de primeiro grau é definido como um retardo da condução do átrio para o ventrículo, sem verdadeiro bloqueio de condução (GUYTON & HALL, 2002). Já um complexo QRS de longa duração indica que a despolarização propaga-se lentamente pelo ventrículo e/ou que há um alargamento ventricular (GUERRA, 1997). Como as traíras exibiram uma redução da massa ventricular relativa (MVR) após a exposição trófica e sub-crônica ao Hg (capítulo VI), a hipótese de alargamento ventricular como causa do aumento da duração do complexo QRS pode ser descartada. Assim, a presença do Hg na dieta

de traíras provavelmente afeta os tecidos de condução cardíacos tanto do átrio como do ventrículo. Segundo Kojima et al. (2004), um aumento na duração do complexo QRS indica uma redução da ação contrátil do ventrículo. Tal fato foi corroborado pelo presente estudo que mostrou que as traíras expostas troficamente ao Hg apresentaram redução significativa na força de contração do músculo cardíaco isolado (ver detalhes no capítulo VI).

Os efeitos do Hg descritos acima podem ser explicados possivelmente por sua ação em inibir a AChE aumentando estimulação colinérgica no coração. A acetilcolina reduz a velocidade de despolarização das células do nódulo sino-atrial e dos tecidos especializados de condução atrial, diminuindo não só a frequência sinusal, como a de outros marcapassos potenciais nos átrios e junção átrio-ventricular. Ao nível do nódulo átrio-ventricular, a acetilcolina reduz a amplitude máxima do potencial de ação e diminui a velocidade de ascensão do potencial de ação, sem modificar o potencial de repouso da membrana, contribuindo para a redução da propagação do impulso; provocando simultaneamente, aumento do seu período refratário efetivo (GIZZI, 1997). Utilizando corações isolados de rato perfundidos pela técnica de Langendorff, Massaroni et al. (1995) também registraram redução da frequência acompanhada de aumento do tempo de condução átrio-ventricular (elevação do P-R) após exposições a 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ .

O segmento S-T foi o que sofreu alteração pronunciada com a presença de Hg na dieta, sendo o grande responsável pelas diminuições na  $f_H$ , por alterar significativamente o tempo para que o ventrículo iniciasse a repolarização. O segmento S-T é normalmente isoelétrico e corresponde à fase na qual todo o ventrículo está despolarizado, correspondendo à fase de platô do potencial de ação (P.A.) ventricular (FELDMAN & GOLDWASSER, 2004). Segundo DRIEDZIC & GESSER (1994), um P.A. mais duradouro resulta na manutenção de um potencial de membrana positivo e, conseqüentemente, na maior permanência dos canais de cálcio voltagem-dependentes no estado aberto. Rossi et al. (1993) realizando experimentos com “patch-clamp” em células PC12 revelaram que concentrações de 50 e 300 nM de  $\text{Hg}^{2+}$  aumentaram a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L, ampliando a concentração transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por outro lado, de acordo com Hool (2007), altas concentrações de ERO, como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podem aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ao oxidar os canais do tipo L. Dessa forma, o Hg provavelmente aumentou o platô do P.A. cardíaco em traíras por sua ação em aumentar a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L da sarcolema e/ou por induzir o estresse oxidativo.

Os mecanismos moleculares pelos quais o Hg induz alterações nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma interação direta do Hg com grupamentos sulfidrilas (-SH) no interior do canal pode alterar suas propriedades ou ainda induzir mudança no estado de fosforilação por sua ação em quinases e fosfatases (ROSSI et al., 1993). Tais hipóteses são corroboradas pelos resultados mostrados e discutidos no capítulo VI, onde houve um aumento na taxa de contração das tiras ventriculares das traíras expostas troficamente ao Hg no

protocolo da potenciação pós-pausa na presença de rianodina, ou seja, quando só a sarcolema é responsável pela primeira contração após uma pausa diastólica não fisiológica, sugerindo uma maior entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do tipo L (para detalhes ver capítulo VI).

Por outro lado, a duração da repolarização (onda T) do ventrículo das traíras foi encurtada pela presença do Hg na dieta. A repolarização dos miócitos cardíacos requer o funcionamento normal de canais, receptores e proteínas do citoesqueleto (MILAN et al., 2006). Jungwirth, et al. (1991) mostraram que o mercúrio inorgânico aumenta a condutância do potássio na membrana de células renais. Assim, o Hg parece facilitar a repolarização ventricular possivelmente por aumentar a condutância dos canais de  $\text{K}^+$ , apesar de um suposto aumento do tônus colinérgico pelo efeito do Hg em inibir a AChE. Cabe ressaltar que a acetilcolina atua sobre os canais de potássio, tornando a repolarização mais lenta. Entretanto, no presente trabalho a bradicardia induzida pela presença de Hg, parece ter sido predominantemente o resultado de maiores intervalos entre os ciclos cardíacos (intervalos T-P) do que em decorrência de uma repolarização mais lenta. Assim, a acetilcolina parece atuar predominantemente na redução da despolarização espontânea das células do marcapasso, diminuindo a frequência cardíaca.

O Hg pode aumentar a condutância dos canais de  $\text{K}^+$  ou por sua ligação direta a resíduos de  $-\text{SH}$  do canal ou pelo aumento da produção de ERO também capazes de oxidar tais grupamentos. De acordo com Ichinari et al. (1996) e Liu & Gutterman (2002), as ERO, tais como o ânion  $\text{O}_2^{\bullet -}$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aumentaram a permanência de abertura dos canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP, provavelmente devido a oxidação dos grupamentos sulfidrilas. Dessa forma, o próprio estresse oxidativo induzido no coração das traíras pela presença do Hg na dieta provavelmente foi o responsável pela redução da duração da repolarização ventricular. Conforme estudado por VASSALO et al. (1999), em baixas concentrações, o Hg pode ainda apresentar um efeito digitálico-símile. Os digitálicos apresentam basicamente dois efeitos: inotropismo positivo e cronotropismo negativo. O inotropismo positivo é decorrente da ação do digitálico em diminuir a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, o que levaria a um aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular, diminuindo a eficácia do mecanismo do trocador NCX. Essa redução no gradiente transsarcolemal de  $\text{Na}^+$  reduziria a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ , elevando sua concentração intra-citoplasmática, favorecendo o aumento da força de contração.

No presente estudo, as análises *in vitro* das tiras ventriculares das traíras expostas troficamente ao Hg mostraram uma redução de cerca de 20% na força de contração (capítulo VI). Entretanto, essa diminuição da força de contração não descarta a presença de inotropismo positivo como efeito digitálico-símile do Hg, uma vez que reduções de cerca de 50 % na força de contração foram observadas para as tiras ventriculares dos matrinxãs expostos ao  $\text{HgCl}_2$ , via água, tipo de exposição que levou a um maior acúmulo de Hg no miocárdio em comparação com a exposição trófica em traíras. Adicionalmente outros efeitos do Hg, como o próprio

estabelecimento do estresse oxidativo, pode ter sobreposto esse possível efeito digitálico-símile do Hg sobre a força de contração. Já o cronotropismo negativo ocorre por três mecanismos: i) diminuição da velocidade de condução no nódo átrio-ventricular: na fisiologia normal, há uma pausa de milissegundos do estímulo elétrico nódo átrio-ventricular e os digitálicos aumentam esta pausa, pelo mesmo motivo de aumentar o tempo de despolarização da célula, fazendo com que haja uma diminuição da frequência cardíaca; ii) aumento do estímulo vagal no nódo sinusal: o digitálico diminui da geração de estímulos elétricos no nódo sinusal, provocando também uma diminuição da frequência cardíaca; iii) aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular que reduz a atividade funcional das junções “gap” prejudicando o acoplamento elétrico entre os miócitos.

Tais hipóteses corroboram os resultados do presente estudo, onde a exposição ao Hg produziu em traíras aumentos na duração da onda P, intervalo P-R, complexo QRS e diminuição da  $f_H$  simultaneamente a uma repolarização ventricular mais rápida. Outras características de uma intoxicação por digitálicos são bloqueios átrio-ventriculares de primeiro grau e arritmias (GUYTON & HALL, 2002). Arritmias foram detectadas nas traíras expostas ao Hg já em normóxia, diferentemente do grupo Ct onde as arritmias foram observadas principalmente em hipóxia severa. Em miócitos cardíacos a geração de EROs e a alteração da homeostase redox podem contribuir para a instabilidade eletrofisiológica do miocárdio e para o desenvolvimento de arritmias (AKAR et al., 2005; HOOL, 2007). Isso corrobora os resultados observados no capítulo VII, onde as tiras ventriculares das traíras expostas troficamente ao Hg exibiram inúmeras contrações espontâneas, que podem ser decorrentes do aumento da condutância dos canais de  $K^+$  induzida pelo aumento da produção de EROs ou de lesões induzidas pelo Hg nos tecidos marca-passos.

O intervalo Q-T ( $V_{APD}$ ) do eletrocardiograma é medido do início do complexo QRS ao fim da onda T e representa a duração da despolarização e repolarização ventricular, ou seja, é a duração total da atividade elétrica ventricular (BATEY & DOE, 2001). A  $V_{APD}$  está negativamente correlacionada com a frequência cardíaca, tornando-se menor à medida que a  $f_H$  aumenta e vice-versa (FELDMAN & GOLDWASSER, 2004). Isso se deve ao fato de que quanto maior a frequência cardíaca, maior a velocidade da despolarização e da repolarização da membrana celular. A repolarização ventricular pode ser diretamente afetada por drogas e pelo estado autonômico ou por meio de seus efeitos na frequência cardíaca ( $f_H$ ) (FOSSA et al., 2005), bem como por desordens eletrolíticas (PUEYO et al., 2004).

Muitas substâncias causam modificações na  $V_{APD}$ , afetando diretamente a repolarização (por meio da inibição de canais iônicos), modificando endogenamente o tônus autonômico, ou pela combinação de ambos os fatores (FOSSA et al., 2005). No presente estudo, o Hg parece prejudicar predominantemente o tônus autonômico cardíaco, já que a repolarização ventricular, denotada pela duração da onda T, foi diminuída. Em um grupo de trabalhadores da

Alexandria expostos ocupacionalmente ao Hg, o aumento dos níveis sanguíneo e urinário do Hg foi associado com o prolongamento do intervalo Q-T nos eletrocardiogramas (ABDEL-HAMID et al., 2001). Anormalidades cardíacas tais como pulso irregular, batimentos ventriculares ectópicos e prolongamento do intervalo Q-T também foram observadas em pacientes após a exposição ao etilmercúrio (JALILI & ABBASI, 1961).

A  $V_{APD}$  corresponde à somatória do complexo QRS (despolarização dos ventrículos), do segmento ST (que corresponde ao fim da onda S até o início da onda T) e da onda T (repolarização atrial). No presente estudo, pode-se observar que, as traíras expostas ao Hg apresentaram valores médios do segmento S-T e durações do complexo QRS significativamente superiores aos do grupo controle. Entretanto, houve encurtamento na duração da onda T e nenhuma alteração do intervalo J-T sugerindo um alargamento da fase inicial de repolarização ventricular e um encurtamento da fase final desta repolarização. Assim, provavelmente o aumento do  $V_{APD}$  no grupo exposto ao Hg deve estar relacionado aos maiores valores do segmento S-T deste grupo, ou seja, a um prolongamento do platô do P.A.

A amplitude do sinal elétrico registrado no ECG depende da transmissão da corrente elétrica até a superfície corporal. Se o impulso se aproxima do eletrodo, registra-se uma deflexão positiva. Ao contrário, uma deflexão negativa significa que a corrente provocada pelo impulso elétrico se afasta do eletrodo. As forças podem ser representadas por vetores. O sentido do vetor é determinado pelo sentido do potencial elétrico gerado pelo fluxo da corrente, enquanto o seu comprimento é proporcional à voltagem do potencial (CHAVES, 2001). No presente estudo, as traíras expostas ao Hg apresentaram complexos QRS invertidos, em sua maioria, e de amplitudes maiores e ondas T de amplitudes menores em relação aos controles. Apesar de análises vetoriais não terem sido realizadas, tais resultados parecem indicar um aumento da voltagem e/ou deslocamento do eixo elétrico médio do coração das traíras expostas ao Hg.

De acordo com Yoshikawa et al. (1988), o estresse altera a direção do eixo elétrico no coração de teleósteos. O Hg provavelmente modifica o eixo de despolarização ventricular por tornar a condução do impulso irregular. Se a condução do impulso se torna irregular devido a bloqueios pequenos, múltiplos e locais, na condução dos impulsos, haverá variações na voltagem e desvios do eixo (GUYTON & HALL, 2002). Em pintinhos, a exposição crônica ao Hg na concentração de  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  na água de beber, também promoveu uma redução na amplitude da onda T (BRAKE et al., 1977). Os autores ressaltam que uma possível causa seria a ação do Hg em inibir  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase e, portanto, o transporte ativo de íons potássio e sódio ou até mesmo, um efeito direto do Hg na inibição da respiração celular e metabolismo energético e, dessa forma, prejudicando a propagação normal dos impulsos elétricos.

## 5. CONCLUSÕES

Levando em consideração todos os mecanismos acima discutidos e os resultados obtidos no presente trabalho, os efeitos do Hg sobre a função cardio-respiratória de *H. malabaricus* são sumarizados no esquema proposto na figura 12.

A contaminação sub-crônica e alimentar por mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) foi capaz de induzir profundas modificações nas variáveis respiratórias e nos parâmetros cardíacos de traíra promovendo, em normóxia, hipoventilação, redução da taxa metabólica e da extração de  $\text{O}_2$  da corrente ventilatória, aumento da necessidade ventilatória e das pressões bucal e opercular, bradicardia com prejuízo na condução elétrica retardando a despolarização atrial e ventricular, causando uma bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau e prolongando o platô do P.A. do músculo cardíaco, impossibilitando, assim, o funcionamento normal da bomba cardíaca.

A exposição trófica ao Hg também foi capaz de modular o padrão de resposta das variáveis cardio-respiratórias frente à hipóxia gradual, tornando a espécie, que é tolerante e bem adaptada a hipóxia, mais susceptível. O Hg na dieta tornou as traíras incapazes de elevar a níveis controle a ventilação branquial e o volume ventilatório, nas tensões entre 60 a 20 mmHg, reduzindo consideravelmente a magnitude do aumento desses parâmetros e impedindo, dessa forma, a manutenção de uma resposta ventilatória normal frente a hipóxia. O Hg ainda duplicou o valor da tensão crítica de  $\text{O}_2$  e reduziu a capacidade de manter a taxa metabólica, a extração de  $\text{O}_2$  da corrente ventilatória e a frequência cardíaca constantes até a tensão de 40 mmHg.

Tais resultados sugerem que a exposição trófica ao Hg prejudica a função cardíaco-respiratória e a plasticidade exibida pela espécie em tolerar ambientes hipóxicos, o que pode limitar as chances de sobrevivência das traíras em seus habitats naturais, considerando que *H. malabaricus* comumente habita águas hipóxicas e frequentemente sujeitas à contaminação mercurial.



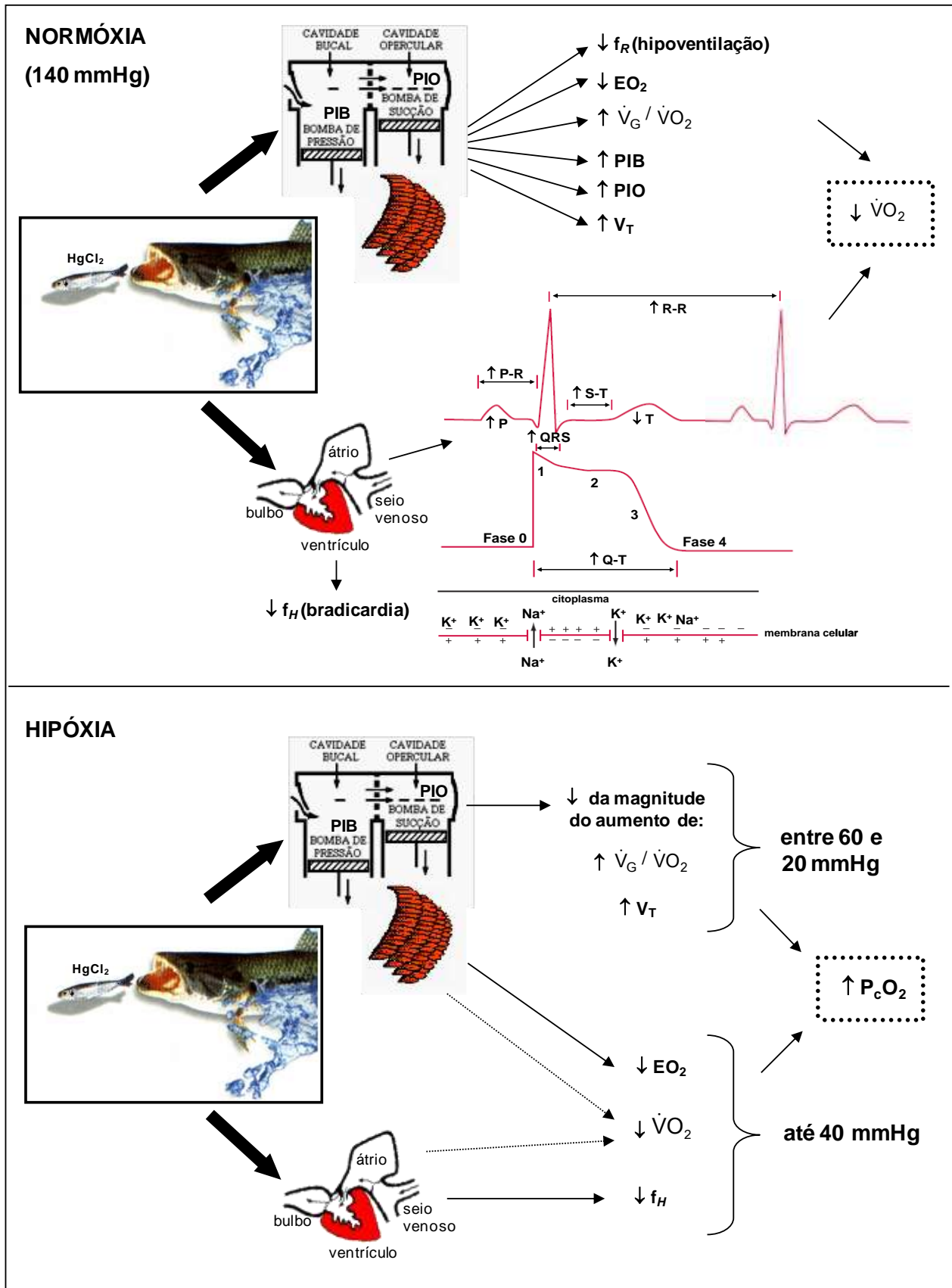


Figura 12 - Diagrama ilustrativo dos possíveis efeitos da exposição trófica e sub-crônica ao Hg no sistema cardio-respiratório de traíra, *H. malabaricus*.

# **CAPÍTULO X**

## **Considerações Finais**



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da diminuição das fontes pontuais nas últimas três décadas e de uma legislação ambiental mais rígida, a contaminação ambiental por mercúrio é uma realidade, nos ecossistemas aquáticos. Além disso, a grande quantidade de mercúrio emitida por atividades humanas no último século encontra-se, em várias situações, passíveis de remobilização por processos antrópicos, naturais e também pelas variações climáticas globais e mudanças nos usos dos solos e dos recursos hídricos.

No Brasil, os riscos da contaminação mercurial ainda são pouco avaliados e controlados e as normas brasileiras que regulamentam os valores-limites para exposição ocupacional e ambiental são baseadas, predominantemente, em normas e estudos internacionais. Em relação à integridade dos ecossistemas aquáticos, vale ressaltar que tais critérios internacionais são definidos em condições abióticas (temperatura, dureza, alcalinidade, etc) totalmente diferentes das tropicais e utilizando espécies nativas e adaptadas a regiões de clima temperado.

O painel global dos efeitos biológicos do mercúrio em humanos e animais demonstra que, estes compostos apresentam conseqüências suficientemente graves que merecem ser cada vez mais investigadas. Estudos como o presente deverão servir como modelos para manter a integridade de peixes brasileiros. Os peixes são importantes recursos vivos, seja pelo seu potencial comercial, já que em vários países são a principal fonte de proteína da população, seja pelo aspecto ecológico, não menos importante para os ecossistemas aquáticos. Adicionalmente, os peixes representam a principal via de exposição dos seres humanos ao mercúrio através da contaminação alimentar.

Esta tese apresenta um caráter inovador uma vez que analisa a função cardio-respiratória em normóxia e frente à hipóxia gradual após a exposição ao Hg por diferentes vias de contaminação, combinada aos resultados de bioacumulação nos diferentes tecidos e aos efeitos deste metal sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e sobre a contratilidade miocárdica, fornecendo, assim, um panorama geral e bastante completo sobre as alterações fisiológicas causadas pelo Hg em duas espécies muito relevantes na ictiofauna brasileira. Tratou-se de uma oportunidade única para a avaliação de tais parâmetros, nunca antes estudados, além de abrir a oportunidade para futuros estudos que investiguem os efeitos do Hg.

Em termos de contribuição, os dados obtidos com os capítulos integrantes da presente tese fornecem a base relevante para novos estudos com as espécies *Brycon amazonicus* e *Hoplias malabaricus*, além de gerarem novas questões sobre os efeitos do mercúrio que exigem uma investigação mais aprofundada. Adicionalmente, os capítulos esclareceram os mecanismos de ação do mercúrio em duas espécies de peixe ecologicamente distintas, na

tentativa de elucidar lacunas ainda não preenchidas a respeito dos potenciais danos deste metal sobre a ictiofauna e, conseqüentemente, fornecer subsídios para sua preservação.

A exposição aguda e sub-crônica a concentrações sub-letais de mercúrio inorgânico, via água ou via alimento, induziu estresse oxidativo e prejudicou as respostas cardíoro-respiratórias frente à hipóxia e a contratilidade miocárdica de ambas as espécies. Tais resultados, isolados ou interligados, podem contribuir para o entendimento das várias patologias relacionadas à contaminação pelo metal. Além disso, o mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ), conhecido por ter baixo potencial de bioacumulação, biconcentrou-se nos tecidos de matrinxã e biomagnificou-se nos tecidos de traíra expostos ao Hg por diferentes vias (água e alimento), mostrando que a forma inorgânica também é capaz de se bioacumular através dos níveis tróficos, mesmo com uma menor eficiência quando comparada com as formas orgânicas do Hg. A totalidade dos resultados alcançados com este trabalho possibilitou a comprovação de que mercúrio, mesmo na sua forma inorgânica e em doses sub-letais, tem potencial de se bioconcentrar e biomagnificar ao longo da cadeia trófica.

O maior impacto desta tese advém de sua abordagem holística empregando diversos biomarcadores (fisiológicos e bioquímicos) na avaliação de múltiplos “endpoints”, contribuindo sobremaneira para o entendimento dos efeitos do Hg inorgânico, uma vez que a maioria dos xenobióticos afeta o balanço homeostático dos organismos como um todo. Os “endpoints” acima mencionados apontam para conseqüências negativas sobre a ecofisiologia das espécies estudadas, pois os diferentes tipos de exposição ao Hg podem tornar as espécies mais susceptíveis, reduzindo a sua plasticidade em tolerar situações como ambientes hipóxicos, migração na época reprodutiva e até mesmo a performance predatória. Tais fatores podem limitar as chances de sobrevivência e sucesso, aumentando a vulnerabilidade das populações o que acarretará, por sua vez, uma redução na abundância e diversidade de espécies.

O aporte crescente em corpos d'águas de substâncias tóxicas, como os metais, traz à tona a necessidade de que os efeitos destes compostos na biota sejam avaliados com intuito de analisar os danos causados e evitar que estas conseqüências atinjam níveis mais altos de organização ecológica. Estudos *in vivo* e *in vitro* em laboratório utilizando doses realísticas são importantes do ponto de vista toxicológico, pois permitem obter dados sem as interferências ambientais. Estas informações podem ser utilizadas para auxiliar o monitoramento ambiental, desde que observadas às variações e realizadas as devidas adaptações. Futuros estudos utilizando biomarcadores *in situ* em regiões afetadas pela presença do mercúrio poderão complementar este trabalho, resultando em um diagnóstico mais completo dos efeitos do mercúrio e seus derivados nas espécies estudadas, nativas do Brasil.



## **Referências Bibliográficas**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MID, H.A.; FAHMY, F.C., SAHAF, I.A. Influence of free radicals on cardiovascular risk due to occupational exposure to mercury. **J. Egypt Public Health Assoc.**, v. 76, p. 53-69, 2001.
- ABEDIN, Z.; CONNER, R. **ECG Interpretation**. The Self-Assessment Approach. 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, 2008. 233 p.
- ABRAMSON, J.J.; SALAMA, G. Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. **J. Bioener. Biomech.**, v. 21, p. 283-284, 1989.
- ACPO - **Associação de Combate aos Poluentes**, 2006. Disponível em: <[http://www.acpo.org.br/campanhas/mercúrio/relatório\\_mercado\\_portugues.pdf](http://www.acpo.org.br/campanhas/mercúrio/relatório_mercado_portugues.pdf)>. Acesso em: 05 nov. 2010.
- ADAD, J.M.T. **Controle químico de qualidade**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 204 p.
- ADAMS, S.M.; GREELEY, M.S. Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. **Water Air Soil Poll.**, v. 123, p. 103-115, 2000.
- AEBI, H. Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. London, New York: Academic Press, 1974. p. 671-684.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ASTDR). **Toxicological profile for mercury**. Atlanta: U.S.Public Health Service, 1989.
- AGNARSSON, U.; TAJIMA, T.; PAPPANO, A.J. Carbachol depolarizes and accelerates pacemaker activity in the sinoatrial node of chicks treated with pertussis toxin. **J. Pharmacol. Exper. Therap.**, v. 247, p. 150-155, 1988.
- AGUIAR L.H.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of temperature on the cardio-respiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 299-308, 2002.
- AHAMMAD-SAHIB, K.I. et al. Isoproterenol potentiation of methylmercury effects in vivo on cardiac ATPases and <sup>3</sup>H-dopamine uptake. **Bull. Env. Cont. Toxicol.**, v. 40, p. 249-254, 1988.
- AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1519, p. 37-48, 2000.
- AIDA, K. et al. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cultured myocytes from adult rat heart. **FASEB J.**, v. 4, p. A1142, 1990.
- AISSAOUI, A.; ALTIMIRAS, J.; TORT, L. Cardiac conduction times in *Sparus auratus* at different heart rates. Influence of body weight. **J. Fish Biol.**, v. 52, p. 1154-1164, 1998.
- AKAGI, H. et al. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **Sci Total Environ.**, v. 175, p. 85-95, 1995.
- AKAR, F.G. et al. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 3527-3535, 2005.
- ALAM, M.K.; MAUGHAN, O.E. Acute toxicity of heavy metals to common carp (*Cyprinus carpio*). **J. Environ. Sci. Health**, v. 30, p. 1807-1816, 1995.
- ALAM, M.K.; MAUGHAN, O.E. The effect of malathion, diazinon, and various concentrations of zinc, copper, nickel, lead, iron, and mercury on fish. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 34, p. 225-236, 1992.

- ALANARA, A. et al. Feeding behaviour, brain serotonergic activity levels, and energy reserves of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) within a dominance hierarchy. **Can. J. Zool.**, v. 76, p. 212-220, 1998.
- ALDERSON, B.H., FEHER, J.J. The interaction of calcium and ryanodine with cardiac sarcoplasmic reticulum. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 900, p. 221-229, 1987.
- ALHO, C.J.R.; VIEIRA L.M. Fish and wildlife resources in the Pantanal wetlands of Brazil and potential disturbances from release of environmental contaminants. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 16, p. 71-74, 1997.
- ALINNOR, I.J. Assessment of elemental contaminants in water and fish samples from Aba River. **Environ. Monit. Assessm.**, v. 102, p. 15-25, 2005.
- ALLEN, D.; KENTISH, J. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 9, p. 821-840, 1985.
- ALMEIDA, J.A. et al. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environ. Intern.**, v. 27, p. 673-679, 2002.
- ALMEIDA, V.L.L.; HAHN, N.S.; VAZZOLER, A.E.A.M. Feeding patterns in five predatory fishes of the high Paraná River floodplain (PR, Brazil). **Ecol. Freshw. Fish**, v. 6, p. 123-133, 1997.
- ALMROTH, B.C. et al. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyl and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicol.**, v. 73, p. 171-180, 2005.
- ALMROTH, B.C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FORLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyl and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicol.**, v. 73, p. 171-180, 2005.
- ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L. Is the short-term modulation of heart rate in teleost fish physiologically significance? Assessment by spectral analysis techniques. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n. 28, p. 1197-1206, 1995.
- ALVES COSTA, J.R. et al. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 67, p. 82-88, 2007.
- AMARAL, S.M.C. et al. Inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina pelo mercúrio. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 67, p. 14, 1996.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). Report of the AVMA panel on euthanasia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 218, n. 5, p. 670-696. 2001.
- AMLUND, H.; LUNDEBYE, A.K.; BEMTSEN, M.H.G. Accumulation and elimination of methylmercury in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) following dietary exposure. **Aquatic Toxicol.** v. 83, p. 323-330, 2007.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Met. Enzymol.**, v. 113, p. 548-555, 1985.
- ANDRES, S.; LAPORTE J.M.; MASON, R.P. Mercury accumulation and flux across the gills and the intestine of the blue crab (*Callinectes sapidus*). **Aquatic Toxicol.**, v. 56, p. 303-320, 2002.
- ANELLI Jr, L.C. **Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup® sobre a função cardiorespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae)**. 2010. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

- ANELLI-Jr, L.C. et al. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887-Teleostei, Serrasalminae). **J. Therm. Biol.**, v. 29, p. 103-113, 2004.
- ANELLI-Jr., L.C. **Função cardíaca do teleósteo tropical *Piaractus mesopotamicus*, submetido a diferentes condições térmicas.** 2002. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- ANELLI-Jr., L.C. **Função cardíaca do teleósteo tropical *Piaractus mesopotamicus*, submetido a diferentes condições térmicas.** 2002. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- ANNER, B.M. The receptor functions of the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase system. **J. Biochem.**, v. 277, p. 1-11, 1985.
- ANNER, B.M.; MOOSMAYER, M.; IMESCH, E. Mercury blocks the Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. 830-836, 1992.
- AOAC. Mercury (Methyl) in Fish and Shellfish: Rapid Gas Chromatographic Method. Sec. 9.2.27, Method 988.11. In: CUNNIFF, P.A. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 16<sup>th</sup> ed. Meryland, USA: AOAC. Internacional, 1995. p 24-25.
- AOKI, T.; OBA, T.; HOTTA, K. Hg<sup>2+</sup> - Induced contracture in mechanically fibers of frog skeletal muscle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 63, p. 1070-1074, 1985.
- ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações.** São Carlos, São Paulo: Rima Editora, 2006. p. 117-152.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G.A.; MORAES, G. Interação do exercício de natação sustentada e da densidade de estocagem no desempenho e na composição corporal de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Cienc. Rural**, v. 39, p. 201-208, 2009.
- ASCHNER, M. Neurotoxic mechanisms of fish-borne methylmercury. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 12, p. 101-104, 2002.
- ATCHISON, W.D.; HARE, M.F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. **FASEB J.**, v. 8, p. 622-629, 1994.
- AURELIANO, M. et al. Oxidative stress in toadfish (*Halobatrachus didactylus*) cardiac muscle: acute exposure to vanadate oligomers. **J. Inorg. Biochem.**, v. 90, p. 159-165, 2002.
- AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio.** São Carlos: Rima Editora. São Paulo: Intertox, 2003. 292 p.
- AZEVEDO, P.; GOMES, A.L. Contribuição ao estudo da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Bol. Ind. Animal**, v. 5, p. 15-64, 1943.
- BABER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Am. Pharm.**, v. 34, p. 26-35, 1994.
- BAGNASCO, M. et al. Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. **Mutat. Res.**, v. 262, p. 129-137, 1991.
- BAILEY, J.R.; DRIEDZIC, W.R. Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimatation. **J. Exp. Biol.**, v. 149, p. 239-254, 1990.



- BAINY, A.C.D. Oxidative stress as biomarker of polluted aquatic sites. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 101-110.
- BAINY, A.C.D.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir Sao Paulo, Brazil. **Aquat. Toxicol.**, v. 44, p. 289-305, 1999.
- BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, p. 689-694, 2002.
- BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Biliary transport of glutathione and methylmercury. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 435-441, 1983.
- BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Dependence of biliary secretion of inorganic mercury on the biliary transport of glutathione. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, p. 1093-1098, 1984.
- BALLINTIJN, C.M. Efficiency, mechanics and motor control fish respiration **Resp. Physiol.**, v. 14, p. 125-141, 1972.
- BALLINTIJN, C.M. Functional anatomy and movement co-ordination of the respiratory pump of the carp (*Cyprinus carpio*). **J.Exp. Biol.**, v. 50, p. 547-567, 1969.
- BALLINTIJN, C.M.; HUGHES, G.M. The muscular basis of the respiratory pumps in the trout. **J. Exp. Biol.**, v. 43, p. 349-362, 1965.
- BALSHAW, D.M. et al. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 20144-201153, 2001.
- BALSHAW, S. et al. Mercury distribution in the muscular tissue of farmed southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) is inversely related to the lipid content of tissues. **Food Chem.**, v. 111, p. 616-621, 2008.
- BANDO, I. et al. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 19, p. 154-161, 2005.
- BANERJEE, B.D. The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals. **Toxicol. Lett.**, v. 107, p. 21-31, 1999.
- BANO, Y.; HASAN, M. Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of catfish *Heteropneustes fossilis*. **J. Environ. Sci. Health**, v. 24, p. 145-166, 1989.
- BARBIERI, G.; PERET, A.C.; VERANI, J.C. Notas sobre a adaptação do trato digestivo ao regime alimentar em espécies de peixes da região de São Carlos (SP). I. quociente intestinal. **Ver. Bras. Biol.**, v. 54, p. 63-69, 1994.
- BARBOSA, A.C. et al. Mercury biomagnifications in tropical black water, Rio Negro. **Brazil. Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 45, p. 235-246, 2003.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEHL, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências. **Bol. Instit. Pesca.**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.
- BARLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **Europ. J. Biochem.**, v. 216, p. 579-586, 1993.

- BARRETT, D.J.; TAYLOR, E.W. Spontaneous efferent activity in branches of the vagus nerve controlling heart rate and ventilation in the dogfish. **J. Exp. Biol.**, v. 117, p. 433-448, 1985.
- BARRON, M.G. Bioconcentration: will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? **Environ. Sci. Technol.**, v. 24, p. 1612-1618, 1990.
- BARROS, L.A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R.L. Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* Bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, p. 533-535, 2007.
- BARTOLOME, J. et al. Organ specificity of neonatal methyl mercury hydroxide poisoning in the rat: effects of ornithine decarboxylase activity in developing tissues. **Toxicol. Lett.**, v. 13, p. 267-276, 1982.
- BARTOLOME, J.; WHITMORE, W.L.; SLOTKIN, T.A. Effects of neonatal mercuric chloride administration on growth and biochemical development of neuronal and non-neuronal tissues in the rat: comparison with methylmercury. **Toxicol. Lett.**, v. 22, p. 101-111, 1984.
- BASHA, P.S.; RANI, A.U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 56, p. 218-22, 2003.
- BASTOS, W.R. et al. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 344-351, 2006.
- BATEY, A.J.; DOE, C.P.A. A method for QT correction based on beat-to-beat analysis of the QT/RR interval relationship in conscious telemetered beagle dogs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.48, p.11-19, 2001.
- BECKVAR, N. et al. **Contaminants in aquatic habitats at hazardous waste sites: mercury. NOAA technical memorandum NOS ORCA 100.** Hazardous materials response and assessment division, national oceanic and atmospheric administration. National Ocean Service. Washington, 1996. 74 p.
- BELGER, L.; FORSBERG, B.R. Factors controlling Hg levels in two predatory fish species in the Negro river basin, Brazilian Amazon. **Sci. Total Environ.**, v. 367, p. 451-459, 2006.
- BENOV, L.C., BENCHEV, I.C., MONOVICH, O.H. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. **Chem. Biol. Interact.**, 76, 321, 1990.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BERNTSSEN, M.H.G. et al. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquatic Toxicol.**, v. 65, p. 55-72, 2003.
- BERNTSSEN, M.H.G. et al. Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish fed. **Aquacul. Nut.**, v. 10, p. 83-97, 2004.
- BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. **Mol. Cel. Biol.**, v. 4, p. 517-529, 2003.
- BERS, D.M Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 70, p. 23-49, 2008.
- BERS, D.M Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, p. 198-205, 2002.
- BERS, D.M. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. **Am. J. Physiol.**, v. 248, p. H366-H381, 1985.

- BERS, D.M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force**. 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht: Kluwer: Academic Publishers, 2001. 258 p.
- BERS, D.M.; BRIDGE, J.H.B.; SPITZER, K.W. Intracellular Ca transients during rapid cooling contractures in guinea-pig ventricular myocytes. **J. Physiol.**, v. 417, p. 537-553, 1989.
- BERTOLLO, L.A.C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomy considerations. **Chromosome Res.**, v. 8, p. 603-613, 2000.
- BERVOETS, L.; BLUST, R. Metal concentrations in water, sediment and gusdgeon (*Giobio gobio*) from a pollution gradient: elationship with fish condition factor. **Environ. Poll.**, v. 126, p. 9-19, 2003.
- BIANCHI, G. et al. Glutathione kinetics in normal man and in patients with liver cirrhosis. **J. Hepatol.**, v. 26, p. 606-613, 1997.
- BICKHAM, J.W. et al. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutat. Res.**, v. 463, p. 33-51, 2000.
- BIDONE, E.D. et al. Fish contamination and human exposure to mercury in the Tapajós River Basin, Pára State, Amazon, Brazil: a screening approach. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 59, p. 194-200, 1997.
- BIESALSKI, H.K. The role of antioxidants in nutritional support. **Nutrition**, v. 16, p. 593-596, 2000.
- BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.
- BLACK, F.J.; BRULAND, K.W.; FLEGAL, A.R. Competing ligand exchange-solid phase extraction method for the determination of the complexation of dissolved inorganic mercury (II) in natural waters. **Anal. Chimica Acta**, v. 598, p. 318-333, 2007.
- BLATTER, L.A.; HÜSER, J. & RÍOS, E. Sarcoplasmic reticulun Ca<sup>2+</sup> release flux underlying Ca<sup>2+</sup> sparks in cardiac muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 4176-4181, 1997.
- BLOOM, N.S. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 49, p. 1010-1017, 1992.
- BOBKOVA, E.A. et al. Effects of SH1 and SH2 modifications on myosin similarities and differences. **Biophys. J.**, v. 76, p. 1001-1007, 1999.
- BOLDRINI, C.V. et al. Contaminação por mercúrio nos rios Mogi-Guaçu e Pardo (SP). **Revista DAE**, v. 135, p. 106-117, 1983.
- BOLLEN, A.; WENKE, A.; BIESTER, H. Mercury speciation analyses in HgCL<sub>2</sub>-contaminated soils and groundwater - implications for risks assessment and remediation strategies. **Water Res.**, v. 42, p. 91-100, 2008.
- BONDY, S.C.; NADERI, S. Contribution of hepatic cytochrome P-450 systems to the generation of reactive oxygen species. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p. 155-159, 1994.
- BORELA, M.L.L.; VARELA, Q.D. Antioxidantes enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. (Eds.). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**, 2004. p. 35-42.
- BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Contamination of aquatic biocenoses by mercury compounds: an experimental ecotoxicological approach. In: NRIAGU, J.O. (Ed.). **Aquatic Toxicology**, 1983. p 72-116.

- BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Experimental study of trophic contamination of *Salmo gairdneri* by two mercury compounds  $HgCl_2$  and  $CH_3HgCl$  – analysis at the organism and organ level. **Water Air Soil Poll.**, v. 26, p. 137–148, 1985.
- BRABO, E.S. et al. Níveis de mercúrio em peixes consumidos pela comunidade indígena de Sai Cinza na Reserva Munduruku, Município de Jacareacanga, Estado do Pará, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, p. 325-331, 1999.
- BRADBURY, S.P. et al. Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in identifying acute toxicity syndromes in fish. Part 4. Central nervous system seizure agents. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 10, p. 115-131, 1991a.
- BRADBURY, S.P. et al. Use of respiratory-cardiovascular responses of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish. Part 3. Polar narcotics. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 8, p. 247–261, 1991b.
- BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 218-251, 1976.
- BRAGA, B., et al **Introdução à Engenharia Ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2002. 336 p.
- BRAGIGAND, V.; BERTHET, B. Some methodological aspects of metallothionein evaluation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134, p. 55-61, 2003.
- BRAKE, J.; THAXTON, P.; HESTER, P.Y. Mercury induced cardiovascular abnormalities in the chicken. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 6, p. 269-277, 1977.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria, n. 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar.1998. Seção 1, n. 60-E, p.5-6.
- BRASIL. **Lei n. 9.976, de 03 de julho de 2000**. Dispõe sobre a produção de cloro e dá outras providências.
- BRAUM, E. The status of *Brycon labiatus* Steindachner 1880 (Pisces, Characoidei) and its synonym, *Othonophanes labiatus* (STEINDACHNER 1880). **Ibid.**, v. 8, p. 265-271, 1983.
- BRAUM, E.; JUNK, W.J. Morphological adaptation of two Amazonian characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. **Int. Rev. Ges. Hydrobiol.**, v. 67, p. 869-886, 1982.
- BRAY, T.M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, v. 16, p. 578-581, 2000.
- BRAY, T.M.; TAYLOR, C.G. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, p. 746-751, 1993.
- BRIDGES, C.R. Respiratory adaptations in intertidal fish. **Amer. Zool.**, v. 28, p. 79-96, 1988.
- BRIGGS, G.G. Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol – water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. **J. Agricul. Food Chem.**, v.29, p. 1050-1059, 1981.
- BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: BRANCO, S. M. (Ed). **Poliuição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca da USP, 1972. p. 79-108.

- BROOKES, P.S. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial lovehate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 287, p. 817-833, 2004.
- BROUSSARD, L.A.; HAMMETT-STABLER, C.A.; WINECKER, R.E. Toxicology of Mercury. **Lab. Med.**, v. 33, p. 614-625, 2002.
- BROWN, C.E.; MUIR, B.S. Analysis of the ram ventilation of fish gills with application to skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **J. Fish Res. Bd. Can.**, v. 27, p. 1637-1652, 1970.
- BRUBAKER, P.E. et al. DNA, RNA, and protein synthesis in brain, liver, and kidneys of asymptomatic methylmercury treated rats. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 18, p. 263-270, 1973.
- BRUNDER, D.G.; DETTBARN, C.; PALADE, P. Heavy metal induced  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 18785-18792, 1998.
- BRYAN, S.E. et al. Intranuclear localization of mercury *in vivo*. **Science**, v. 186, p. 832-833, 1974.
- BULATO, C. et al. Effect of mercury on selenium utilization and selenoperoxidase activity in LNCaP cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 42, p. 118-123, 2007.
- BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. p. 55-87.
- BURLANDO, B. et al. Different effects of  $Hg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase:  $Hg^{2+}$  induction of protein expression. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 139C, p. 201-207, 2004.
- BURLESON, M.L.; MILSOM, W.K. Cardio-ventilatory control in rainbow trout: II. Reflex effects of exogenous neurochemicals. **Resp. Physiol.**, v. 101, p. 289-299, 1995.
- BURR, M.L. et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (dart). **The Lancet**, v. 334, p. 757-761, 1989.
- BURTON, K.P. et al. Myocardial alterations due to free-radical generation. **Am. J. Physiol.**, v. 246, p. 776-783, 1984.
- BURY, N.R.; WALKER, P.A.; GLOVER, C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 11-23, 2003.
- BUSHNELL, P.G.; BRILL, R.W. Oxygen transport and cardiovascular responses in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) exposed to acute hypoxia. **J. Comp. Physiol.**, 162B, n. 2, p. 131-143, 1992.
- BUSSELBERG, D. Calcium channels as target sites of heavy metals. **Toxicol. Lett.**, v. 82, p. 255-261, 1995.
- CAJARAVILLE, M.P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. T. Environ.**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CALORE, E.E.; PEREZ, N.M.; HERMAN, M.M. Morphometric studies of cardiac myocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 66, p. 447-450, 2007.
- CALOW, P. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100C, p. 3-6, 1991.
- CÂMARA, V.M.; COREY, G. **Epidemiologia e Meio Ambiente: o caso dos garimpos de ouro no Brasil**. México: Metepec, Centro Panamericano de Ecologia Humana e Saúde/ECO/OPS, 1992. 211p.

- CAMBIER, S. et al. At environmental dose, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, p. 791-799, 2009.
- CAMERON JS. Autonomic nervous tone and regulation of heart rate in the goldfish, *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 63C, p. 341-349, 1979.
- CAMERON, J.N. Oxygen dissociation characteristics of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v 38A, p. 699-704, 1971.
- CAMPBELL, D.L.; STAMLER, J.S.; STRAUSS, H.C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. **J. Gen. Physiol.**, v. 108, p. 277-293, 1996.
- CAMPBELL, H.A.; HANDY, R.D.; SIMS, D.W. Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to dietary copper. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, v. 59, p. 768-777, 2002.
- CANABA, G. et al. Pelagic food chain structure in Ontario lakes: a determinant of mercury levels in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 51, p. 381-389, 1994.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). **Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching, and testing**. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 2005. Disponível em: <[www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GDLINES/Fish/Fish\\_Guidelines\\_English.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Fish/Fish_Guidelines_English.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2007.
- CANESI, L. et al. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel. **Aquatic Toxicol.**, v. 46, p. 67-76, 1999.
- CANTON, M. et al. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, p. H870-H877, 2004.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 5475-5480, 1975.
- CARRANZA-ROSALES, P. et al. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. **Toxicology**, v. 210, p. 111-121, 2005.
- CARVALHO, C.S. **Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)**. 2003. 107 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- CARVALHO, C.S.; ARAUJO, H.S.S.; FERNANDES, M.N. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 137, p. 225-234, 2004.
- CARVALHO, L.N.; FERNANDES, C.H.V.; MOREIRA, V.S.S. Alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) no rio Vermelho, Pantanal Sul Mato-Grossense. **Rev. Bras. Zootecias**, v. 4, p. 227-236, 2002.
- ÇAVAS, T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 352-358, 2008.
- CAZORLA, O. et al. Resting tension participates in the modulation of active tension in isolated guinea pig ventricular myocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 29, p. 1629-1637, 1997.

- CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL (CETEM/MCT). Série Tecnologia Ambiental Sta-36. ISSN 0103-7374. **Remoção de mercúrio de efluentes líquidos da indústria soda-cloro usando *Sargassum* sp.** 2006. 37 p.
- CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 21, p. 1-5, 1991.
- CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, p. 862-863, 1994.
- CHÁNEZ, C et al. Effect of organic and inorganic mercuric salts on Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase in different cerebral fractions in control and intrauterine growth retarded rats: alterations induced by serotonin. **Neurotoxicol.**, v. 10, p. 699-706, 1989.
- CHANNER, K.; MORRIS, F. ABC of clinical electrocardiography. **B.M.J.**, v. 324, p. 1023-1026, 2002.
- CHAPMAN, R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. H535-H552, 1983.
- CHAPOVETSKY, V.; KATZ, U. Effects of season and temperature acclimation on eletrocardiogram and heart rate of toads. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134A, p. 77-83, 2003.
- CHAVES, P.C. **Aula teórico-prática electrocardiografia.** Texto de Apoio. Porto: Faculdade de Medicina do Porto, 2001. 26 p.
- CHAVEZ, E.; HOLGUIN, J.A. Mitochondrial calcium release as induced by Hg<sup>2+</sup>. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 3582-3587, 1988.
- CHEUNG, A.P.L.; LAM, T.H.J.; CHAN, K.M. Regulation of *Tilapia* metallothionein gene expression by heavy metals ions. **Mar. Environ. Res.**, v. 58, p. 389-394, 2004.
- CHOW, C. K. Vitamin-E and oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 11, p. 215-232, 1991.
- CHOWDHURY, M.J.; PANE, E.F.; WOOD, C.M. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 139C, p. 163-173, 2004.
- CHUGUN, A. et al. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage sites in the carp heart: comparison with the rat heart. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 123A, p. 61-67, 1999.
- CINCA, I. et al. Accidental ethyl mercury poisoning with nervous system, skeletal muscle, and myocardium injury. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 43, p. 143-149, 1979.
- CIZDZIEL, J. et al. Distribution of mercury in tissues of five species of freshwater fish from Lake Mead, USA. **J. Environ. Monit.**, v. 5, p. 802-807, 2003.
- CLARK, R.J.; RODNICK, K.J. Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1541-1552, 1998.
- CLARKSON, T.W. Recent advances in the toxicology of mercury with emphasis on the alkylmercurials. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 1, p. 203-234, 1972a.
- CLARKSON, T.W. The pharmacology of mercury compounds. **Ann. Rev. Pharm. Toxicol.**, v. 12, p. 375-406, 1972b.
- CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 34, p. 369-403, 1997.
- CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 36, p. 609-662, 2006.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochem.**, v. 2, p. 1420-1428, 1963.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Níveis de contaminação por mercúrio na água, sedimento e peixes da represa de Barra Bonita e seus rios formadores: Piracicaba e Tietê (São Paulo, Brasil)**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 1986. 115 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 1998. 288 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 1999. 371 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2001. 391 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2002. 227 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2007. 327 p.

COMPORTI, M. et al. Glutathione depletion: its effect on other antioxidant systems and hepatocellular damage. **Xenobiotica**, v. 21, n. 8, p. 1067-1076, 1991.

CONNOLLY, N.M.; CROSSLAND, M.R.; PEARSON, R.G. Effect of low dissolved oxygen on survival, emergence, and drift of tropical stream macroinvertebrates. **J. N. Am. Benthol. Soc.**, v. 23, p. 251-270, 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução n. 357 de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 53, de 18 de março de 2005. Seção 1, p. 58-63.

CORONADO, R. et al. Structure and function of ryanodine receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 246, n. 35, p. C1485-C1504, 1994.

CORREA, C.F. **Efeito das reduções graduais do oxigênio ambiental sobre a função cardíoro-respiratória de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Teleostei, Serrasalminidae)**. 1996. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

COSSON, R.P. Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the liver of carp after contamination by silver, cadmium and mercury following or not pretreatment by zinc. **BioMetals**, v. 7, p. 9-19, 1994.

COSTA, J.M. et al. Effect of acute temperature transition on chronotropic and inotropic responses in the South American lungfish *Lepdosiren paradoxa*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 39-45, 2002.



- COSTA, M.J. **Efeito da temperatura sobre a contratilidade cardíaca e o controle intracelular do cálcio no miocárdio ventricular de *Lepidosiren paradoxa***. 2003. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
- COSTA, M.J. et al. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. **J. Therm. Biol.**, v. 25, p 373-379, 2000.
- COSTA, M.J. et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153–163, 2008.
- COSTA, M.J. et al. Role of the sarcoplasmic reticulum in calcium dynamics of the ventricular myocardium of *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi) at different temperatures. **J. Therm. Biol.**, v. 29, p 81-89, 2004.
- COT - **Statement on a survey of mercury in fish and shellfish**. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Food Standards Agency, London, UK, 2002. p 1-17.
- COUTURE, P.; KUMAR, P.R. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). **Aquatic Toxicol.**, v. 64, p. 107-120, 2003.
- CRANFIELD, P.F. **The conduction of the cardiac impulse**. New York: Futura Publishing Company, 1975. 404 p.
- CROCKETT, E.L. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. **J. Comp. Physiol.**, v. 178B, p. 795-809, 2008.
- CROTEAU, M.N. et al. Metallothionein-like metal-binding protein in the biomonitor *Chaoborus*: occurrence and relationship to ambient metal concentrations in lakes. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 21, p. 737–741, 2002.
- CRUMPTON T. et al. Lead exposure in pheochromocytoma (PC12) cells alters neural differentiation and Sp1 DNA-binding. **Neurotoxicol.**, v. 7, p. 1-14, 2000.
- CUNHA, F.N. et al. Effects of mercury on the contractile activity of the right ventricular myocardium. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 41, p. 374-380, 2001.
- CUVIN-ARALAR, M.L.A.; FURNESS, R. Tissue distribution of mercury and selenium in minnows, *Phoxinus phoxinus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 45, p. 775-782, 1990.
- CZUCZEJKO, J. et al. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. **Acta Biochim. Polonica.**, v.50, p.1147-1154, 2003.
- DAHER, V.; MALM, O.; LACERDA, L.D. No rastro do mercúrio. **Ciênc. Hoje**, v. 26, p. 46-48, 1999.
- DANDAPAT, J.; CHAINY, G.B.N.; RAO, K.J. Dietary vitamin E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127C, p. 101-115, 2000.
- DAVIE, P.S. et al. Cardiac function in the new-zealand hagfish, *Eptatretus cirrhatus*. **Physiol. Zool.**, v. 60, n. 2, p. 233-240, 1987.
- DAVIS, S.R.; COUSINS, R.J. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1085-1088, 2000.

- De BOECK, G. et al. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. **Aquat Toxicol.**, v. 65, p. 413-24, 2003.
- De BOECK, G.; De SMET, H.; BLUST, R. The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquatic Toxicol.**, v. 32, p. 127-141, 1995.
- De BOECK, G.; GROSELL, M.; WOOD, C. Sensitivity of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) to waterborne silver exposure. **Aquatic Toxicol.**, v. 54, p. 261-275, 2001.
- De CONTO CINIER C. et al. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 61, p. 793-799, 1998.
- DeFOREST, D.K.; BRIX, K.V.; ADAMS, W.J. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. **Aquatic Toxicol.**, v. 84, p. 236-246, 2007.
- DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. New York: Elsevier, 1981. 265 p.
- DEJOURS, P. **Respiration in water and air: adaptations-regulation-evolution**. New York: Elsevier, 1988. 179 p.
- DEJOURS, P.; ARMAND, J.; VERRIEST, G. Carbon dioxide dissociation curves of water and gas exchange of water breathers. **Respir. Physiol.**, v. 5, p. 23-33, 1968.
- DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 163-173, 1989.
- DENG, D.F.; TEH, F.C.; TEH, S.J. Effect of dietary methylmercury and seleno-methionine on Sacramento splittail larvae. **Sci. Total Environ.**, v. 407, p. 197-203, 2008.
- Di GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. 1071 p.
- DICKINSON, A.D.; FORMAN, J.H. Glutathione in defense and signaling lessons from a small thiol. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 973, p. 488-504, 2002.
- DONNE, I.D. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 169-176, 2003.
- DOREA, J.G.; BARBOSA, A.C.; SILVA, G. Fish Mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 142C, p. 275-283, 2006.
- DOYOTTE, A. et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers or experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquat. Toxicol.**, v. 39, p. 93-110, 1997.
- DREMINA, E.S. et al. Oxidation and inactivation of SERCA by selective reaction of cysteine residues with amino acid peroxides. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 10, p. 1462-1469, 2007.
- DREVNICK, P.E. et al. Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 147C, p. 331-338, 2008.
- DREVNICK, P.E.; SANDHEINRICH, M.B.; ORIS, J.T. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. **Aquat. Toxicol.**, v. 79, p. 49-54, 2003.

- DRIEDZIC, W.R. et al. Alterations in energy metabolism associated with the transition from water to air breathing in fish. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 730-735, 1978.
- DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H.  $\text{Ca}^{2+}$  protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. **J. Comp. Physiol.** v. 156, p. 135-142, 1985.
- DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. **J. Exp. Biol.**, v. 140, p. 227-241, 1988.
- DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 221-258, 1994.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DUBE, P.N.; HOSETTI, B.B. Behaviour surveillance and oxygen consumption in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to sodium cyanide. **Biotechnol. Animal Husbandry**, v. 26, p. 91-103, 2010.
- DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 4, p. 14-18, 1991.
- DUTTON, M.D.; STEPHENSON, M.; KLAVERKAMP, J.F. Metallothionein in fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p. 1193-1202, 1993.
- EISLER, R.; HENNEKEY, R.J. Acute toxicities of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  to estuarine macrofauna. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 6, p. 315-323, 1977.
- EL-DEMERDASH, F.M. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and blood of rats. **J. Environ. Sci. Health**, 36, 489-499, 2001.
- ELIA, A.C. et al. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 55, p. 162-167, 2003.
- ELIA, A.C. et al. Effects of mercury on glutathione and glutathione-dependent enzymes in catfish (*Ictalurus melas* R.). In: Markert, B.; Friese, K. (Eds.). Trace Elements - Their Distribution and Effects in the Environment: Trace Metals in the Environment, v. 4. Amsterdam, Elsevier Science, 2000. p. 411-421.
- ELIA, A.C. et al. Seasonal variability of detoxificant response and heavy metal accumulation in tissues of both sexes in *Tinca tinca* (L.) from Lake Trasimeno. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, v. 20, p. 425-434, 2010.
- ELOFSSON, U.O.E. et al. Intermale competition in sexually mature Arctic charr: effects on brain monoamines, endocrine stress responses, sex hormone levels, and behavior. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 118, p. 450-460, 2000.
- EL-SAYED, M.F.; GESSER, H. Sarcoplasmic reticulum, potassium, and cardiac force in rainbow trout and plaice. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. R599-604, 1989.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Ambient water quality criteria for mercury**. Washington: US EPA, Criteria and Standards Division, 1985. EPA-440/5-84-026.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Mercury in water by cold vapor atomic fluorescence spectrometry method 245.7**. Washington: EPA-821-R-05-001, 2005. 33 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Office of Air Quality Planning & Standards and Office of Research and Development. **Mercury study report to congress volume V: Health effects of mercury and mercury compounds**. Washington, D.C, 1997. 349 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Office of Pesticide Programs Health Effects Division (7509C)**. Washington, 1999. 313 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION PROTECTING AGENCY (EPA). **Persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) chemicals program**. Washington: Environmental Guidance Regulatory Bulletin, 2000. 8 p.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal - induced oxidative damage. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 1, p. 529-539, 2001.

EROGLU, K.; ATLI, G.; CANLI, M. Effects of metals (Cd, Cu, Zn) interactions on the profiles of metallothionein-like proteins in the Nile fish *Oreochromis niloticus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 75, p. 390-399, 2005.

ESPINA, S.; SALIBIAN, A.; DIAZ, F. Influence of cadmium on the respiratory function of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Water, Air Soil Poll.**, v. 119, p. 1-10, 2000.

EVANS, D.H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environ. Health Perspect.**, v. 71, p. 47-58, 1987.

FABACHER, D.L.; BAUMANN, P.C. Enlarged livers and hepatic microsomal mixed-function oxidase components in tumor-bearing brown bullheads from a chemically contaminated river. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 4, p. 703-710, 1985.

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

FADINI, P.S.; JARDIM, W.F. Is the Negro River Basin Amazon impacted by naturally occurring mercury? **Sci. Total Environ.**, v. 275, p.71-82, 2001.

FAGAN, J.M.; SLECZKA, B.G.; SOHAR, I. Quantification of oxidative damage to tissue proteins. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 31, p. 751-757, 1999.

FANG, S.C.; FALLIN, E. The binding of various mercurial compounds to serum proteins. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 15, p. 110-117, 1976.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FARIA, M.A.M. Mercuralismo metálico crônico ocupacional. **Rev. Saúde Pub.**, v. 37, p. 116-127, 2003.

FAROMBI, E.O.; ADELOWO, O.A.; AJIMOKO, Y.R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in african cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 4, p. 158-165, 2007.

FARREL, A.P. Tribute to P.L. Lutz: a message from the heart – why hypoxic bradycardia in fishes? **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 1415-1725, 2007.

FARREL, A.P.; JONES, D.R. The heart. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARREL, A.P. **Fish physiology, v. XII (A): The cardiovascular system**. New York: Academic Press Inc., 1992. p. 1-88.

- FARREL, A.P.; JONES, D.R. The heart. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARREL, A.P. **Fish physiology, v. XII (A): The cardiovascular system**. New York: Academic Press Inc., 1992. p. 1-88.
- FARRELL, A.P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 523-536, 1984.
- FARRELL, A.P. et al. Cardiac growth in rainbow-trout, *Salmo gairdneri*. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 2368-2373, 1988.
- FARRELL, A.P., JONES, D.R., The heart. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARRELL, A.J. **Fish Physiology: The Cardiovascular System**, San Diego: Academic Press, 1992. p. 1-88.
- FARRELL, E.F. et al Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 34660-34666, 2003.
- FATIMA, M. et al. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissue. **Aquat. Toxicol.**, v. 49, p. 243-250, 2000.
- FAY, R.R.; POPPER, A.N. Evolution of hearing in vertebrates: the inner ears and processing. **Hearing Res.**, v. 149, p. 1-10, 2000.
- FEILLET-COUDRAY, C. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. **Clin. Chim. Acta**, v. 284, p. 31-43, 1999.
- FELDMAN, J.; GOLDWASSER, G. P. Eletrocardiograma: recomendações para a sua interpretação. **Rev. SOCERJ**, v. 17, n. 4, p. 251-256, 2004.
- FELTON, J.S. et al. Heavy metal poisoning: mercury and lead. **Ann. Int. Med.**, v. 76, p. 779-792, 1972.
- FERNANDES, C. et al Heavy metals in water, sediment and tissues of *Liza saliens* from Esmoriz Paramos lagoon, Portugal. **Environ. Monit. Assessm.**, v. 136, p. 267-275, 2007.
- FERNANDES, M.N. et al. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. **Can. J. Zool.**, v. 72, p. 160-165, 1994.
- FERNANDES, M.N.; BARRIONUEVO, W.R.; RANTIN, F.T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. **J. Fish Biol.**, v. 46, 123-133, 1995.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental reductions of dissolved oxygen. **Bol. Fisiol. Animal**, v. 11, n. 3-4, p. 51-60, 1987.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish. Biol.**, v. 35, p. 509-519, 1989.
- FERNÁNDEZ-VEGA, C. et al. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 72, p. 55-63, 2002.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FIGUEIREDO-FERNANDES A., et al. Effect of paraquat on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus* at two levels of temperature. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 85, p. 97-103, 2006.
- FILIPAK NETO, F.F. et al. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicol. in Vitro**, v. 22, p. 1705-1713, 2008.

- FILIPOVI, V.; RASPOR, B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. **Water Res.**, v. 37, p. 3253-3262, 2003.
- FLINK, I.L. et al. Atrial and ventricular cardiac myosins contain different heavy chain species. **FEBS Lett.**, v. 94, p. 125-130, 1978.
- FLOHÉ, L., ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Met. Enzymol.**, v. 105, p. 93-105, 1984.
- FLORINDO, L.H. et al. The role of branchial and orobranchial O<sub>2</sub> chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 1709-1715, 2006.
- FLORINDO, L.H. **Papel de quimiorreceptores de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>/pH no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração na superfície aquática (ASR) em tambaqui, *Colossoma macropomum*: respostas a longo prazo durante a hipóxia e hipercarbica.** 2002. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- FONSECA, A.L. **A biologia da espécie *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia silvestre* (Cladocera, Crustacea) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais.** São Carlos: USP, 1991. 210p.
- FORSTNER, U. Inorganic sediment chemistry and elemental speciation. In: BAUDO, R.; GIESY, J.P.; MUNTAU, H. (Eds.). **Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants.** Flórida: Lewis Publishers, Inc. Boca Raton, 1990. p. 107-127.
- FOSSA, A.A. et al. Dynamic beat-to-beat modeling of the QT-RR interval relationship: analysis of qt prolongation during alterations of autonomic state versus human ether a-go-go-related gene inhibition. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 312, n. 1, p. 1-11, 2005.
- FOULKES, E.C. **Biological roles of metallothionein.** New York: Elsevier/North-Holland, 1982. 327 p.
- FOULKES, E.C. Nature of Cd and Hg effects on epithelial amino acid transport in vivo and role of chelators. **Toxicology**, v. 69, p. 177-185, 1991.
- FOULKES, E.C. Transport of toxic heavy metals across cell membranes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 223, p.234-240, 2000.
- FOULKES, E.C.; BERGMAN, D. Inorganic mercury absorption in mature and immature rat jejunum: transcellular and intercellular pathways in vivo and in everted sacs. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 120, p. 89-95, 1993.
- FOURNIER, D. et al. Insect glutathione S-transferase, biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 1840-1845, 1992.
- FOWLER, B.A. General subcellular effects of lead, mercury, cadmium and arsenic. **Env. Health Persp.**, v. 22, p. 37-41, 1978.
- FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq. Zool. São Paulo**, v. 6, p. 205-404, 1950.
- FRACALANZA, F.P. **Concentrações de mercúrio em peixes de diferentes níveis tróficos na bacia do rio Paraíba do Sul.** 2007. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

- FRAGA, C.G. et al. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 323-330.
- FRASCO, M.F. et al. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. **FEBS J.**, v. 274, n. 7, p. 1849-1861, 2007.
- FRASCO, M.F. et al. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. **FEBS J.**, v. 274, p. 1849-1861, 2007.
- FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, v. 47, p. 412-426, 1982
- FRIBERG, L.; VOSTAL, J. **Mercury in the environment, an epidemiological and toxicological**. Cleveland, Ohio: CRC Press, 1972. 215 p.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.
- FU, S.J.; XIE, X.J.; CAO, Z.D. Effect of fasting on resting metabolic rate and postprandial metabolic response in *Siluris meridionalis*. **J. Fish Biol.**, v. 67, p. 279-285, 2005.
- FULLER, B.J. et al. Free radical damage and organ preservation: fact or fiction. A review of the interrelationship between oxidative stress and physiological ion disbalance. **Cryobiology**, v. 25, p. 377-393, 1988.
- GAIKWAD, S.A. Acute toxicity of mercury, copper and selenium to the fish *Etroplus maculatus*. **Environ. Ecol.**, v. 7, p. 694-696, 1989.
- GALLAGHER, E.P.; CANADA, A.T.; Di GIULIO, R.T. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. **Aquatic Toxicol.**, v. 23, p. 155-168, 1992.
- GAMMONS, C.H. et al. Mercury concentrations of fish, river water, and sediment in the Rio Ramis-Lake Titicaca watershed, Peru. **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 637-648, 2006.
- GARCEZ, M. et al. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.A. (Eds). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. CANOAS: Editora ULBRA, 2004. p 13-33.
- GEEVES, M.A.; HOLMES, K.C. Structural mechanism of muscle contraction. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 687-728, 1999.
- GEHRKE, P.C. Acute cardio-respiratory responses of spangled perch, *Leiopotherapon unicolor* (Günther, 1859), to sublethal concentrations of zinc, temephos and 2,4-D. **Aust. J. Mart. Res.**, v. 39, p. 767-774, 1988.
- GERALD, J.W.; CECH, J.J.Jr. Respiratory responses of juvenile catfish (*Ictalurus punctatus*) to hypoxic conditions. **Physiol. Zool.**, v. 43, p. 47-54. 1970.
- GESSER, H. Cardiac force-interval relationship, adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. **J. Comp. Biol.**, v. 166B, p. 278-285, 1996.
- GESSER, H. et al. Ca<sup>2+</sup> regulation of heart contractility in *Octopus*. **J. Comp. Physiol.**, v.167B, p. 474-480, 1997.
- GIARI, L.; SIMONI, E.; DEZFULI, B.S. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 70, p. 400-410, 2008.

- GILBERT, H.F. Molecular and cellular aspects of thioldisulfide exchange. **Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.**, v. 63, p. 69-172, 1990.
- GILL, T.S.; TEWARI H.; PANDE J. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 97, p. 287-292, 1990.
- GINGERICH, A.J.; PHILIPP, D.P.; SUSKI, C.D. Effects of nutritional status on metabolic rate, exercise and recovery in a freshwater fish. **J. Comp. Physiol.**, v. 180B, n. 3, p. 371-384, 2009.
- GIORDANO, F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. **J. Clin Invest.**, v. 115, n. 3, p. 500-508, 2005.
- GIZZI, J.C. Arritmogenese: bases eletrofisiológicas - Parte I. **Reblampa**, v. 10, n. 2, p. 65-77, 1997.
- GLASS, M.L. et al. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp (*Cyprinus carpio* L.). **J. Fish Biol.**, v. 39, p. 143-149, 1991.
- GLASS, M.L. Ventilatory responses to hypoxia in ectothermic vertebrates. In: LENFANT, C. **Physiological adaptations in vertebrates**. New York: Marcel Dekker Inc., 1992. p. 97-108.
- GOBAS, F.A.P.C. et al. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. **Environ. Sci. Technol.**, v. 33, p. 133-141, 1999.
- GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 56, p. 174-179, 2003.
- GODIN, D.V.; GARNETT, M.E. Effects of various anesthetic regimens on tissue antioxidant enzyme activities. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 83, p. 93-101, 1994.
- GODOY, M.P. Família Erythrinidae. In: GODOY, M.P. (Ed.). **Peixes do Brasil. Sub-Ordem Characoidei Bacia do Rio Mogi Guassu**. Piracicaba, SP: Editora Franciscana, 1975. p. 400-444.
- GOETZ, M.E.; LUCH, A. Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v. 266, p. 73-83, 2008.
- GOLDBERG, A.H.; ULLRICK, W.C. Effects of halothane on isometric contractions of isolated heart muscle. **Anesthesiol.**, v. 28, n. 5, p. 838-845, 1967.
- GOLDHABER, J.I. Free radicals enhance  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 271, p. H823-H833, 1996.
- GOLDING, G.R. et al. Evidence for facilitated uptake of Hg (II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. **Limnol. Oceanogr.**, v. 47, p. 967-975, 2002.
- GOLDWASSER, G.P. **Eletrocardiograma orientado para o clínico: método completo e prático de interpretação com questões de múltipla escolha e respostas comentadas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 327 p.
- GOLTERMAN, H.L.; CLIMO, R.S. **Methods for chemical analysis of freshwater**. IBP Handbook 8. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1969. 171 p.
- GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R. Alevino – um termo equivocado na piscicultura brasileira com conseqüências no setor produtivo. **Cad. Ciênc. Tecnol.**, v. 20, n. 2, p. 353-359, 2003.
- GONÇALVES, A. et al. Contaminação do mercúrio em populações de garimpos de ouro em área da Amazônia legal: apurando o diagnóstico da realidade Kayapó. **Salusvita**, v. 18, p. 37-52, 1999.



- GONUL, L.T.; KUCUKSEZGIN, F. Mercury accumulation and speciation in the muscle of red mullet (*Mullus barbatus*) and annular sea bream (*Diplodus annularis*) from Izmir Bay (Eastern Aegean). **Mar. Poll. Bull.**, v. 54, p. 1962-1989, 2007.
- GONZALEZ, P. et al. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 3972-3980, 2005.
- GONZALEZ-FLECHA et al. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by  $\alpha$ -tocopherol acetate. **Xenobiotica**, v. 21, p. 1013-1022, 1991.
- GOULDING, M. **Man and fisheries on an Amazon Frontier**. The Hague (Netherlands): J.W. Junk Publishers, 1981. 137 p.
- GRAEME, A.K.; POLLOCK, C.V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. **J. Emerg. Med.**, v. 16, n. 1, p. 45-56, 1998.
- GRAHAM, J. B. Ecological, evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. **Am. Zool.**, v. 30, p. 137-146, 1990.
- GREENBERG, A.E.; TARAS, M.J.; RAND, M.C. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 14 ed. Illinois: Springfield Bru-El Graphic, 1976. 310 p.
- GRUNE, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. **Biogerontology**, v. 1, p. 31-40, 2000.
- GUALLAR, E. et al. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 1747-1754, 2002.
- GÜL, A.; YILMAZ, M.; SELVİ, M. The study of the toxic effects of mercury-II-chloride to chub *Leuciscus cephalus* (L., 1758). **G.U. J. Sci.**, v. 17, p. 53-58, 2004b.
- GÜL, S. et al. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dan Lake, Turkey. **Environ. Int.**, v. 30, p. 605-609, 2004a.
- GUERRA, C.D.R. **Caracterização eletrocardiográfica e controle nervoso da função cardio-respiratória de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887 - Teleostei, Serrasalminidae) durante hipóxia ambiental e na recuperação subsequente à normóxia**. 1997. 169 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.
- GUERRA, C.D.R. **Respostas cardio-respiratórias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente**. 1992. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1992.
- GUILHERME, S. et al. Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure. Relationship with mercury accumulation and implications for public health. **Mar. Poll. Bull.**, v. 56, p. 845-859, 2008.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan AS, 2002. 973 p.
- GUZZI, G.; La PORTA, C.A.M. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology**, v. 244, p. 1-12, 2008.

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

HABERLAND, M.E., SMITH, C.V. Modificações das lipoproteínas dependentes dos peróxidos lipídios na aterosclerose. In: MOSLEN, M.T.; SMITH, C. (Eds.). **Radicais livres. mecanismos de lesão tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1995. p. 45-63.

HABIG, W.H. et al. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HAJDU, S. Mechanism of the woodworth staircase phenomenon in heart and skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 216, n.1, p. 206-214, 1969.

HALBACH, S. et al. The effects of pchloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBs) on force of contraction of mammalian myocardium and on ATP hydrolysis by sarcolemal ATPase. **Arch. Pharmacol.**, v. 318, p. 121-129, 1981.

HALBACH, S. Mercury compounds: lipophilicity and toxic effects on isolated myocardial tissue. **Arch. Toxicol.**, v. 64, p. 31-53, 1990.

HALLIWEL, B. Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutrition antioxidant intake in humans. **Free. Rad. Res.**, v. 25, p. 25-57, 1996.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. UK: Oxford University Press, 2000. 936 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 469 p.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v. 11, p. 714-719, 1977.

HAMMERSCHMIDT, C.R. et al. Effect of dietary methylmercury on reproduction of fathead minnows. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 877-883, 2002.

HANDY, R.; PENRICE, W. The influence of high oral doses of mercuric-chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow-trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106C, p. 717-724, 1993.

HANDY, R.D. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: TAYLOR, E.W. (Ed.). **Toxicology of Aquatic Pollution**. University Press, Cambridge, 1996. p. 29-60.

HANDY, R.D. et al. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. **Aquatic Toxicol.**, v. 47, p. 23-41, 1999.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminium and zinc toxicity. **J. Fish Biol.**, v. 35, p. 737-747, 1989.

HARRIS, H.H.; PICKERING, I.J.; GEORGE, G.N. The chemical form of mercury in fish. **Science**, v. 301, p. 1203, 2003.

- HARWOOD, C.L. et al. Rate-dependence changes in cell shortening, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and membrane potential in single, isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ventricular myocytes. **J. Exp. Biol.**, v. 203, p. 493-504, 2000.
- HAS-SCHON, E. et al. Heavy metal distribution in tissues of six species included in human diet, inhabiting freshwaters of the Nature Park "Hutovo Blato" (Bosnia and Herzegovina). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 54, p. 75-83, 2008.
- HASSPIELER, B.M.; BEHAR, J.V.; DI GIULIO, R.T. Glutathione dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 28, p. 82-90, 1994.
- HE, X. et al. ASK1 associates with troponin T e induces troponin T phosphorylation and contractile dysfunction in cardiomyocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 163, p. 243-251, 2003.
- HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2 ed. Flórida: CRC Press Inc. Lewis Publishers, 1995. 359 p.
- HECHENBERG, S.; BEYERSMANN, D. Inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity by cadmium, lead, mercury. **Enzyme**, v. 45, p. 109-115, 1991.
- HELLE, K.B. Structures of functional interest in the myocardium of lower vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 76A , p. 447-452, 1983.
- HENRIQUE, M. M. F. et al. Influence of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic-stress of Seabream, (*Spaurus aurata*). **Aquaculture**, v. 161, p. 415-426, 1998.
- HIDALGO, C.; DONOSO, P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 10, n. 7, p. 1275-1312, 2008.
- HIDALGO, J. et al. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. **Brain Res. Bull.**, v. 55, p. 133-145, 2001.
- HILL, M.F.; SINGAL, P.K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **Am. J. Pathol.**, v. 148, n. 1, p. 291-300, 1996.
- HILL, W.R.; STEWART, A.J.; NAPOLITANO, G.E. Mercury speciation and bioaccumulation in lotic primary producers and primary consumers. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 53, p. 812-819, 1996.
- HILLMAN, S.S. Cardiovascular correlates of maximal oxygen consumption rates in anuran amphibians. **J. Comp. Physiol.**, v. 109, p. 199-207, 1976.
- HINTON, D.E. et al. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLY, R.A.; MEHRLE Jr., P.M.; BERGMAN, H.L. (Eds.). **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Chelsea: Lewis Publishers, 1992. p. 155-210.
- HISATOME, I. et al. Block of sodium channels by divalent mercury: role of specific cysteinyl residues in the P-loop region. **Biophys. J.**, v. 79, p. 1336-1345, 2000.
- HOCHACHKA, P.; HULBERT, W. Glycogen 'seas', glycogen bodies and glycogen granules in heart and skeletal muscle of two air-breathing, burrowing fishes. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 774-786, 1978.
- HOCHACHKA, P.W. et al. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 9493-9498, 1996.
- HOCHACHKA, P.W. **Living without oxygen**. Close and open systems in hypoxia tolerance. Massachusetts: Harvard University Press, 1980. 181 p.

- HOFFMAN, D.J.; G.H. HEINZ. Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in mallard ducks. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 17, p.161-166, 1998.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. **Free Rad. Res.**, v. 28, p. 593-600, 1998.
- HOGLUND, E.; KOLM, N.; WINBERG, S. Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is counteracted by L-DOPA. **Physiol. Behav.**, v. 74, p. 381-389, 2001.
- HOGSTRAND, C.; HAUX, C. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100, p. 137-141, 1991.
- HOLETON, G.F.; RANDALL, D.J. The effect of hypoxia upon the partial pressure of gases in the blood and water efferent to the gills of rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 46, p. 317-327, 1967.
- HOOL, L.C. Evidence for the regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the heart by reactive oxygen species - mechanism for mediating pathology. **Proc. Aust. Physiol. Soc.**, v. 38, p. 87-93, 2007.
- HOOL, L.C. Hypoxia increases the sensitivity of the L type Ca<sup>2+</sup> current to  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation via a C2 region-containing protein kinase C isoform. **Circ. Res.**, v. 87, p. 1164-1171, 2000.
- HOPKINS, W.A. et al. Relationships between mercury body concentrations, standard metabolic rate, and body mass in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from three experimental populations. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 586-590, 2003.
- HORI, H., M. et al. Applicability of artificial seawater as a rearing seawater for toxicity tests of hazardous chemicals by marine fish species. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish**, v. 4, p. 614-622, 1996.
- HOUSTON, M.C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Altern. Ther. Health Med.**, v. 13, n. 2, p. S128-S133, 2007.
- HOVE-MADSEN, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and force-frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 47-60, 1992.
- HOVE-MADSEN, L.; GESSER, H. Force frequency relation in the myocardium of rainbow trout. **J. Comp. Physiol.**, v. 159B, p. 61-69, 1989.
- HOVE-MADSEN, L.; LLACH, A.; TORT, L. Quantification of Ca<sup>2+</sup> uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. R2070-R2080, 1998.
- HOVE-MADSEN, L.; LLACH, A.; TORT, L. The function of the sarcoplasmic reticulum is not inhibited by low temperatures in trout atrial myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 281, p. R1902-R1906, 2001.
- HOVE-MADSEN, L.; TORT, L. L-type Ca<sup>2+</sup> current and excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. R2061-R2069, 1998.
- HOWES, G.J. Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.**, v. 43, p. 1-47, 1982.
- HOYLE, I.; HANDY, R.D. Dose-dependent inorganic mercury absorption by isolated perfused intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, involves both amiloride-sensitive and energy-dependent pathways. **Aquatic Toxicol.**, v. 72, p. 147-159, 2005.
- HUAN, J.Y.; MIRANDA, C.L.; BUHLER, D.R. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. **Toxicol. Letters**, v. 99, p. 127-137, 1998.

- HUANG, Y. L., CHENG, S. L., LIN, T. H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercury chloride. **Biol. Trace Elem. Res.**, 52, 193-206, 1996.
- HUANG, Z.Y. et al. Bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead. **Appl. Organomet. Chem.**, v. 21, p. 101-107, 2007.
- HUDASEK, K.; BROWN, S.T.; FEARON, I.M. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates recombinant Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ -1C subunits but does not mediate their sensitivity to acute hypoxia. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 318, p. 135-141, 2004.
- HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE Jr., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.
- HUGGINS, H.A.; LEVY, T.E. Uniformed consent: the hidden dangers in dental care. Charlottesville, VA: Hampton Roads Publishing Company Inc. 150 p.
- HUGHES, G.M. et al. Respiration of carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20 °C and the effect of hypoxia. **J. Fish Biol.**, v. 22, p. 613-628, 1983.
- HUGHES, G.M. Polluted fish respiratory physiology. In: LOCKWOOD, A.P.M. **Effects of pollutants on aquatic organisms**. London: Cambridge University Press, 1976. p. 121-146.
- HUGHES, G.M. Respiratory responses to hypoxia in fish. **Am. Zool.**, v. 13, p. 475-189, 1973.
- HUGHES, G.M.; SAUNDERS, G. Responses of respiratory pumps to hypoxia in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J. Exp. Biol.**, v. 53, p. 529-545, 1970.
- HUGHES, G.M.; SHELTON, G. Pressure changes during the respiratory movements of teleostean fishes. **Nature**, v. 179, p. 255, 1957.
- HUGHES, G.M.; SHELTON, G. The mechanism of gill ventilation in three freshwater teleosts. **J. Exp. Biol.**, v. 35, p. 807-823, 1958.
- HUSSAIN, S., ATKINSON, A., THOMPSON, S.J., KHAN, A.T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **J. Environ. Sci. Health**, 34, 645-660, 1999.
- HUSSEY, A.J. et al. Variation in the expression of Mu-class glutathione S-transferase isoenzymes from human skeletal muscle. Evidence for the existence of heterodimers. **J. Biochem.**, v. 273, p. 323-332, 1991.
- HUUSKONEN, S.; LINDSTROM SEPPA, P. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*) – the effects of unbleached pulp-mill effluents. **Aquatic Toxicol.**, v. 31, p. 27-41. 1995.
- HYLANDER, L.D. et al. Mercury Levels in Alto Pantanal: a screening study. **Ambio**, v. 23, p. 478-484, 1994.
- HYLLAND, K.; HAUX, C.; HOGSTRAND, C. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 91, p. 89-96, 1992.
- HYPOLITO, R.; FERRER, L.M.; NASCIMENTO, S.C. Comportamento de espécies de mercúrio no sistema sedimento-água do mangue no município de Cubatão, São Paulo. **Águas Subterrâneas**, v. 19, p. 15-24, 2004.

- ICHINARI, K. et al. Direct activation of the ATP-sensitive potassium channel by oxygen free radicals in guinea-pig ventricular cells: its potentiation by MgADP. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 28, p. 1867-1877, 1996.
- IKINGURA, J.R.; AKAGI, H. Methylmercury production and distribution in aquatic systems. **Sci Total Environ.**, v. 234, p. 109-118, 1999.
- IMESCH, E.; MOOSMAYER, M.; ANNER, B.M. Mercury weakens membrane anchoring of Na-K-ATPase. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. F837-F842, 1992.
- IWAMOTO, T. et al. Protein kinase C-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. **Biochemistry**, v. 37, p. 17230-17238, 1998.
- IZEL, A.C.U. et al. Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amazonica**, v. 34, p. 179-184, 2004.
- JACKSON, C.V. et al. Oxygen free radical-mediated myocardial and vascular dysfunction. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. H1225-H1231, 1986.
- JAGOE, C.H.; FAIVRE, A.; NEWMAN, M.C. Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). **Aquatic Toxicol.**, v. 34, p. 163-183, 1996.
- JALILI, M.A.; ABBASI, A.H. Poisoning by ethyl mercury toluene sulphonanilide. **Br. J. Ind. Med.**, v. 18, p. 303-308, 1961.
- JANVIER, J.J.; PEYRAUD-WAITZENEGGER, M.; SOULIER, P. Mediation of serotonin-induced hyperventilation via 5-HT<sub>3</sub>-receptor in European eel *Anguilla anguilla*. **J. Comp. Physiol.**, v. 165B, n. 8, p. 640-646, 1996.
- JEZIERSKA, B.; SARNOWSKI, P. The effect of mercury, copper and cadmium during single and combined exposure on oxygen consumption of *Oncorhynchus mykiss* Wal. and *Cyprinus carpio* L. larvae. **Arch. Polish Fish.**, v. 10, p.15-22, 2002.
- JEZIERSKA, B.; WITESKA, M. The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. **Soil Water Poll.**, v. 69, p. 107-114, 2007.
- JIALAL, I.; GRUNDY, S.D. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. **Ann. New York Acad. Sci.**, v. 669, p. 239-248, 1992.
- JIANG, Z.Y. et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. **Anal. Biochem.**, v. 202, p. 384-389, 1992.
- JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: ADAMS, S.M. **Biological indicators of stress in fish**, vol 8. Bethesda, Maryland: American Fisheries Symposium, 1990. p 67-79.
- JOBLING, M. The influences of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. **J. Fish Biol.**, v. 18, p. 385-400, 1981.
- JOBLING, M.; SPENCER, P. Effects of feeding on metabolic rate, and the specific dynamic action in plaice, *Pleuronectes platessa* L. **J. Fish Biol.**, v. 16, p. 629-638, 1980.
- JOHN, S. et al. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, p. 500-504, 2001.

- JOHNSTON, J.N.; SAVAGE, G.P. Mercury consumption and toxicity with reference to fish and fishmeal. **Nutrit. Abst.**, v. 61, p. 74-116, 1991.
- JONES, D.P. Glutathione distribution in natural products: absorption and tissue distribution. **Meth. Enzymol.**, v. 252, p. 3-13, 1995.
- JONES, L.R. et al. Ryanodine-induced stimulation of net  $Ca^{2+}$  uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 209, n. 1, p. 48-55, 1979.
- JORDÃO JÚNIOR, A.A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.
- JORNAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (JOCE). Posição Comum n. 7/2000/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à incineração de resíduos (2000/C 25/02), 2000. 44 p.
- JU, Y.K.; SAINT, D.A.; GAGE, P.W. Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. **J. Physiol.**, v. 497, p. 337-347, 1996.
- JUEL, C. Muscle fatigue and reactive oxygen species. **J. Physiol.**, v. 1, p. 576, 2006.
- JUNGWIRTH, A. et al. Activation of cell membrane potassium conductance by mercury in cultured renal epitheloid (MDCK) cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 146, p. 25-33, 1991.
- KAGI, J.H.R.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, v. 27, p. 8509-8515. 1988.
- KALININ, A.L. et al. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; Randall, D.J. **Physiology and biochemistry of fishes of the Amazon**. Manaus: Editora do INPA, 1996. p. 191-202.
- KALININ, A.L. et al. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus* during normoxia and exposed to graded hypoxia. **Rev. Brasil. Biol.**, v.60, n. 2, p. 249-254, 2000.
- KALININ, A.L. **Função respiratória de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de  $O_2$  ambiental: tomada de  $O_2$  branquial e cutânea, medidas diretas e determinações indiretas dos parâmetros ventilatórios**. 1996. 101 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.
- KALININ, A.L. **Função respiratória de traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch), em diferentes fases do crescimento às reduções do oxigênio dissolvido no ambiente: aspectos fisiológicos e adaptativos**. 1991. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1991.
- KALININ, A.L.; RANTIN, F.T.; GLASS, M.L. Dependence on body size of respiratory function in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during graded hypoxia. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 12, p. 47-51, 1993.
- KAPLAN, P. et al. Free radical-induced protein modification and inhibition of  $Ca^{2+}$ -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. **Mol. Cell Biochem.**, v. 48, p. 41-47, 2003.
- KAPLOWITZ, N.; AW, T.Y.; OOKHTENS, M. The regulation of hepatic GSH. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 25, p. 714-744, 1985.

- KARELS, A.E. et al. Effects of EFC-bleached kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. **Ecotoxicology**, v. 7, p. 123-132, 1998.
- KARIBE, A. et al. Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel alpha-tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin, abnormal myosin cycling, and poor prognosis. **Circulation**, v. 103, p. 65-71, 2001.
- KARNISKI, L.P. Hg<sup>2+</sup> and Cu<sup>+</sup> are ionophores, mediating Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup> exchange in liposomes and rabbit brush border membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 19218–19225, 1992.
- KASPER, D. et al. Mercury distribution in different tissues and trophic levels of fish from a tropical reservoir, Brazil. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 7, p. 751-758, 2009.
- KEATING, M.T.; SANGUINETTI, M.C. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. **Cell**, v. 104, p. 569-580, 2001.
- KEEF, K.D.; HUME, J.R.; ZHONG, J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels (Ca<sub>v</sub>1.2a,b) by protein kinases. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 281, p. C1743-C1756, 2001.
- KEEN, J.E. et al. Cardiac physiology in tunas. II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force-frequency relationship in atrial strips from akipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **Can. J. Zool.**, v. 70, p. 1211-1217, 1992.
- KEHRIG, H.A. et al. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. **Mar. Poll. Bull.**, v. 44, p. 1018–1023, 2002.
- KELLY, K. et al. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine models. **Environ. Health Perspect.**, v.106, p. 375-384, 1998.
- KERSTENS, A.; LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. The ventilation, extraction and uptake of oxygen in undisturbed flounders, *Platichthys flesus*: responses to hypoxia acclimation. **J. Exp. Biol.**, v. 83, p. 169-179, 1979.
- KHAN, M.G. **Rapid ECG interpretation**. Third Edition. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2008. 416 p.
- KIDD, K.A. et al. The influence of trophic level as measured by δ<sup>15</sup>N on mercury concentration in freshwater organisms. **Water Air Soil Poll.**, v. 80, p. 1011-1015, 1995.
- KIM, M.S.; AKERA, T. O<sub>2</sub> free radicals: cause os ischemia-reperfusion injury to cardiac Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. H252-H257, 1987.
- KISHIMOTO, C.; OHMAE, M.; TOMIOKA, N. QRS voltages are transiently increased at the superacute stage of experimental myocarditis. **Exp. Clin. Cardiol.**, v. 13, n. 1, p. 15-18, 2008.
- KITAHARA, S.E. et al. Mercúrio total em pescado de água-doce. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, p. 267-73, 2000.
- KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239-267, 2004.
- KLINCK, J. et al. Influence of water chemistry and natural organic matter on active and passive uptake of inorganic mercury by gilss of raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Aquatic Toxicol.**, v. 72, p. 161-175, 2005.
- KOHR, M.J. et al. cAMP-independent activation of protein kinase A by the peroxynitrite generator SIN-1 elicits positive inotropic effects in cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 48, p. 645-648, 2010.



- KOJIMA, T. et al. Blood parameters and electrocardiogram in squeezed fish simulating the effect of net damage and recovery. **Fish. Sci.**, v. 70, p. 860-866, 2004.
- KONHILAS, J.P.; IRVING, T.C.; de TOMBE, P.P. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. **Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.**, v. 67, p. 39-67, 2002.
- KÖNIG, A. et al. A quantitative analysis of fish consumption and coronary heart disease mortality. **Am. J. Prev. Med.**, v. 29, p. 335-346, 2005.
- KORSMEYER, K.E. et al. Cardiovascular function in swimming yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). **Am. Zool.**, v. 33, p. 33-44, 1993.
- KOSTIAL, K.; LANDEKA, M. The action of mercury ions on the release of acetylcholine from presynaptic nerve endings. **Experientia**, v. 31, p. 834-835, 1975.
- KRAMER, D.L.; MCCLURE, M. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. **Ibid.**, v. 7, p. 47-55, 1982.
- KRAMER, J.H. et al. Differential sensitivity of canine cardiac sarcolemmal and microsomal enzymes to inhibition by free radical-induced lipid peroxidation. **Circ. Res.**, v. 55, p. 120-124, 1984.
- KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 48, p. 439-446, 1996.
- KRÜGER, M.; LINKE, W.A. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 27, n. 5-7, p. 435-444, 2006.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. **Meth. Mol. Biol.**, v. 32, p. 9-15, 1994.
- KUMMERER K.; WALLENHORST, T.; KIELBASSA, A.M. Mercury emissions from dental chairs by disinfection. **Chemosphere**, v. 35, p. 825-833, 1997.
- KUSTER, G.M. et al. Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion in cardiac myocytes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 48, n. 9, p. 1182-1187, 2010.
- LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Response of DNA, proteins and membrane bilayer in the digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to tannins exposure. **Toxicol. in Vitro**, v. 18, p. 773-781, 2004.
- LACERDA, L.D. et al. Mercury concentrations in fish from the Itacaiúnas-Parauapebas river system, Carajás region, Amazon. **Anais Acad. Bras. Ciênc.**, v. 66, n. 3, p. 373-379, 1994.
- LACERDA, L.D. et al. Mercury content in shark species from the south-eastern brazilian coast. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 60, p. 571-576, 2000.
- LACERDA, L.D. Minamata livre de mercúrio. **Ciênc. Hoje**, v. 133, p. 25-31, 1997.
- LACERDA, L.D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 173-190, 2008.
- LACERDA, L.D.; SANTOS, A.F.; MARINS, R.V. Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. **Quim. Nova**, v. 30, p. 366-369, 2007.
- LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M. et al. Temperature dependence of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2) in the ventricles of tuna and mackerel. **Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.**, v. 286, p. R398-R404, 2003.

- LAROSE, C. et al. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 147C, p. 139-149, 2008.
- LAUDER, G.V. Pressure and water flow patterns in the respiratory tract of the bass, *Micropterus salmonides*. **J. Exp. Biol.**, v. 113, p. 151-164, 1984.
- LAURENT, P.; HOLMGREN, S.; NILSSON, S. Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 76A, p. 525-542, 1983.
- LAYLAND, J.; KENTISH, J.C. Positive force and  $[Ca^{2+}]_i$  frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 276, p. H9-H18, 1999.
- LAYLAND, J.; YOUNG, I.S.; ALTRINGHAM, J.D. The length dependence of work production in rat papillary muscles in vitro. **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 2491-2499, 1995.
- LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121-131, 2000.
- LEANER, J.J.; MASON, R.P. Methylmercury accumulation and fluxes across the intestine of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132C, p. 247-259, 2002.
- LEANER, J.J.; MASON, R.P. Methylmercury uptake and distribution kinetics in sheepshead minnows, *Cyprinodon variegatus*, after exposure to  $CH_3Hg$  spiked food. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, p. 2138-2146, 2004.
- LEERMAKERS, M.; LANSSENS, P.; BAEYENS, W. Storage and stability of inorganic and methylmercury solutions. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 336, p. 655-662, 1990.
- LEITÃO, C.M. **Zoogeografia do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1947. 416p.
- LEITE, R.G. A alimentação de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicum* (Pisces, Characidae), em áreas inundadas da ilha de Marchantaria, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 56-67, 2004.
- LEKNES I.L.; SAETERSDAL, T.S. Calcium in myocardial tissue and isolated mitochondria from a teleost. **Histochemistry**, v. 81, p. 149-51, 1984.
- LEONARD, S.S.; HARRIS, G.K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 37, p. 1921-1942, 2004.
- LEVESQUE, H.M. et al. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic Toxicol.**, v. 60, p. 257-267, 2002.
- LEWATOWSKI, B.; PYTKOWSKI, B. Cellular mechanisms of the relationship between myocardial force and frequency of contractions. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 50, p. 97-120, 1987.
- LEWIS, W.M.Jr. Morphological adaptations of cyprinodontoids for inhabiting oxygen deficient waters. **Copeia**, v. 1970, p. 319-326, 1970.
- LI, Q. et al. Effects of 12 metal ions on iron regulatory protein 1 (IRP-1) and hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-regulated genes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 213, p. 245-255, 2006.
- LIAO, C.Y. et al. Mercury accumulation and distribution in medaka after the exposure to sublethal levels of methylmercury. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 75, p. 584-591, 2005.

- LIAO, C.Y. et al. Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 22, p. 225-233, 2006.
- LIEBLER, D.C.; REED, D.J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K.B. (Ed.). **Free Radical Toxicology**. USA: Taylor & Francis, 1997. p. 141-171.
- LIM, S.; CHUNG, H.U.; PAEK, D. Low dose mercury and heart rate variability among community residents nearby to an industrial complex in Korea. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 10-16, 2010.
- LIMA, E.S.; CARATIN, R.F.; DOLIS, V.S. Peroxidação dos ácidos graxos. In: CURI, R. Et al. (Eds.). **Entendendo a gordura – Os ácidos graxos**. Editora Manole LTDA, 2002. p. 406-418.
- LIMA, F.C.T. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: REIS, R.E.; KULANDER, S.O.; FERRARIS, Jr.C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fish of south and central America**. Porto Alegre: EDPURCS. 2003. 174-181 p.
- LIMA-JUNIOR, S.D.; GOITEIN, R. Fator de condição e ciclo gonadal de fêmeas de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) no rio Piracicaba (SP, Brasil). **Inst. Pesca**, v. 32, p. 87-94, 2006.
- LINDE, A.R. et al. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: european eel and brown trout. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 49, p. 60-63, 2001.
- LIU, C; LI, R. Electrocardiogram and heart rate in response to temperature acclimation in three representative vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 142A, p. 416-421, 2005.
- LIU, Y.; GUTTERMAN, D.D. Oxidative stress and potassium channel function. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 4, p. 305-311, 2002.
- LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, p. 656-666, 2001.
- LIVINGSTONE, D.R. et al. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 26, p. 602-606, 1993.
- LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120, p. 43-49, 1998.
- LO, J.M.; WAIL, C.M. Mercury loss from water during storage: mechanisms and prevention. **Anal. Chem.**, v. 47, n. 11, p. 1869-1870, 1975.
- LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38-49, 1979.
- LOPES, A.G. **Efeitos da acidose láctica nos processos da contratilidade cardíaca do teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus***. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- LUCIER, G.W. et al. Effects of methylmercury on microsomal mixed function oxidase components of rodents. **Mol. Pharmacol.**, v. 9, p. 237-243, 1973.
- LUIZ-SILVA, W.; MATOS, R.H.R.; KRISTOCH, G.C. Geoquímica e índice de geoacumulação de mercúrio em sedimentos de superfície do estuário de Santos-Cubatão (SP). **Quím. Nova**, v. 25, p. 753-756, 2002.

- LUND, B.O.; MILLER, D.M.; WOODS, J.S. Mercury-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and lipid peroxidation *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. S181-S187, 1991.
- LUND, B.O.; MILLER, M.D.; WOODS, J.S. Studies on Hg(II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, p. 2017-2024, 1993.
- LUO, J. et al. Prolonged oxidative stress inverts the cardiac force-frequency relation: role of altered calcium handling and myofilament calcium responsiveness. **J. Mol. Cel. Cardiol.**, v. 40, p. 64-75, 2006.
- LYN, P. Mercury toxicity and antioxidants: part I: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. **Altern. Med. Rev.**, v. 7, p. 456-471, 2002.
- MACHADO, A.C. et al. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 24, p. 92-97, 2007.
- MacKINNON, D.L.; FARRELL, A.P. The effect of 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole on juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): sublethal toxicity testing. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 11, p. 1541-1548, 1992.
- MACLEOD, J.C.; PESSAH, E. Temperature effects on mercury accumulation, toxicity, and metabolism rate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish Res. Board Can.**, v. 30, p. 485-492, 1973.
- MAIA, I.G. ECG nas Arritmias Cardíacas. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica Ltda, 1989. 439 p.
- MAIDANA, M. et al. Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. **Chem. Biol. Interac.**, v. 159, 223-234, 2006.
- MALBROUCK, C. et al. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 135C, n. 1, p. 39-48, 2003.
- MALM, O. et al. Follow-up of mercury in fish, human hair and urine in Madeira and Tapajós basins, Amazon, Brazil. **Water Air Soil Pollut.**, v. 97, p. 45-51, 1997.
- MALM, O. et al. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 175, p.141-150, 1995.
- MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environ. Res.**, v. 77A, p. 73-78, 1998.
- MARCON, J. L. **Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa.** 1997. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). INPA, Universidade Federal da Amazônia, Manaus, 1997.
- MARICONDI-MASSARI, M. **Avaliação das respostas cardio-respiratórias de tilapia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Schwartz, 1983) às variações da temperatura ambiental e recuperação subsequente.** 1993. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1993.
- MARICONDI-MASSARI, M. et al. The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ECG waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J. Thermal Biol.**, v. 23, n. 5, p. 283-290, 1998.
- MARINS, R.V. et al. Geochemistry of mercury in sediments of a sub-tropical Coastal Lagoon, Sepetiba bay, Southeastern Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 61, p. 57-64, 1998.

- MARINS, R.V.; PARAQUETTI, H.H.M.; AYRES, G.A. Alternativa analítica para especiação físico-química de mercúrio em águas costeiras tropicais. **Quim. Nova**, v. 25, p. 372-378, 2002.
- MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basic medical biochemistry: a clinical approach**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 327-340.
- MARQUES, N.R. et al. Influência da densidade de estocagem no cultivo de alevitos de matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em condições experimentais. **Maringá**, v. 26, p. 55-59, 2004.
- MARSALEK, P.; SVOBODOVÁ, Z.; RANDAK, T. The content of total mercury and methylmercury in common caro from selected Czech ponds. **Aquacult. Int.**, v. 15, p. 299-304, 2007.
- MARTIN, J.K.; BLACK, M.C. Biomarker assessment of the effects of coal-strip mines contamination on channel fish. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 41, p. 307-320, 1998.
- MARVIN, D.E.; HEATH, A.G. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 27A, p. 349-355, 1968.
- MASCARENHAS, A.F.S. et al. Avaliação da concentração de mercúrio em sedimentos e material particulado no rio Acre, estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 61-68, 2004.
- MASON, R.O.; FITZGERALD, W.F.; MOREL, F.M.M. The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. **Geochim. Cosmochim. Acta**, v. 58, p. 3191-3198, 1994.
- MASON, R.P.; REINFELDER, J.R.; MOREL, F.M.M. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. **Environ. Sci. Technol.**, v. 30, p. 1835-1845, 1996.
- MASSARONI, L. et al. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. **Pharmacol. Res.**, v. 32, p. 27-36, 1995.
- MATIKAINEN, N.; VORNANEN, M. Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 203-220, 1992.
- MATOS, P. et al. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 89, p. 73-80, 2007.
- MATTIAS, A.T.; MORON, S.E.; FERNANDES, M.N.. Aquatic respiration during hypoxia of the facultative air-breathing *Hoplerythrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing *Hoplias malabaricus*. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 203-211.
- MATTIAS, A.T.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regain* (Loricariidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 311-315, 1998.
- MAURO, J.B.M.; GUIMARÃES, J.R.D.; MELAMED, R. Aguapé agrava contaminação por mercúrio. **Ciênc. Hoje**, v. 25, p. 68-71, 1999.
- MAYER, G. D. et al. Activation of the rainbow trout metallothionein-A promoter by silver and zinc. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134, p. 181-188, 2003.
- MAZON, A.F. et al. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial à biodiversidade: Estudo da toxicidade do cobre em curimatã, *Prochilodus scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae). In: ESPÍNDOLA, E.L.G. et al. **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. São Carlos: Editora RiMa, 2002. p. 327-340.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

- McDONALD, T.F. et al. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 365-507, 1994.
- McFARLAND, V. A. et al. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 37, p. 236-241, 1999.
- McKENZIE, D.J. et al. Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. **Phil. Trans. R. Soc.**, v. 362B, p. 2043-2059, 2007.
- McKIM, J.M. et al. Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish. Part 2. Malathion, carbaryl, acrolein, and benzaldehyde. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 6, p. 313-328, 1987.
- MEHRLE, P.M.; MAYER, F.L. Biochemistry/physiology. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application. New York: Hemisphere, 1984. p. 264-274.
- MEISSNER, G. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. **Cell Calcium**, v. 35, p. 621-628, 2004.
- MEISSNER, G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 6300-6306, 1986.
- MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Meth. Enzymol.**, v. 251, p. 3-7, 1995.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MELA, M. et al. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 68, p. 426-435, 2007.
- MICARONI, R.C.C.M. et al. Composto de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Quím. Nova**, v. 23, p. 487-495, 2000.
- MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J.L. Mitochondria and apoptosis. **Euro. J. Biochem.**, v. 252, p. 1-15, 1998.
- MILAEVA, E.R. The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation. **J. Inorg. Biochem.**, v. 100, p. 905-915, 2006.
- MILAN, D.J. et al. In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.**, v. 291, p. H269-H273, 2006.
- MILL, J.G. et al. Influence of the sarcoplasmic reticulum on the inotropic responses of the rat myocardium resulting from changes in rate and rhythm. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 1455-1465, 1994.
- MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. & LEITE, C.M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 399-408, 1992.
- MILSOM, W.K. et al. Extrabranhial chemoreceptors involved in respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 1765-1774, 2002.
- MIRLEAN, N.S.T. Mercury in lakes and lake fishes on a conservation-industry gradient in Brazil. **Chemosphere**, v. 60, p. 226-236. 2005.
- MOISEENKO, T.I. Morphophysiological rearrangements in fish in response to pollution (in the Light of S.S. Shvarts' Theory). **Russ. J. Ecol.**, v. 31, n. 6, p. 429-438, 2000.

- MØLLER-NIELSEN, T.; GESSER, H. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling at 20 and 10 °C in rainbow trout myocardium. **J. Comp. Physiol.**, v. 162B, p. 526-534, 1992.
- MONSERRAT, J.M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 146, p. 221-234, 2007.
- MONTEIRO, D.A. et al. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion) **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 143, p. 141-149, 2006.
- MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR<sup>®</sup> (methyl parathion) **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 149C, p. 40-49, 2009.
- MORAD, M.; SUZUKI, Y.J. Redox regulation of cardiac muscle calcium signaling. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 2, p. 65-71, 2000.
- MORAES, L.A.F.; LENZI, E.; LUCHESE, E.B. Mercury in two fish species from the Paraná river floodplain, Paraná, Brazil. **Environ. Poll.**, v. 98, p. 123-127, 1997.
- MORALES-AIZPURÚA, I.C. et al. Mercúrio total em cação comercializado em São Paulo - SP, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, p. 429-432, 1999.
- MOREIRA, C.M. et al. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 135C, p. 269-275, 2003.
- MOREIRA-RODRIGUES, M. et al. Cardiac dysfunction in HgCl<sub>2</sub>-induced nephrotic syndrome. **Exp. Biol. Med.**, v. 235, n. 3, p. 392-400, 2010.
- MORGAN, W.S.G. Fish locomotor behavior patterns as a monitoring tool. **J. Water. Pollut. Control. Fed.**, v. 51, p. 580-589, 1979.
- MORGANO, M.A.; GOMES, P.C.; MANTOVANI, D.M.B. Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, p. 250-253, 2005.
- MORRIS, S.; Van AARDT, W.J.; AHERN, M.D. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia. **Aquatic Toxicol.**, v. 75, p. 16-31, 2005.
- MOSLEN, M.T. Proteção contra lesão tecidual mediada pelos radicais livres. In: MOSLEN, M.T.; SMITH, C. (Eds.). **Radicais livres. mecanismos de lesão tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1995. p. 203-215.
- MOURAD, M.H. Effects of lindane on the electrocardiogram of eel, *Anguilla anguilla* L. **Acta Ichthyol. et Piscatoria**, v. 20, p. 77-84, 1990.
- MUCCI, A. et al. Mercury remobilization from flooded soils in a hydroelectric reservoir of Northern Quebec, La Grande-2 results of a soil resuspension experiment. **Can. J. Fish. Aquatic Sci.**, v. 52, p. 2507-2517, 1995.
- MUIR, B.S.; BUCKLEY, R.M. Gill ventilation in *Remora remora*. **Copeia**, v. 1967, p. 581-586, 1967.
- MULLINS, L.J. The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. **Am. J. Physiol.**, v. 236, p. C103-C110, 1979.

- MUÑOZ-CHAPULI, R.; HAMLETT, W.C. Epilogue: comparative cardiovascular biology of lower vertebrates. *J. Exp. Zool.*, v. 275, p. 249-251, 1996.
- MURATA, K. et al. Subclinical effects of prenatal methylmercury exposure on cardiac autonomic function in Japanese children. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v. 79, p. 379-386, 2006.
- MUUSZE, B. et al. Hypoxia tolerance of Amazon fish respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 120A, p. 151-156, 1998.
- NAJERA, I. et al. Effect of chemical speciation on toxicity of mercury to *Escherichia coli* biofilms and planktonic cells. *Environ. Sci. Technol.*, v. 39, p. 3116-3120, 2005.
- NAKAMURA, W. et al. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 358, p. 251-261, 1974.
- NAKAO, M. et al. Possibility for decreasing of mercury content in bluefin tuna *Thunnus orientalis* by fish culture. *Fish. Sci.*, v. 73, p. 724-731, 2007.
- NAM, Y.K. et al. Alteration of antioxidant enzymes at the mRNA level during short-term starvation of rockbream *Oplegnathus fasciatus*. *Fish. Sci.*, v. 71, p. 1385-1387, 2005.
- NASCIMENTO, E.L. et al. Mercúrio no plâncton de um lago natural amazônico, Lago Puruzinho (Brasil). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2, p. 67-72, 2007.
- NASCIMENTO, E.S.; CHASIN, A.A.M. **Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001. 176 p.
- NASCIMENTO, S.M. et al. Estudo comparativo de constituintes nutricionais e do teor de mercúrio total em peixes comercializados na cidade de Cananéia, litoral de São Paulo. In: 2009 INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE – INAC, 2009, Rio de Janeiro. **Anais... ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR – ABEN**. Disponível em: <<http://pintassilgo2.ipen.br/biblioteca/2009/inac/15238.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2010.
- NATH, K.A. et al. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int.*, v. 50, p. 1032-1043, 1996.
- NICOLA, M. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Rad. Biol. Med.*, v.21, p. 291-295, 1996.
- NIKINMAA, M.; PURSIHEIMO, S.; SOITAMO, A. Redox state regulates HIF-1 protein level, its DNA binding and phosphorylation in salmonid cells. *J. Cell Sci.*, v. 117, p. 3201-3206, 2004.
- NIKINMAA, M.; REES, B.B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 288, p. R1079-R1090, 2005.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.
- NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, v. 46, p. 243-254, 1998.
- NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.*, v. 24, p. 1311-1317, 2005.
- OAKES, K.D.; MCMASTER, M.E.; VAN DER KRAAK, G.J. Oxidative stress responses in long nose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. *Aquat. Toxicol.*, v. 67, p. 255-271, 2004.



- OAKES, K.D.; VAN DER KRAAK, G.J.. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in feral white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp and paper mill effluent. **Aquatic Toxicol.**, v. 63, p. 447-463, 2003.
- OHWEILER, O. A. Teoria e prática da análise quantitativa inorgânica. Volume 2. Brasília: Universidade de Brasília, 1968. 536 p.
- OKA, T. et al. Autonomic nervous functions in fetal type Minamata disease patients: assessment of heart rate variability. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 198, n. 4, p. 215-221, 2003.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. et al. Chronic and trophic effects of methylmercury on zebrafish muscle fibers. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 25, p. 304-305, 2008.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. et al. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environ. Res.**, v. 83, p. 286-292, 2000.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. et al. Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 25, p., 304-309, 2008.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. et al. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environ. Res.**, v. 101, p. 74-80, 2006.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. et al. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Res.**, v. 90, p. 217-225, 2002.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; GUMARÃES, J.R.D.; PFEIFFER, C. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 34, p. 190-195, 1996.
- OLIVEIRA, E.M. et al. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 128, p. 86-91, 1994.
- OLIVEIRA, E.M.; RAMIRES, P.R.; LANCHÁ JUNIOR, A.H. Nutrição e bioquímica do exercício. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, v. 18, p. 7-19, 2004.
- OLIVEIRA, E.M.; ROCHA, J.B.T.; SARKIS, J.J.F. In vitro and in vivo effects of HgCl<sub>2</sub> on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. **Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.**, v. 102, p. 97-102, 1994.
- OLIVEIRA, E.M.; VASSALLO, D.V. Effects of mercury on the contractility of isolated rat cardiac muscle. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 2, p. 1037-1040, 1992.
- OLIVEIRA, G.; FILHO, B. Reciclagem de insumos minerais e água em indústria cerâmica. In: VIII SIMPÓSIO DE GEOLOGIA DO SUDESTE, 8, 2003, São Pedro. **Anais...**
- OLIVEIRA, M.L.J. et al. Mercúrio total em solos de manguezais da baixada santista e ilha do cardoso, estado de São Paulo. **Quim. Nova**, v. 30, p. 519-524, 2007.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. et al. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environ. Res.**, v. 83, p. 286-292, 2000.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; GUMARÃES, J.R.D.; PFEIFFER, C. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 34, p. 190-195, 1996.

- OLLE, C.D. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR®) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus*.** 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- OLLE, C.D. **Função cardíaca do teleósteo *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erithrinidae) submetido a diferentes condições térmicas.** 2003. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
- OLLEN, A.; WENKE, A.; BIESTER, H. Mercury speciation analyses in HgCL<sub>2</sub>-contaminated soils and groundwater - implications for risks assessment and remediation strategies. **Water Res.**, v. 42, p. 91-100, 2008.
- OLSSON, P.E. Metallothionein in fish: induction and use in environmental monitoring. In: Taylor, E.W. (Ed.). **Toxicology of aquatic pollution: physiological, cellular and molecular approaches.** Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 187–203.
- OLSSON, P.E.; KILLE, P. Functional comparison of the metal-regulated transcriptional control regions of metallothionein genes from cadmium-sensitive and tolerant fish species. **BBA-Gene Struct. Exp.**, v. 1350, p. 325-334, 1997.
- OLSVIK, P.A., GUNDERSEN, P. ANDERSEN, R.A., ZACHARIASEN, K.E. Metal accumulation and metallothionein in two populations of trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments a run-off episode. **Aquat. Toxicol.**, v.50, p. 301-316, 2000.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION & DEVELOPMENT (OECD). **OECD Guidelines for Testing of Chemicals 203. Fish, Acute Toxicity Test.** OECD, Paris, 1992. p. 1-9. Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/17/20/1948241.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2006.
- ORUÇ, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 137C, p. 43-51, 2004.
- ORUÇ, E.O.; UNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127C, p. 291-296, 2000.
- OTT, M.E.; HEISLER, N.; ULTSCH, G.R. A re-evaluation of the relationship between temperature and the critical oxygen tension in freshwater fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 27, p. 349-355, 1980.
- OTTO, D.M.; MOON, T.W. 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 77, p. 281-287, 1995.
- PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 53, p. 331-347, 2002.
- PAIVA, M. P. **Fisioecologia da Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch ,1794), no Nordeste Brasileiro.** 1972. 140f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Sci. Total Environ.**, v. 309, p. 105-115, 2003.
- PANDEY, S. et al. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper pre-exposure. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 41, p. 345-352, 2001.

- PARAQUETTI, H.H.M. et al. Mercury distribution, speciation and flux in the Sepetiba Bay tributaries, SE Brazil. **Water Res.**, v. 38, p. 1439-1448, 2004.
- PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicol.**, v. 50, p. 109-124, 2000.
- PARVEZA, S.; RAISUDDINB, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 20, p. 112-117, 2005.
- PASCALICCHIO, A.A.E. **Contaminação por metais pesados: saúde pública e medicina ortomolecular**. São Paulo: Annablume, 2002. 132 p.
- PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Metabolic and functional alterations of copper in diabetes mellitus. **Rev. Nutr.**, v. 12, p. 213-224, 1999.
- PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquat. Toxicol.**, v. 65, p. 337-360, 2003.
- PERRY, S.F. Relationships Between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119A, p. 9-16, 1998.
- PERRY, S.F.; LAURENT, P. Environmental effect on fish gill structure and function. In: RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B. **Fish ecophysiology**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 231-264.
- PETRY, A.C.; PIANA, P.A.; AGOSTINHO, A.A. Effects of temperature on prey consumption and growth in mass of juvenile trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **J. Fish Biol.**, v. 70, p. 1855-1864, 2007.
- PFEIFFER, W.C. et al. Mercury concentrations in inland waters of gold mining areas in Rondônia, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 87/88, p. 233-240, 1989.
- PIRACENA, 1998. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/piracena/html/noticia27.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2006.
- PISTOLE, D.H.; PELES, J.D.; TAYLOR, K. Influence of metal concentrations, percent salinity, and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 148C, p. 48-52, 2008.
- PIZANGO-PAIMA, E.G. **Estudo da alimentação e composição corporal do matrinxã (*Brycon cephalus*) (Günther, 1869) (Characiformes, Characidae), na Amazônia Central. Manaus, AM. 1997. 138 f.** Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA/FUA, Manaus, 1997.
- PLEWINSKA, M. et al.  $\delta$ -aminolevulinatase deficient porphyria: identification of the molecular lesion in a severely affected homozygote. **Am. J. Genet.**, v. 49, p. 167-174, 1991.
- PLOCH, S.A. et al. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert-butyl hydroperoxide. **Aquat. Toxicol.**, v. 46, p. 231-240, 1999.
- POLLACK, M.; LEEUWENBURG, C. Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. In: SEN, C.K.; PACKER, L.; HÄNNINEN, O. (Eds.). **Handbook of oxidants and antioxidants in exercise**. Elsevier Science, 1999. p. 881-923.

- PORTER, C.M., JANZ, D.M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 54, p. 199-206, 2003.
- PORTNER, H.O.; GRIESHABER, M.K. Critical  $PO_2(s)$  in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: BICUDO, J.E.P.W. **The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993. p 330-357.
- PORTO, W.G. Radicais livres e neurodegeneração. Entendimento fisiológico: base para nova terapia? **Rev. Neurociênc.**, v. 9, n. 2, p. 70-76, 2001.
- POST, J.R.; VANDENBOS, R.; MCQUEEN, D.J. Uptake rates of food-chain and waterborne mercury by fish: field measurements, a mechanistic model, and an assessment of uncertainties. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 53, p. 395-407, 1996.
- POWELL, K.J. et al. Chemical speciation of Hg (II) with environmental inorganic ligands. **Aust. J. Chem.**, v. 57, p. 993-1000, 2004.
- POWELL, W.H.; HAHN, M.E. Identification and functional characterization of hypoxia-inducible factor 2 from the estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: interaction of HIF-2 with two ARNT2 splice variants. **J. Exp. Zool.**, v. 294, p. 17-29, 2002.
- PRABHU, S.D.; SALAMA, G. The heavy metal ions  $Ag^+$  and  $Hg^{2+}$  trigger calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 277, p. 47-55, 1990.
- PRASAD, M.S. Effect of short-term exposure to mercuric chloride on the air-breathing catfish, *Heteropneustes fossilis*. II. Scanning electron microscopic study of the gill. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 7, p. 337-345, 1994.
- PROZIALCK, W.C. et al. Cadherins and NCAM as potential targets in metal toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 182, p. 255-265, 2002.
- PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species their formation, lifetimes and reactions. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 657-667, 1986.
- PUEYO, E. et al. Characterization of qt interval adaptation to RR interval changes and its use as a risk-stratifier of arrhythmic mortality in amiodarone-treated survivors of acute myocardial infarction. **Trans. Biomed. Eng.**, v. 51, n. 9, p. 1511-1520, 2004.
- QUIG, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. **Alter. Med. Rev.**, v. 3, p. 262-270, 1998.
- RABITTO, I.S. et al. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 60, p. 147-156, 2005.
- RADHAKRISHNAIAH, K.; SURESH, A.; SIVARAMAKRISHNA, B. Effect of sublethal concentration of mercury and zinc on the energetics of freshwater fish *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Acta Biol. Hung.**, v. 4, p. 375-385, 1993.
- RAJANNA, B. et al. Modulation of protein kinase C by heavy metals. **Toxicol. Lett.**, v. 81, p. 197-203, 1995.
- RAM, R.N.; SATHYANESAN, A.G. Mercurial induced brain monoamine oxidase inhibition in the teleost *Channa punctatus* (Bloch). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 35, p. 620-626, 1985.
- RAMAMOORTHY, S.; BADDALOO, E.G. 1995. **Handbook of chemical toxicity profiles of biological species**. Volume 1. Aquatic Species. Florida: CRC Press Inc., 1995. 386 p.

- RAMAMURTHI, R. et al. Toxicity of mercury to some freshwater organisms. **Geobios**, v. 9, p. 89-90, 1982.
- RANA, S.V.S.; SINGH, R.; VERMA, S. Mercury-induced lipid peroxidation in the liver, kidney, brain and gills of a freshwater fish *Channa punctatus*. **J. Ichthyol.**, v. 42, p. 255-259, 1995.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application**. New York: London Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 666 p.
- RANDALL, D. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 275-288, 1982.
- RANTIN, F.T. Effects of environmental oxygen changes on cardio-respiratory function in fish. In: BICUDO, J.E.P.W. **The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993. p. 330-357.
- RANTIN, F.T. et al. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environ. Biol. Fish.**, v. 36, p. 93-97, 1993.
- RANTIN, F.T. et al. Electrocardiographic characterization of myocardial function in normoxic and hypoxic teleosts. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 1277-1289, 1995.
- RANTIN, F.T. et al. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life in two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish. Biol.**, v. 41, p. 805-812, 1992.
- RANTIN, F.T. et al. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119A, p. 991-997, 1998.
- RANTIN, F.T.; JOHANSEN, K. Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. **Environ. Biol. Fishes**, v. 11, p. 221-228, 1984.
- RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 169-180.
- RANTIN, F.T.; MARINS, M.A. Como os teleósteos respondem à hipóxia ambiental – uma revisão. **Ann. Simp. Bras. Aquicul. III**, v. 111, p. 673-692, 1984.
- REDDY, P.S.; BHAGYALAKSHMI, A. Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 29, p. 255-264, 1994.
- REDDY, R.S. et al. In vitro effect of mercury and cadmium on brain Ca<sup>2+</sup> ATPase of the catfish *Ictalurus punctatus*. **Bull. Env. Contamin. Toxicol.**, v. 41, p. 324-328, 1988.
- REED, D.J. Glutathione: toxicological implications. **Ann. Rev. Pharmacol.Toxicol.**, v. 30, p. 601-630, 1990.
- REEVES, I.P.; BAILEY, C.A.; HALE, C.C. Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemal vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 4948-4955, 1996.
- RÉGINE, M.B.; GILLES, D.; YANNICK, D. ; ALAIN, B. Mercury distribution in fish organs and food regimes: significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin). **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 262-270, 2006.

- REGOLI, F. et al. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Mar. Pollut. Bull.**, v. 44, p. 912–922, 2002.
- REGOLI, F. et al. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 2120-2129, 2003.
- REID, M.B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro*. **J. Appl. Physiol.**, v. 73, p. 1797-1804, 1992.
- REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120C, p. 1-27, 1998.
- REMACLE, J. et al. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. **Biochem. J.**, v. 286, p. 41-46, 1992.
- REQUENA, J.R.; LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 221–226, 2003.
- RESENDE, E.K. Trophic structure of fish assemblages in the Lower Miranda River, Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 60, p. 389-403, 2000.
- REZNICK, A.Z., PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Met. Enzymol.**, v. 233, p. 357-363, 1994.
- RHEE, H.M.; CHOI, B.H. Hemodynamic and electrophysiological effects of mercury in intact anesthetized rabbits and in isolated perfused hearts. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 50, p. 281-290, 1989.
- RIOS, F.S. et al. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140A, p. 281-287. 2005.
- RIOS, F.S. **Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (Boch, 1794) (Erythrinidae) submetida à privação de alimento e à realimentação**. 2001. 104 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- RIOS, F.S.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of long-term food deprivation on respiration e hematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **J. Fish Biol.**, v. 61, p. 85-95, 2002.
- RIVAROLI, L. **Respostas cronotrópicas e inotrópicas do miocárdio ventricular de três espécies de peixes tropicais ecologicamente distintas: curimatá, *Prochilodus lineatus*, traíra, *Hoplias malabaricus*, e cascudo, *Hypostomus reagani***. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- 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.**, v.145A, p.322-327, 2006.
- ROCHA, A.A., PEREIRA, D.N.; PÁDUA, H.B. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da Represa Billings. São Paulo (Brasil). **Rev. Saúde Públ.**, v. 19, p. 401-410, 1985.
- ROCHA, M.L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Importance of the sarcoplasmic reticulum and adrenergic stimulation on the cardiac contractility of the neotropical teleost *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions. **J. Comp. Physiol.**, v. 177B, p. 713-721, 2007.

- RODRIGUEZ-ARIZA, A. et al. Biochemical effects of environmental pollution in fishes from Spanish South-Atlantic littoral. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 19, 301S, 1991.
- ROESIJADI, G. 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. **Comp. Biochem. Physiol.** 113C: 117-123.
- ROESIJADI, G.; ROBINSON, W.E. Metal regulation in aquatic animals: mechanism of uptake, accumulation and release. In: MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. (eds.). **Aquatic toxicology; molecular, biochemical and cellular perspectives**. London: Lewis Publishers, 1994. p. 387-420.
- ROSEIN, G.E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismo de dano, estratégia para detecção e implicações biológicas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.
- ROSSI, A.D. et al. Modification of Ca<sup>2+</sup> signaling by inorganic mercury in PC12 cells. **FASEB J.**, v. 7, p. 1507-1514, 1993.
- ROSSONI, L.V. et al. Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 989-997, 1999.
- ROTRUCK, J.T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588-90, 1973.
- ROVER, J.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.
- RUAS, C.B.G. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 71, p. 86-93, 2008.
- RUDD, J.W.M.; FURUTANI, A.; TURNER, M.A. Mercury methylation by fish intestinal contents. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 40, p. 777-782, 1980.
- RYU, S. K.; PARK, J. S.; LEE, I. S. Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134, p. 101-107, 2003.
- SAHIB, I.K.A.; SAMBASIVA RAO, K.R.S.; RAMANA RAO, K.V. Effects of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mossambica* (Peters), as measured through incorporation of (14C) amino acids. **Toxicol. Lett.**, v. 20, p. 63-67, 1984.
- SAINT-PAUL, U.; BERNARDINO, G. Behavioural and ecomorphological responses of the neotropical pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae) to oxygen-deficient waters. **Exp. Biol. (Berlin)**, v. 48, p. 19-26, 1988.
- SAITO, T. Effects of vagal stimulation on the pacemaker action potentials of carp heart. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 44A, p. 191-199, 1973.
- SAKURAGUI, M.M.; SANCHES, J.R.; FERNANDES, M.N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. **J. Comp. Physiol.**, v. 173B, p. 309-317, 2003.
- SALANT, W.; BRODMAN, K. The effect of mercury on cardiac inhibition. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 36, p. 195-202, 1929.
- SALONEN, J.T. et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. **Circulation**, v. 91, p. 645-55, 1995.

- SALVADOR, M. et al. Estresse oxidativo e doenças. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.A. (Eds.). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. CANOAS: Editora ULBRA, 2004. p. 69-110.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Inhibition of gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the eel, *Anguilla anguilla*, by fenitrothion. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 38, p. 132-136, 1997.
- SANDHEINRICH, M.B.; MILLER, K.M. Effects of dietary methylmercury on reproductive behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 25, p. 3053-3057, 2006.
- SANTACRUZ-TOLOZA, L. et al. Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 1, p. 182-188, 2000.
- SANTER, R.M. et al. On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 76A, p. 453-457, 1983.
- SANTER, R.M. Morphology and innervation of the fish heart. **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.**, v. 89, p. 1-102, 1985.
- SANTER, R.M.; COBB, J.L.S. The fine structure of the heart of the teleost *Pleuronectes platessa* L. **Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.**, v. 131, p. 519-528, 1972.
- SANTER, R.M.; WALKER, M.G. Morphological studies on the ventricle of teleost and elasmobranch hearts. **J. Zool.**, v. 190, p. 259-272, 1980.
- SANTOS, E.C.O. et al. Diagnóstico das condições de saúde de uma comunidade garimpeira na Região do Tapajós, Itaituba, Pará-Brasil (1992). **Cad. Saúde Pub.**, v.11, p. 212-215, 1995.
- SANTOS, E.C.O. et al. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 6, p. 171-185, 2003.
- SANTOS, E.O. Garimpagem e saúde. In: ARMIN, M.; REHAAG, R. (Eds.). **Conseqüências da garimpagem no âmbito social e ambiental da Amazônia**. Belém, Pará: CEJUP, 1993. p. 36-37.
- SARAFIAN, T.A. Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. **Met. Ions Biol. Syst.**, v. 36, p. 415-444, 1999.
- SARKAR, S. et al. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 9, p. 144-149, 1995.
- SASTRYA, K.V.; SHARMA, K. Mercury induced hematological and biochemical anomalies in *Ophiocephalus (Channa punctatus)*. **Toxicol. Lett.**, v. 5, p. 245-249, 1980.
- SATCHELL, G.H. **Physiology and form of fish circulation**. New York: Cambridge University Press, 1991. 235 p.
- SAUNDERS, R.L. The irrigation of the gills in fishes. I. Efficiency of oxygen uptake in relation to the respiratory flow activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Can. J. Zool.**, v. 40, p. 817-862, 1962.
- SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 56, p. 295-301, 2003.
- SCHAME, F.A.X. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. **Science**, v. 206, p. 700-702, 1979.



- SCHLENK, D.; DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, v. 177, p. 367-379, 1999.
- SCHLENK, D.; ZHANG, Y.S.; NIX, J. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral and caged fish species correlates with muscle mercury levels. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 31, p. 282-286, 1995.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal**. Adaptação e meio ambiente. 5. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Comp. Imp. Ltda., 2002. 611 p.
- SCHNEIDER, N.S. et al. Mechanism of the Frank-Starling law. - A stimulation study with a novel cardiac muscle contraction model that includes titin and troponin I. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 41, p. 522-536, 2006.
- SCHURMANS-STEKHOVENS, F.; BONTING, S.L. Transport adenosine triphosphatase and functions. **Physiol. Rev.**, v. 61, p.1-76, 1981.
- SCHWARTZ, A. et al. The Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase membrane transport system importance in cellular function. In: BRONNER, F. (Ed.). **Current topics in membranes and transport**. New York: Academic Press, 1972, p.1-82.
- SCORVO-FILHO, J.D. et al. Piscicultura em São Paulo: custos e retornos de diferentes sistemas de produção na safra de 1996/1997. **Inform. Econom.**, v. 28, p. 41-60, 1998.
- SELLERS, C.M. The effect of sublethal concentrations of copper and zinc on ventilatory activity, blood oxygen and pH in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Water Res.**, v. 9, p. 401-408, 1975.
- SEMENZA, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, p. 1474-1480, 2000.
- SEN, C.K. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. **Curr. Top. Cell. Regul.**, v. 36, p. 1-30, 2000.
- SEN, C.K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 653S-669S, 2000.
- SHAETER, E. et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 17, p. 429-437. 1994.
- SHAH, S.L.; ALTINDAG, A. Hematological parameters of tench (*Tinca tinca* L.) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal mercury treatments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 73, p. 911-918, 2004.
- SHAMOO, A.E.; MACLENAM, H. Separate effects of mercurial compounds on the ionophoric and hydrolytic functions of the (Ca<sup>++</sup> Mg<sup>++</sup>) - ATPase of sarcoplasmic reticulum. **J. Memb. Biol.**, v. 25, p. 65-74, 1975.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, p. 61-71, 1990.
- SHERWOOD, G.D. et al. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (<sup>137</sup>Cs) technique. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 57, p. 441-450, 2000.
- SHI, H. et al. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140, p. 115-121, 2005.

- SHIELS, H.A. et al. The sarcoplasmic reticulum plays major role in atrial muscle of yellowfin tuna. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p. 881-890, 1999.
- SHIELS, H.A.; FARRELL, A.P. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from Pacific mackerel (*Scomber japonicus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 125A, p. 331-341, 2000.
- SHIELS, H.A.; STEVENS, E.D.; FARRELL, A.P. Effects of temperature, adrenaline and ryanodine on power production in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ventricular trabeculae. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 2701-2710, 1998.
- SHIELS, H.A.; VORNANEM, M.; FARRELL, A.P. The force - frequency relationship in fish hearts - a review. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132A, p. 811-826, 2002.
- SHIELS, H.A.; WHITE, E. The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. **J. Exp. Biol.**, v. 211, p. 2005-2013, 2008.
- SHISTIK, E. et al. Crucial role of N-terminus in function of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel and its modulation by protein kinase C. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 17901-17909, 1998.
- SHOAL, R. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 273, p. 59-63, 2002.
- SIBLERUD, R.L. The relationship between mercury from dental amalgam and the cardiovascular system. **Sci. Total Environ.**, v. 99, p. 23-35, 1990.
- SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular function. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, p. 916-921, 1999.
- SILVA, A.M.M., et al. Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxid formation on tissues of rats. **Environ. Poll.**, v. 105, p. 243-249, 1999.
- SILVA, C.A. **Especiação do mercúrio na cadeia trófica pelágica de uma costa sujeita a ressurgência - Cabo Frio-RJ.** 2006. 142 f. Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental), Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
- SILVA-FILHO, E.V. et al. Mercury deposition through litterfall in an Atlantic Forest at Ilha Grande, Southeast Brazil. **Chemosphere**, v. 65, p. 2477-2484, 2006.
- SILVEIRA, L.R. et al. Regulação metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio durante a contração muscular: efeito do glicogênio na manutenção do estado redox intracelular. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 14, n. 1, p. 57-63, 2008.
- SIMÕES, K. et al. Myoarchitecture and vasculature of the heart ventricle in some freshwater teleosts. **J. Anat.**, v. 200, p. 467-475, 2002.
- SIMÕES, K. et al. Structure and vascularization of the ventricular myocardium of *Piaractus mesopotamicus* and *Clarias gariepinus* (Teleostei). **Anat. Histol. Embryol.**, v. 28, p. 243-246, 1999.
- SINGH, S.M.; SIVALINGAM, P.M. In vitro study on the interactive effects of heavy metals on catalase activity of *Sarotherodon mossambicus* (Peters). **J. Fish Biol.**, v. 20, p. 683-688, 1982.
- SINHA, T.K.P.; K. KUMAR, K. Acute toxicity of mercuric chloride to *Anabas testudineus* (Bloch). **Environ. Ecol.**, v. 10, p. 720-722, 1992.

- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à aquicultura. Boletim Técnico 1.** Jaboticabal: FUNEP, 1994. 72 p.
- SKAK, C.; BAATRUP, E. Quantitative and histochemical demonstration of mercury in the inner ear of trout, *Salmo trutta*, exposed to dietary methylmercury and dissolved mercury chloride. **Aquatic Toxicol.**, v. 25, p. 55-70, 1993.
- SKIDMORE, J.F. Respiration and osmoregulation in rainbow trout in gills damaged by zinc sulphate. **J. Exp. Biol.**, v. 52, p. 481-494, 1970.
- SMITH, C.A. et al. Ethanol-mediated CYP1A1/2 induction in rat skeletal muscle tissue. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 69, p. 223-232, 2000.
- SMITH, F. M.; JONES, D. R. The effects of changes in blood oxygen carrying capacity on ventilation volume in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Exp. Biol.**, v. 97, p. 325-335, 1982.
- SMITH, L.S.; BRETT, J.R.; DAVIS, J.C. Cardiovascular dynamics in swimming adult sockeye salmon. **J. Fish Res. Bd. Can.**, v. 24, p. 1775-1790, 1967.
- SNARSKY, V.M.; OLSON, G.F. Chronic toxicity and bioaccumulation of mercury chloride in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Aquatic Toxicol.**, v. 2, p. 143-156, 1982.
- SNODGRASS, J.W. et al. Effects of trophic status and wetland morphology, hydroperiod and water chemistry on mercury concentrations in fish. **Can. J. Fish Aquatic Sci.**, v. 57, p. 171-180, 2000.
- SOARES, S.S. et al. Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 147C, p. 168-178, 2008.
- SOARES, S.S.; MARTINS, H.; AURELIANO, M. Vanadium distribution following decavanadate administration. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 50, p. 60-64, 2006.
- SOITAMO, A.J. et al. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 19699-19705, 2001.
- SOLOMON, H.S.; HOLLENBERG, N.K. Catecholamine release: mechanism of mercury-induced vascular smooth muscle contraction. **Am. J. Physiol.**, v. 229, p. 8-12, 1975.
- SOUTHARD, J. et al. Mercurial toxicity and perturbation of the mitochondrial control system. **Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.**, v. 33, p. 2147-2153, 1974.
- SOUTHWORTH, G.R. et al. Form on mercury in estream fish exposed to high concentrations of dissolved inorganic mercury. **Chemosphere**, v. 30, p. 779-787, 1994.
- SOUZA de ASSIS, G.P. et al. Effects of small concentrations of mercury on the contractile activity of the rat ventricular myocardium. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134C, p. 375-383, 2003.
- SOUZA, R.H.S. et al. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. **J. Comp. Physiol.**, v. 171B, n. 6, p. 483-489, 2001.
- STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**, v. 257, p. 1120-1124, 1992.
- ST-AMAND, L. et al. Effects of inorganic mercury on the respiration and the swimming activity of shrimp larvae, *Pandalus borealis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 122C, p. 33-43, 1999.

- STARA, H.; DRAHOTA, Z. Inhibition of mitochondrial ATPase by Hg<sup>++</sup> ions. **Physiol. Behav.**, v. 27, p. 193-198, 1978.
- STAUB, B.P. et al. Respiratory and reproductive characteristics of eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting a coal ash settling basin. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 46, p. 96-101, 2004.
- STEFFENSEN, J.F. The transition between branchial pumping and ram ventilation in fishes: energetic consequences and dependence on water oxygen tension. **J. Exp. Biol.**, v. 114, p. 141-150, 1985.
- STEFFENSEN, J.F.; LOMHOLT, J.P. Energetic cost of branchial ventilation in the sharksucker, *Echeneis naucrates*. **J. Exp. Biol.**, v. 103, p. 185-192, 1983.
- STEFFENSEN, J.F.; LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Gill ventilation and O<sub>2</sub> extraction during graded hypoxia in two ecologically distinct species of flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Environ. Biol. Fishes**, v. 7, p. 157-163, 1982.
- STENTIFORD, G.D. et al. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Mar. Environ. Res.**, v. 55, p. 137-159, 2003.
- STINSON, C.M.; MALLAT, J. Branchial ion fluxes and toxicant extraction efficiency in lamprey. (*Petromyzon marinus*) exposed to methyl mercury. **Aquat. Toxicol.**, v. 15, p. 237-252, 1989.
- STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 18, p. 321-336, 1995.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Braz. J. Med. Res.**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.
- STRASBOURG, D.W. Notes on the respiration of small *Remora remora*. **Copeia**, v. 1, p. 58-60, 1957.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan S.A., 1996. 1000p.
- SU, J.Y.; CHEN, W.J. The effects of methylmercury on isolated cardiac tissues. **Am. J. Pathol.**, v. 95, p. 753-764, 1979.
- SUNDIN, L.I. et al. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*) O<sub>2</sub> chemoresponses. **Resp. Physiol.**, v. 116, p. 181-199, 1999.
- SURESH, A. et al. Comparative study on the inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc. **Biochem Int.**, v. 26, n. 2, p. 367-375, 1992.
- SURESH, A. et al. Comparative study on the inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc. **Biochem. Int.**, v. 26, p. 367-375, 1992.
- SUZUKI, K.T. et al. Production of hydroxyl radicals by copper-containing metallothionein: roles as peroxidant. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 144, p. 231-237, 1996.
- SZEBEDINSZKY, C. et al. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, p. 597-607, 2001.
- TABATABAIE, T.; FLOYD, R.A. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 314, p. 112-119, 1994.

- TAN, X. et al. Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. **J. Tox. Environ. Health**, v. 38, p. 159-170, 1993.
- TANAN, C.I. et al. Effects of mercury intoxication on the response of horizontal cells of the retina of thraira fish (*Hoplias malabaricus*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 987-995, 2006.
- TANSKANEN, A.J. et al. The role of stochastic and modal gating of cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels on early afterdepolarizations. **Biophys. J.**, v. 88, p. 85-95, 2005.
- TATARA, C.P.; NEWMAN, M.C.; MULVEY, M. Effect of mercury and Gpi-2 genotype on standard metabolic rate of eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, p. 782-786, 2001.
- TAVARES, G.A. et al. Mercury in the Moji-Guaçu River Basin, SP-Brazil: the link between marginal lagoons and river contribution assessed by  $^{210}Pb$  dating profiles. **Ambio**, v. 32, p. 47-51, 2003.
- TAYLOR, A.A.; SHAPPEL, B.S. Espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão do neutrófilo e do endotélio e mediadores inflamatórios derivados dos lipídios na lesão por isquemia-reperfusão do miocárdio. In: MOSLEN, M.T.; SMITH, C.V. (Eds.) **Radicais Livres: mecanismos de lesão tecidual**. Interlivros, 1995, p. 65-141.
- TAYLOR, E.W.; JORDAN, D.; COOTE, J.H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol. Rev.**, v. 79, n. 3, p. 855-916, 1999.
- TELES, M.P.; SANTOS, M.A. Biotransformation, stress and genotoxic effects of  $17\beta$ -estradiol in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Environ. Int.*, v. 32, p. 470-477, 2006.
- TELES, M.P.M. **Efeitos fisiológicos e genotóxicos induzidos por contaminantes ambientais em peixes**. 2006. 295 f. Tese (Doutorado), Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal.
- TEUSCHLER, L.K. et al. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 58, p. 1283-1291, 2005.
- THILLART, G.V.D. et al. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical  $O_2$  levels for aerobic and anaerobic metabolism. **Mar. Ecol. Progress**, v. 104, p. 109-117, 1994.
- THOMAS, M.J.; HAMMAN, B. & TIBBITS, G.F. Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, dogfish and hagfish. **J. Exp. Biol.**, v. 199, p. 1999-2009, 1996.
- THOMAZ, J.M. **Efeito do organofosforado triclorfon (NEGUVON®) sobre a função cárdio-respiratória da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- THOMAZ, J.M. et al Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1413-1424, 2009.
- THOMAZ, J.M. Morphological studies on the heart ventricle of matrinxã (*Brycon amazonicus*) and trahira (*Hoplias malabaricus*). **Annals of Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology**. 2010. p. 91.
- TIBBITS, G.F. et al.  $Ca^{2+}$  transport in myocardial sarcolemma from rainbow trout. **Am. J. Physiol. Rev.**, v. 259, p. R453-R460, 1990.

- TIBBITS, G.F.; HOVE-MADSEN, L.; BERS, D.M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. **Can. J. Zool.**, v. 69, p. 2014-2019, 1991.
- TIBBITS, G.F.; MOYES, C.D.; HOVE-MADSEN, L. Excitation-contraction coupling in the teleost heart. In: **Fish Physiology: The Cardiovascular System**. New York: Academic Press Inc., v. 12A, pp. 267-303, 1992.
- TIBBITS, G.F.; XU, L. & SEDARAT, F. Ontogeny of excitation-contraction coupling in the mammalian heart. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132A, p. 691-698, 2002.
- TIITU, V. **Temperature as a modifier of fish cardiac contractility**. 2002. 110 f. PhD Thesis. University of Joensuu, Finland.
- TOKUR, B.; KORKMAZ, K. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. **Food Chem.**, v. 104, 754-760, 2007.
- TOMAZELLI, A.C. **Estudo comparativo das concentrações de cádmio, chumbo e mercúrios em seis bacias hidrográficas do estado de São Paulo**. 2003. 124 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- TORRES, M.A.; NETO, P.C. Determinação do índice redox de glutathiona, um biomarcador de contaminação marinha em algas, utilizando HPLC acoplado a um detector eletroquímico flow-through. **Rev. Analytica**, v. 30, p. 96-104, 2007.
- TORT, L.; MADSEN, L. The effects of heavy metals cadmium and zinc on the contraction of ventricular fibres in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 99C, p. 353-356, 1991.
- TOTA, B. Vascular and metabolic zonation in the ventricular myocardium of mammals and fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 76A, p. 423-437, 1983
- TOWBIN, J.A.; BOWLES, N.E. Molecular genetics of left ventricular dysfunction. **Curr. Mol. Med.**, v. 1, p.81-90, 2001.
- TRIMM, J.L.; SALAMA, G.; ABRAMSON, J.J. Sulphydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 16092-16098, 1986.
- TRUDEL, M.; RASMUSSEM, J.B. Modeling the elimination of mercury by fish. **Environ. Sci. Technol.**, v. 31, p. 1716-1722, 1997.
- TSAI, C.L.; JANG, T.H.; WANG, L.H. Effects of mercury on serotonin concentration in the brain of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Neuroscience Letters**, v. 184, p. 208-211, 1995.
- TSUZUKI, Y.; YAMADA, T. Inhibitory actions of mercury compounds against glucose-6-phosphate dehydrogenase from yeast. **J. Toxicol. Sci.**, v. 4, p. 105-113, 1979.
- TUOMOLA, L. et al. Fish mercury development in relation to abiotic characteristics and carbon sources in a six-year-old, Brazilian reservoir. **Sci. Total Environ.**, v. 390, p. 177-187, 2008.
- UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci.**, v. 51, p. 1083-1094, 1992.
- ULTSCH, G.R. et al. Metabolism, critical oxygen tension, and habitat selection in darters (*Etheostoma*). **Ecology**, v. 59, n. 1, p. 99-107, 1978.
- ULTSCH, G.R.; OTT, M.E.; HEISLER, N. Standard metabolic rate, critical oxygen tension, and aerobic scope for spontaneous activity of trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*) in acidified water. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 67A, p. 329-335, 1980.

- UNGVARI, Z.; WOLIN, M.S.; CSISZAR, A. Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling? **Antioxid. Redox Signal**, v. 8, p. 1121-1129, 2006.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **Analytical Methods "Flame Atomic Absorption Spectrometry" Varian, Publication nº 85**. The official compendia of standards, 2000.
- USUKI, F. et al. Chronic low-dose methylmercury administration decreases mitochondrial enzyme activities and induces myopathic changes in rats. **J. Health Sci.**, v.47, p. 162-167, 2001.
- VAGLIO, A.; LANDRISCINA, C. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 43, p. 111-116, 1999.
- VAL, A.L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. Manaus, AM: Editora do INPA, 1995. 160 p.
- VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 64, p. 178-189, 2006.
- VALERA, B.; DEWAILLY, E.; POIRIER, P. Cardiac autonomic activity and blood pressure among Nunavik Inuit adults exposed to environmental mercury: a cross-sectional study. **Environ. Health**, v. 7, p. 29-40, 2008.
- VAN der OOST, R. et al. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biotasediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. **Aquatic Toxicol.**, v. 35, p. 21-46, 1996.
- VAN der OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, p. 57-149, 2003.
- VAN DER WEIDEN, M.E.J. et al. Concurrence of P450 1A1 induction and toxic effects after administration of a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v. 24, p. 123-142, 1992.
- VAN WASSENBERGH, S.; AERTS, P.; HERREL, A. Hydrodynamic modeling of aquatic suction performance and intra-oral pressures: limitations for comparative studies. **J. R. Soc. Interface**, v. 3, p. 507-514, 2006.
- VARANASI, U. et al. Chemical carcinogenesis in feral fish: uptake, activation, and detoxification of organic xenobiotics. **Environ. Health. Perspect.**, v. 71, p. 155-170, 1987.
- VARIAN, K.D. et al. Impairment of diastolic function by lack of frequency-dependent myofilament desensitization in rabbit right ventricular hypertrophy. **Circ. Heart Fail.**, v. 2, p. 472-481, 2009.
- VASSALLO, D.V. et al. Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 67, n. 1, p. 39-45, 1996.
- VASSALLO, D.V. et al. Control of rest potentiation in ventricular miocardium by the Na-Ca exchange mechanism. **Acta Physiol. Pharmacol.**, v. 40, p. 129-136, 1990.
- VASSALLO, D.V. et al. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 156, p. 113-118, 1999.
- VASSALO, D.V.; MILL, J.G.; ABREU, G.L. Control of rest potentiation in ventricular myocardium by Na-Ca exchange mechanism. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 40, p. 129-136, 1990.

- VASSALO, D.V.; OLIVEIRA, E.M.; STEFANON, I. Contratilidade miocárdica. In: AIRES, M.M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p. 435-469.
- VENDEMIALE, G. Increased stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of n-acetylcysteine and interferon- $\gamma$ . **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 175, p.130-139. 2001.
- VENTURINO, A. et al. . Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, v. 8, p. 167-186, 2003.
- VERLECAR, X.N.; JENA, K.B.; CHAINY, G.B.N. Modulation of antioxidant defences in digestive ganglion of *Perna viridis* (L.), on mercury exposure. **Chemosphere**, v. 71, p. 1977-1985, 2008.
- VERLECAR, X.N.; JENA, K.B.; CHAINY, G.B.N.. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. **Chem. Biol. Interact.**, v. 167, p. 219–226, 2007.
- VIARENGO, A. et al. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Mar. Environ. Res.**, v. 44, p. 69-84, 1997.
- VIEIRA, L. M.; ALHO, C.J.R. Contaminação por mercúrio em sedimento e moluscos da Bacia do Rio Bento Gomes, MT. – Corumbá. **Boletim de Pesquisa - Embrapa Pantanal**, v. 58, 20 p., 2004.
- VIEIRA, L.M. **Avaliação dos níveis de mercúrio na cadeia trófica como indicador de sua biomagnificação em ambientes aquáticos da região do Pantanal**. 1991. 214 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1991.
- VIEIRA, L.R. et al. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. **Chemosphere**, v. 76, p. 1416-1427, 2009.
- VILKMAN, S. et al. Altered complexity and correlation properties of r-r interval dynamics before the spontaneous onset of paroxysmal atrial fibrillation. **Circulation**, v. 16, n. 16, p. 2080-2084, 1999.
- VILLACORTA CORREA, M.A. **Crescimento do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei, Characidae) no rio Negro, seus afluentes e no baixo rio Solimões**. 1987. 124 f. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA/FUA, Manaus, Amazônia.
- VINKEN, M. et al. Inhibition of gap junctional intercellular communication by toxic metals. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 23, p. 1862-1867, 2010.
- VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION. Pesticide and aquatic animals. A guide to reducing impacts on aquatic systems. Publication 420-013, Junho de 1996. Disponível em <<http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.html>>. Acesso em: 20 out. 2007.
- VIRTANEN, J.K. et al. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **J. Nutr. Biochem.**, v. 18, p. 75-85, 2007.
- VIRTANEN, J.K. et al. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, p. 228-233, 2005.
- VOEGBORLO, R.B.; ADIMADO, A.A.; EPHRAIM, J.H. Total mercury distribution in different tissues of frigate tuna (*Auxis thazard thazard*) from the Atlantic coastal waters of Ghana, Gulf of Guinea. **Environ. Monit. Assess**, v. 132, p. 503-508, 2007.
- VORNANEN, M. Effect of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold-acclimated crucian carp heart. **J. Comp. Physiol.**, v. 165B, pp. 507-517, 1996.



- VORNANEN, M. L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and  $\beta$ -adrenergic stimulation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 533-547, 1998.
- VORNANEN, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94C, p. 477-483, 1989.
- VORNANEN, M. Sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 1432-1440, 1997.
- VORNANEN, M.; SHIELS, H. A.; FARRELL, A. P. Plasticity of excitation - contraction coupling in fish cardiac myocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.132A, p.827-846, 2002.
- VOSYLIENÉ, M.Z.; KAZLAUSKIENĖ, N. Alterations in fish health state parameters after exposure to different stressors. **Acta Zool. Lit.**, v. 9, n. 2, p. 83-94, 1999.
- VOSYLIENÉ, M.Z.; KAZLAUSKIENĖ, N.; SVECEVICIUS, G. Effect of a heavy metal model mixture on biological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 10, n. 2, p. 103-107, 2003.
- WAHRLICH, V.; ANJOS, L.A. Aspectos históricos e metodológicos da medição e estimativa da taxa metabólica basal: uma revisão da literatura. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n. 2, p. 801-817, 2001.
- WAINWRIGHT, P.C.; TURINGAN, R.G. Muscular basis of buccal pressure: inflation behavior in the striped burrfish *Chilomycterus schoepfi*. **J. Exp. Biol.**, v. 199, p. 1209-1218, 1996.
- WALDEMARIN, K.C.A. **Efeito do sulfato de cobre sobre a função cardíaca da tilápia tailandesa, *Oreochromis niloticus niloticus***. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- WALKER, C.H. et al. **Principles of ecotoxicology**. 2<sup>nd</sup> edition. Londres: Taylor & Francis, 1996. 321 p.
- WANG, R. et al. Toxic effects of cadmium and copper on the isolated heart of dogfish shark, *Squalus acanthias*. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 57, p. 507-519, 1999.
- WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological function. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 335-355, 1998.
- WANG, X.; HORISBERGER, J.D. A mercury binding site on the extracellular side of the Na,K-ATPase. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 52, p. A81-A84, 1996.
- WARDLE, C.S.; KANWISHER, J.W. The significance of heart rate in free swimming cod, *Gadus morhua*: some observations with ultrasonic tags. **Mar. Behav. Physiol.**, v. 2, p. 311-324, 1974.
- WATRAS, C.J. et al. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. **Sci. Total Environ.**, v. 219, p. 183-208, 1998.
- WATRAS, C.J.; MORRISON, K.A.; BLOMM, N.S. Mercury in remote Rocky Mountain lakes of Glacier National Park Montana, in comparison with other temperate North American regions. **Can. J. Fish. Aquatic Sci.**, v. 52, p. 1220-1228, 1995.
- WDZIECZAK, J. et al. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73, p. 361-365, 1982.
- WEBBER, H.M.; HAINES, T.A. Mercury effects on predator avoidance behaviour of a forage fish, golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 1556-1561, 2003.

- WEBER, D.N.; SPIELER, R.E. Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes. In: Malins, D.C.; Ostrander, G.K. (eds). **Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1994. p. 421-467.
- WEBER, R.E. Intraspecific adaptation of hemoglobin function in fish to environmental oxygen availability. In: ADDINK, A.D.F.; SPRONK, N. **Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control**, vol.1, Biochemistry. Oxford: Pergamon Press, 1982. p. 87-102.
- WEHRENS, X.H.T.; MARKS, A.R. Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. **Nature Rev.**, v. 13, p. 1-9, 2004.
- WEINER, J.G.; KRABBENHOFT, D.P.; SCHEUHAMMER, A.M. Ecotoxicology of mercury. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS JR., J. (Eds.). **Handbook of Ecotoxicology**, Flórida, CRC Press, Boca Raton, 2003. p. 409-463.
- WEIS, P.; BOGDEN, J.D.; ENSLEE, E.C. Hg- and Cu- induced hepatocellular changes in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Environ. Health Perspec.**, v. 65, p. 167-173, 1986.
- WEISS, H.V.; SHIPMAN, W.H.; GUTTMAN, M.A. Effective storage of dilute mercury solutions in polyethylene. **Anal. Chim. Acta**, v. 81, p. 211-217, 1976.
- WELLS, P.G. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 207, p. 352-366, 2005.
- WENGER, R.H.; GASSMANN, M. Oxygen and the hypoxia-inducible factor-1. **Biol. Chem.**, v. 378, p. 609-616, 1997.
- WETMUR, J.G. et al. Human  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 7703-7701, 1986.
- WHITSEL, E.A. et al. RR interval variation, the QT interval index and risk of primary cardiac arrest among patients without clinically recognized heart disease. **Eur. Heart J.**, v. 22, n. 22, p. 165-173, 2001.
- WIER, W.G. Cytoplasmic  $[Ca^{2+}]_i$  in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 52, p. 467-485, 1990.
- WIGGERS, G.A. et al. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 147C, p. 252-260, 2008.
- WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1205, p. 1-18, 1994.
- WILHELM-FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, p. 349-357, 2005.
- WILHELM-FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 719-726. 2001.
- WILHELM-FILHO, D.; GONZALEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2879-2882, 1994.

- WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J. L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 299-312.
- WILLIAMS, K.; FRAYNE, J.; HALL, L. Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPx5) in the rat male reproductive tract. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 841-848, 1998.
- WINDOM, L.; KENDALL, D.R. Accumulation and biotransformation of mercury in coastal and marine biota. In: J. NRIAGU, J. (Ed.). **The biogeochemistry of mercury in the environment**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1979. p. 303-323.
- WINEMILLER, K.O. Development of dermal lip protuberances for aquatic surface respiration in South American characid fishes. **Copeia**, v. 1989, p. 382-390, 1982.
- WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100C, p. 173-176, 1991.
- WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. **Aquatic. Toxicol.**, v. 19, p. 137-161, 1991.
- WOOD, S.C.; LENFANT, C. Oxygen transport and oxygen delivery. In: WOOD, S.C.; LENFANT, C. **Evolution of respiratory process**. A comparative approach. New York: Marcel Dekker, 1979. p. 193-223.
- WOOL, L.E. et al. Metallothionein alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: role of  $Ca^{2+}$  cycling proteins, NADPH oxidase, poly(ADP-Ribose) polymerase and myosin heavy chain isozyeme. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 40, p. 1419-1429, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Inorganic Mercury. Environmental Health Criteria, 118**. Geneva. 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mercury - environmental aspects. Environmental Health Criteria 86**. Finland, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Methylmercury**. In: Environmental Health Criteria 101. Geneva, 1990.
- WU, S.M.; JONG, K.J.; LEE, Y.J. Relationships among metallothionein, cadmium accumulation, and cadmium tolerance in three species of fish. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 76, p. 595-600, 2006.
- WU, S.M.; SHIH, M.; HO, Y. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 145A, p. 218-226, 2006.
- YALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.
- YAMAOKA, K. et al. Effect of sulfhydryl reagents on the regulatory system of the L-type  $Ca^{2+}$  channel in frog ventricular myocytes. **Pflügers Arch.**, v. 440, p. 207-215, 2000.
- YANG, T.H.; SOMERO, G.N. Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallow-living (*Scorpaena guttata*) and deep-living (*Sebastolobus alascanus*) Scorpaenid fishes. **J. Exp. Biol.**, v. 181, p. 213-232, 1993.
- YEAGER, D.P.; ULTSCH, G.R. Physiological regulation and conformation: a basic program for the determination of critical points. **Physiol. Zool.**, v. 62, p. 888-907, 1989.

- YOSHIDA, M. et al. Distribution and retention of mercury in metallothionein-null mice after exposure to mercury vapor. **Toxicology**, v. 139, p. 129-136, 1999.
- YOSHIKAWA, H. Electrocardiograms in five bipolar leads recorded from the body surface of three fish species (*Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus* and *Pagrus major*) in fresh or sea-water. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 91A, p. 759-764, 1988.
- YOSHIOKA, T.; ICHIKAWA, J. Glomerular dysfunction induced by polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 53-59, 1989.
- YOSHIZAWA, K. et al. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 1755-1760, 2002.
- YOUSON, J.H.; NEVILLE, Ch.M. Deposition of aluminum in the gill epithelium of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) subjected to sublethal concentrations of the metal. **Can. J. Zool.**, v. 65, p. 647-656, 1987.
- YTREHUS, K. et al. Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. **Cardiovasc. Res.**, v. 20, p. 597-603, 1986.
- YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 139-162, 1994.
- ZALUPS, R.K. Basolateral uptake of mercuric conjugates of N-acetylcysteine and cysteine in the kidney involves the organic anion transport system. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 55, p. 13-29, 1998.
- ZALUPS, R.K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 113-143, 2000.
- ZALUPS, R.K.; LASH, L.H. Depletion of glutathione in the kidney and the renal disposition of administered inorganic mercury. **Drug Metabol. Dispos.**, v. 25, p. 516-523, 1997.
- ZANIBONI FILHO, E. **Biologia da reprodução do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei, Characidae)**. 1985. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA/FUA, Manaus, 1985.
- ZAVALA-CAMIN, L. A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. Maringá: EDUEM, 1996. 125 p.
- ZHANG, J. et al. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, p. 167-174, 2004.
- ZHOU, T.; WEIS, J.S. Swimming behavior and predator avoidance in three populations of *Fundulus heteroclitus* larvae after embryonic and/or larval exposure to methylmercury. **Aquatic Toxicol.**, v. 43, p. 131-148, 1998.
- ZIKIC, R.V. et al. The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 17, p. 259-264, 1998.
- ZIMMET, J.M.; HARE, J.M. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. **Circulation**, v. 114, p. 1531-1544, 2006.
- ZOROV, D.B. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. **J. Exper. Med.**, v. 192, p. 1001-1014, 2000.