



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA  
COMPARATIVA**

Via Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676  
Fone: (016) 3351 8314 - Fax (016) 3351 8328  
13565-905 - São Carlos, SP - Brasil

---

**EFEITO DO INSETICIDA ORGANOFOSFORADO  
METILPARATION (FOLISUPER 600BR<sup>®</sup>) SOBRE A  
FUNÇÃO CARDIO-RESPIRATÓRIA DO PEIXE  
TELEÓSTEO MATRINXÃ, *Brycon cephalus***

**CLAUDIO DALLE OLLE**

**SÃO CARLOS  
2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA  
COMPARATIVA**

Via Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676  
Fone: (016) 3351 8314 - Fax (016) 3351 8328  
13565-905 - São Carlos, SP - Brasil

---

**EFEITO DO INSETICIDA ORGANOFOSFORADO  
METILPARATION (FOLISUPER 600BR<sup>®</sup>) SOBRE A  
FUNÇÃO CARDIO-RESPIRATÓRIA DO PEIXE  
TELEÓSTEO MATRINXÃ, *Brycon cephalus***

**CLAUDIO DALLE OLLE**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos -SP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Fisiologia.**

**SÃO CARLOS  
2007**

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

O496ei

Olle, Claudio Dalle.

Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus* / Claudio Dalle Olle. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

113 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Fisiologia comparada. 2. Inseticida organofosforado. 3. Matrinxã. 4. Função cardio-respiratória. 5. Miocárdio ventricular. I. Título.

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

Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de CLAUDIO DALLE OLLE

Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin ..... *Ana Lucia Kalinin*

Profa. Dra. Mônica Jones Costa ..... *Mônica Jones Costa*

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

Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni ..... *Luciana Venturini Rossoni*

Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho ..... *Aparecido Antonio Camacho*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Metil-Paration	2
1.2. Efeitos do Metil-Paration em Humanos	3
1.3. Efeitos do Metil-Paration em Animais	3
1.4. Respostas Respiratórias em Peixes	5
1.5. Acoplamento Excitação-Contração	6
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1. Material.	11
3.1.1. Posição Sistemática da Espécie.	11
3.1.2. Breves Considerações sobre a Espécie Estudada.	12
3.2. Métodos.	13
3.2.1. Coleta e Manutenção em Laboratório	13
3.2.2. Preparações Experimentais	13
3.2.2.1. Parâmetros respiratórios e frequência cardíaca <i>in vivo</i>	13
3.2.2.2. Contratilidade cardíaca <i>in vitro</i>	17
3.2.3. Protocolos Experimentais	20
3.2.3.1. Experimentos <i>in vivo</i>	20
3.2.3.1.1. Frequência cardíaca ( $f_H$ )	20
3.2.3.1.2. Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ )	20
3.2.3.1.3. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ )	20
3.2.3.1.4. Frequência Respiratória ( $f_R$ )	21
3.2.3.1.5. Volume corrente/ ventilatório ( $V_T$ )	21
3.2.3.1.6. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ )	21
3.2.3.1.7. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ )	21
3.2.3.2. Experimentos <i>in vitro</i>	22
3.2.3.2.1. Efeito do tempo	22
3.2.3.2.2. Aumento da concentração de cálcio extracelular	22
3.2.3.2.3. Tensão pós-reposo	22
3.2.3.2.4. Aumento da frequência de estimulação	22
3.2.3.2.5. Adição de adrenalina	23
3.3. Forma de apresentação dos dados	24
3.3.1. Experimentos <i>in vivo</i>	24
3.3.2. Experimentos <i>in vitro</i>	24
3.4. Tratamento estatístico dos dados	25
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
4.1. Frequência cardíaca de <i>Brycon cephalus</i> submetido à hipóxia gradual	26
4.2. Respostas respiratórias de <i>Brycon cephalus</i> submetido à hipóxia gradual	26
4.2.1. Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e Tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ )	26
4.2.1.1. Grupo controle	26
4.2.1.2. Grupo exposto ao MP	28
4.2.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ )	31
4.2.2.1. Grupo controle	31
4.2.2.2. Grupo exposto ao MP	31
4.2.3. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ )	32
4.2.4. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ )	32
4.3. Contratilidade cardíaca de <i>Brycon cephalus in vitro</i>	38
4.3.1. Efeito do tempo de exposição.	38
4.3.2. Aumento da concentração de cálcio extracelular	43
4.3.3. Tensão pós-reposo	50
4.3.3.1. Grupo Controle	50

4.3.3.2. Grupo exposto ao MP	50
4.3.3.3. Controle x Exposto ao MP	50
4.3.4. Aumento da frequência de estimulação (Relação Força-frequência)	54
4.3.4.1. Relação força-frequência sem rianodina	54
4.3.4.2. Relação força-frequência com rianodina	61
4.3.4.3. Sem rianodina x Com rianodina	68
4.3.5. Adição de adrenalina	78
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>83</b>
5.1. Frequência cardíaca de <i>Brycon cephalus</i> submetido à hipóxia gradual	83
5.2. Respostas respiratórias de <i>Brycon cephalus</i> submetido à hipóxia gradual	83
5.2.1. Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e Tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ )	83
5.2.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ )	86
5.2.3. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ )	88
5.2.4. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ )	89
5.3. Contratilidade cardíaca de <i>B. cephalus in vitro</i>	90
5.3.1. Efeito do Tempo de Duração do Experimento	90
5.3.2. Aumento da concentração de cálcio extracelular	90
5.3.3. Tensão pós-reposo e Relação força x frequência	93
5.3.3.1. Tensão pós-pausa	93
5.3.3.2. Relação força x frequência	95
5.3.4. Adição de adrenalina	100
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>104</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>105</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) de espécimes de *B. cephalus*, do grupo controle ( $n = 8$ ) e exposto ao MP ( $n = 8$ ), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**27**
- Tabela 2-** Valores médios do consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  -  $mlO_2.kg^{-1}.h^{-1}$ ) de espécimes de *B. cephalus*, no grupo controle ( $n = 8$ ) e exposto ao MP ( $n = 8$ ), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ )...**29**
- Tabela 3-** Valores da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  -  $mlH_2O.kg^{-1}.min^{-1}$ ), da frequência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios. $min^{-1}$ ) e do volume ventilatório ( $V_T$  -  $mlH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$ ) do grupo controle ( $n = 8$ ) de *B. cephalus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de  $O_2$  da água. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).....**33**
- Tabela 4-** Valores da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  -  $mlH_2O.kg^{-1}.min^{-1}$ ), da frequência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios. $min^{-1}$ ) e do volume ventilatório ( $V_T$  -  $mlH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$ ) do grupo exposto ao MP ( $n = 8$ ) de *B. cephalus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de  $O_2$  da água. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).....**33**
- Tabela 5-** Valores da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  -  $mlH_2O.mlO_2^{-1}$ ) dos grupos controle ( $n = 8$ ) e exposto ao MP ( $n = 8$ ) de *B. cephalus*, submetido a diminuições graduais na tensão de  $O_2$  da água. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ )...**36**
- Tabela 6-** Valores da extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$  - %) dos grupos controle ( $n = 8$ ) e exposto ao MP ( $n = 8$ ) de *B. cephalus*, submetido a diminuições graduais na tensão de  $O_2$  da água. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).....**37**
- Tabela 7-** Valores da força de contração ( $F_c$  -  $mN.mm^{-2}$ ) de tiras ventriculares de *B. cephalus*, no grupo controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 12 bpm. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.....**39**
- Tabela 8-** Valores do tempo para o pico de tensão e tempo para 50% de relaxamento (TPT e THR - ms) de tiras ventriculares de *B. cephalus*, no grupo controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 12 bpm. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.....**41**

- Tabela 9-** Valores da força de contração ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) desenvolvida pelo músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ . Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**44**
- Tabela 10-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão e tempo para 50% de relaxamento (TPT e THR - ms) desenvolvidos pelo músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ . Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.....**46**
- Tabela 11-** Valores da Tensão pós-reposo ( $F_c$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *B. cephalus* dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) registrados na primeira contração após períodos crescentes de repouso (% antes do repouso) em preparações não tratadas e tratadas com  $10 \mu M$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa diastólica. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....**51**
- Tabela 12-** Valores da força de contração ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus* em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**55**
- Tabela 13-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão (TPT - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus* em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....**57**
- Tabela 14-** Valores para o tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus* em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**59**
- Tabela 15-** Valores da força de contração ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, na presença de  $10 \mu M$  de rianodina, em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....**62**
- Tabela 16-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão (TPT - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, na presença de  $10 \mu M$  de rianodina, em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ) .....**64**
- Tabela 17-** Valores para o tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, na presença de  $10 \mu M$  de rianodina, em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....**66**

- Tabela 18-** Comparação entre os valores da força de contração ( $F_c - \text{mN.mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado do grupo controle de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....**69**
- Tabela 19-** Comparação entre os valores da força de contração ( $F_c - \text{mN.mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado do grupo exposto ao MP de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, nas ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....**70**
- Tabela 20-** Comparação entre os valores do tempo para o pico máximo de tensão (TPT – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo controle de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10\mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.....**72**
- Tabela 21-** Comparação entre os valores do tempo para o pico máximo de tensão (TPT – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo exposto ao MP de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.....**73**
- Tabela 22-** Comparação entre os valores do tempo para 50 % de relaxamento (THR – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo controle de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....**75**
- Tabela 23-** Comparação entre os valores do tempo para 50 % de relaxamento (THR – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo exposto ao MP de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....**76**
- Tabela 24-** Força de contração ( $F_c - \text{mN.mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, em resposta à elevação na concentração extracelular de adrenalina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**79**
- Tabela 25-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão e para 50% de relaxamento (TPT e THR - ms) de tiras ventriculares dos grupos controle e exposto ao MP de matrinxã em resposta à elevação na concentração extracelular de adrenalina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**81**
- Tabela 26-** Concentrações de adrenalina e noradrenalina no plasma de diferentes espécies de peixes antes e após estresse. Concentrações expressas em nM de plasma. (modificada de NILSSON, 1983).. .....**103**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Exemplo de matrinxã, *Brycon cephalus*.....11
- Figura 2-** Esquema mostrando a posição de inserção dos cateteres de polietileno e eletrodos de ECG para as medidas dos parâmetros cardio-respiratórios *in vivo* .....14
- 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.....15
- Figura 4-** Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos *in vivo* .....15
- Figura 5-** Fotografia do set experimental a ser utilizado para a obtenção das respostas inotrópicas e cronotrópicas *in vitro* das tiras ventriculares de matrinxã. **A:** banho para órgãos com quatro cubetas; **B:** banho termostatizado; **C:** cilindro de mistura carbogênica; **D:** estimuladores elétricos; **E:** transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; **F:** amplificador de força; **G:** sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.....19
- Figura 6-** Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo. Fc: Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50% do relaxamento.....25
- Figura 7-** Efeito da diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água no desenvolvimento de frequência cardíaca (f<sub>H</sub> – bpm) de espécimes de matrinxã, dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8). Valores médios + 1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).....27
- Figura 8-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) do grupo controle (n = 8) de *B. cephalus*. A seta representa a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>.....29
- Figura 9-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) do grupo exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. A seta representa a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>.....30
- Figura 10-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios ± 1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).....30
- Figura 11-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios ± 1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).....34
- Figura 12-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre a frequência respiratória (f<sub>R</sub> – ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios ± 1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).....34

- Figura 13-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o volume ventilatório ( $V_T$  -  $mlH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$ ) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).....**35**
- Figura 14-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  -  $mlH_2O.mlO_2^{-1}$ ) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ) .....**36**
- Figura 15-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a extração de  $O_2$  ( $EO_2$  - %) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).....**37**
- Figura 16-** Efeito do tempo de exposição (40 minutos) no desenvolvimento de força de contração de tiras ventriculares de matrixã, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10). **A:** Valores absolutos ( $F_c$  -  $mN.mm^{-2}$ ), **B:** Valores normalizados ( $F_c$  - % dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**40**
- Figura 17-** Efeito do tempo de exposição (40 minutos) nos tempos para o pico de tensão (TPT) e no tempo para 50% de relaxamento (THR) de tiras ventriculares de matrixã, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10). **A:** Valores absolutos (TPT e THR - ms); **B:** Valores normalizados (TPT e THR - % dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.....**42**
- Figura 18-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  sobre a força de contração ( $F_c$ ) de tiras ventriculares de matrixã dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10). **A:** Valores absolutos ( $mN.mm^{-2}$ ); **B:** Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**45**
- Figura 19-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  sobre o tempo para o pico de tensão (TPT) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de matrixã. **A:** Valores absolutos (ms); **B:** Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.....**47**
- Figura 20-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  sobre o tempo para 50% de relaxamento (THR) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de matrixã. **A:** Valores absolutos (ms); **B:** Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**48**
- Figura 21-** Comparação entre os valores normalizados dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares dos grupos controle (**A**, n = 10) e exposto ao MP (**B**, n = 10) de matrixã, em resposta à elevação gradual da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ . Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.....**49**

- Figura 22-** Valores da força de contração ( $F_c$  - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas crescentes de tiras ventriculares dos grupos controle (**A:**  $n = 10$ ) e exposto ao MP (**B:**  $n = 10$ ) de *B. cephalus*, na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. \*: diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa; #: diferença significativa entre as preparações controle e tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....**52**
- Figura 23-** Valores da força de contração ( $F_c$  - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas crescentes de tiras ventriculares dos grupos controle (**A:**  $n = 10$ ) e exposto ao MP (**B:**  $n = 10$ ) de *B. cephalus*, na ausência e na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.....**53**
- Figura 24-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração ( $F_c$  - **A:**  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ; **B:** % dos valores iniciais) dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de tiras ventriculares de matrinxã. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**56**
- Figura 25-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - **A:** ms; **B:** % dos valores iniciais) dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de tiras ventriculares de matrinxã. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....**58**
- Figura 26-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para 50% de relaxamento (THR - **A:** ms; **B:** % dos valores iniciais) dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de tiras ventriculares de matrinxã. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....**60**
- Figura 27-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração ( $F_c$  - **A:**  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ; **B:** % dos valores iniciais) dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....**63**
- Figura 28-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - **A:** ms; **B:** % dos valores iniciais) dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....**65**
- Figura 29-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para 50% de relaxamento (THR - **A:** ms; **B:** % dos valores iniciais) dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....**67**
- Figura 30-** Comparação entre os valores de  $F_c$  ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, *B. cephalus*, em resposta ao aumento na frequência de estimulação, no grupo controle (**A:**  $n = 10$ ) e exposto ao MP (**B:**  $n = 10$ ) na ausência e presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....**71**
- Figura 31-** Comparação entre os valores de TPT de tiras ventriculares de matrinxã, *B. cephalus*, em resposta ao aumento na frequência de estimulação, nos grupos

controle (**A**: n = 10) e exposto ao MP (**B**: n =10) na ausência e presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.....74

**Figura 32-** Comparação entre os valores de THR de tiras ventriculares de matrinxã, *B. cephalus*, em resposta ao aumento na frequência de estimulação, nos grupos controle (**A**: n = 10) e exposto ao MP (**B**: n = 10) na ausência e presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).....77

**Figura 33-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de adrenalina sobre a força de contração ( $F_c$  -  $mN.mm^{-2}$ ) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de matrinxã. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....80

**Figura 34-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de adrenalina sobre os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de matrinxã. **A**: Valores absolutos (ms); **B**: Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....82

**Figura 35** Efeito dos organofosforados (OPs) sobre o sistema de transdução de sinais via fosfoinositol. O estímulo de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e muscarínicos ativa a proteína Gq que está acoplada com a isoforma  $\beta$ da fosfolipase C (PL-C). Essa enzima catalisa a formação de inositol-1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  se liga ao receptor de  $IP_3$  do RS e induz a liberação de  $Ca^{2+}$ . O DAG ativa a isoforma lipídio-dependente da proteína-quinase C (PKC). A depleção dos estoques de  $Ca^{2+}$   $IP_3$ -sensíveis envia um sinal 'a membrana plasmática induzindo o influxo de  $Ca^{2+}$ . Tanto a aumentada  $[Ca^{2+}]$  intracelular quanto a ativação da PKC podem ativar uma variedade de funções celulares. Os OPs modulam vários elementos dessa via por meio de fosforilação e alteram suas respostas aos estímulos. Adaptado de Sun *et al.* (2000).....99

**Figura 36-** Esquema das vias de ativação adrenérgica em um miócito cardíaco e dos locais de ação de inseticidas organofosforados (OPs). Os sítios de inibição pelos OPs estão assinalados com um X vermelho. PL-C – fosfolipase C; PK-C – proteína-quinase C; AC – adenil-ciclase;  $M_2$  – receptor muscarínico tipo 2;  $\alpha$  - receptores  $\alpha$ -adrenérgicos;  $\beta$ - receptores  $\beta$ -adrenérgicos.....103

## RESUMO

O metilparation (MP) é um inseticida organofosforado usado mundialmente na agricultura e aqüicultura devido à sua alta atividade contra uma grande variedade de insetos. Em uma primeira fase do estudo, espécimes de matrinxã (*Brycon cephalus*) foram expostos a uma concentração subletal ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $1/3$  da  $CL_{50-96h}$ ) de MP (Folisuper 600<sup>®</sup>, MP  $600 \text{ g.L}^{-1}$ ) por 96h, e sua frequência cardíaca ( $f_H$ ), consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ), ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e extração de oxigênio ( $EO_2$ ) foram medidos, em normóxia e em resposta à hipóxia gradual. Os peixes desenvolveram uma bradicardia significativa em hipóxia moderada, que foi maior para o grupo exposto ao MP. A  $\dot{V}O_2$  foi mantida constante em diversas tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ), até que as tensões críticas de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ), de 35 mmHg para o grupo controle e de 52 mmHg para o grupo exposto ao MP, respectivamente, foram alcançadas. A  $\dot{V}_G$  aumentou, seguindo as mudanças na  $\dot{V}O_2$ , e foi o resultado de um acentuado aumento no volume ventilatório ( $V_T$ ), mais do que na frequência respiratória ( $f_R$ ). A extração de  $O_2$  foi mantida constante em aproximadamente 56% para ambos os grupos experimentais, independentemente das tensões de  $O_2$  ou da exposição ao MP. Foram usadas preparações musculares para se testar os efeitos de uma exposição à  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de MP por 96h no acoplamento excitação-contração do coração de *B. cephalus*. A rianodina (um bloqueador da liberação de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático) reduziu a força de contração em aproximadamente 70% no ventrículo de *B. cephalus*, sugerindo que esta espécie utiliza as reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) durante contrações em steady-state. A exposição ao MP resultou em uma diminuição significativa na produção de força de contração e um aumento no tempo para 50% de relaxamento (THR), fornecendo evidências do efeito do MP nas reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$ . As repostas cardio-respiratórias ao MP podem ser atribuídas aos danos causados ao epitélio branquial, resultando em prejuízo nas trocas gasosas. Os efeitos da exposição ao MP no miocárdio ventricular correspondem ao prejuízo na utilização das reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$  e à inibição da acetilcolinesterase na inervação do coração.

## ABSTRACT

Methyl parathion (MP) is an organophosphorus insecticide used worldwide in agriculture and aquaculture due to its high activity against a broad spectrum of insect pests. In a first phase of the study, specimens of matrinxã (*Brycon cephalus*) were exposed to a sublethal concentration ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ , 1/3 of the 96h-LC<sub>50</sub>) of MP (Folisuper 600<sup>®</sup>, MP 600 g.L<sup>-1</sup>) for 96h, and their heart rate ( $f_H$ ), oxygen consumption ( $\dot{V}O_2$ ), gill ventilation ( $\dot{V}_G$ ), and oxygen extraction (EO<sub>2</sub>) were measured, during normoxia and in response to graded hypoxia. The fish developed a significant bradycardia during moderate hypoxia, which was higher for the MP exposed group.  $\dot{V}O_2$  was kept constant over a wide range of O<sub>2</sub> tensions of inspired water (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>), until the critical oxygen tensions (P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>), 35 mmHg for control group and 52 mmHg for the MP exposed group, respectively, were achieved.  $\dot{V}_G$  increased following the changes in  $\dot{V}O_2$  and was the result of an accentuated increase in breath volume, rather than in breath frequency. Oxygen extraction was kept almost constant at about 56% for both experimental groups, regardless of ambient oxygen tensions or MP exposure. We used an isometric muscle preparation to test the effect of a single 96h MP exposure to  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  of MP on the heart excitation-contraction coupling of *B. cephalus*. Ryanodine (a blocker of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release) reduced the force of contraction by approximately 70% in *B. cephalus* ventricle, suggesting that this species utilizes the intracellular Ca<sup>2+</sup> storages of the sarcoplasmic reticulum (SR) during routine contractions. MP exposure resulted in a significant decrease in force development and an increase in the time to half relaxation (THR), providing evidences of the effect of MP on intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. Cardio-respiratory responses to MP can be attributed to damage caused to the gill epithelium, which results in impaired gas exchange. Effects of MP exposure to the ventricular myocardium correspond to the SR Ca<sup>2+</sup> storages impairment and to cholinesterase inhibition in nerves supplying the heart.



## 1. INTRODUÇÃO.

Nas últimas décadas, os efeitos da atividade humana sobre os ecossistemas aquáticos, e mais particularmente sobre as populações de peixes, têm sido objetos de crescente interesse. O aquecimento global, com mudanças associadas na temperatura e níveis de oxigênio, as atividades industrial e agropecuária e a introdução de poluentes, a chuva ácida e os efeitos dos distúrbios nas relações ácido-base em ecossistemas aquáticos levam à necessidade de se entender as bases fisiológicas da biodiversidade e das capacidades de diferentes espécies de resistir às mudanças acima citadas. Esta questão é particularmente importante para o entendimento de como os contaminantes químicos, tais como os pesticidas, podem influenciar esses sistemas.

A fauna íctica constitui-se num recurso alimentar importante, sendo uma fonte protéica acessível através da exploração direta das populações naturais. Embora as populações de peixes pareçam inesgotáveis, a ação antrópica muito tem contribuído para sua redução, tornando-se inevitável que populações mundiais tornem-se cada vez mais dependentes de peixes cultivados artificialmente.

O ambiente aquático é um meio no qual o acesso e a penetração de agentes patogênicos tornam-se facilitados e o confinamento dos peixes favorece ainda mais o aparecimento de doenças. Assim, o estudo de agentes causadores de patologias nos peixes é um campo de crescente importância em virtude da expansão mundial da piscicultura, pois se sabe que estes agentes podem provocar elevadas taxas de mortalidade, redução das capturas ou diminuição do valor comercial dos exemplares atacados.

É necessário destacar que no Brasil existem raríssimos estudos com o objetivo de se testar a eficiência e os efeitos secundários de drogas utilizadas no combate aos parasitos de peixes, principalmente no que se refere aos peixes criados na piscicultura intensiva.

Os corpos d'água estão freqüentemente sujeitos à contaminação química por atividades agrícolas. A aplicação de pesticidas em áreas cultivadas acaba por contaminar o ambiente aquático por meio de derramamentos acidentais, lavagem do solo pela chuva, lavagem de equipamentos e recipientes utilizados nessas pulverizações, entre outros. Vários pesticidas, incluindo algicidas, herbicidas e inseticidas são indicados pelos fabricantes para o controle de pragas em reservatórios e tubulações de água. Esses produtos têm sido testados e liberados para uso em ou próximo a ambientes aquáticos. Entretanto, o uso apropriado desses pesticidas em áreas aquáticas é especialmente crítico. Derramamentos acidentais e superdosagens podem matar peixes ou causar danos ao seu habitat, o que causará a redução das populações dos mesmos. Além da toxicidade aguda direta, o uso de pesticidas pode resultar na morte de peixes devido a efeitos secundários tais como a depleção de O<sub>2</sub> nos corpos d'água (HUNN *et al.*, 1993), ou por diminuição na

fauna de microinvertebrados aquáticos (BYARD, 1999). BLASIAK (1995) reforça a importância de se conhecer esses efeitos em tecidos não alvos dessas drogas, para se avaliar melhor a sua aplicabilidade no ambiente.

Os inseticidas organofosforados (OP) são usados em todo o mundo para o controle de uma grande variedade de pragas. De acordo com HOFFMAN *et al.* (1995), mais de 100 diferentes OPs estão registrados nos EUA, sendo aplicados em aproximadamente 200 milhões de acres/ano. Segundo o IBGE, o Brasil é o 5<sup>o</sup> maior consumidor de pesticidas, movimentando cerca de US\$ 2,5 bilhões/ano. Dentre os diferentes OPs, o metil paration tem sido utilizado em larga escala em diversos países. No Brasil, o metil paration é muito utilizado para o controle de uma grande variedade de insetos em várias culturas, tais como algodão, milho, soja, cana-de-açúcar e cítricos, entre outros. Além disso, é utilizado na aquicultura, na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixes com o objetivo de eliminar parasitos e predadores aquáticos, como larvas de insetos (FIGUEIREDO & SENHORINI, 1990).

### 1.1. Metil Paration.

Também conhecido como “o veneno do algodão”, o metil paration (MP) ( $C_8H_{10}NO_5PS$ ) é um inseticida OP que tem causado muitos problemas de saúde, particularmente em países em desenvolvimento, desde sua introdução no mercado no início dos anos 50. Nos EUA, sua aplicação tem recebido várias restrições devido ao uso incorreto. É um pesticida não-sistêmico, desenvolvido originalmente pela Bayer alemã, que mata as pragas principalmente por envenenamento estomacal (para detalhes, ver <http://www.pan-uk.org/pestnews>).

No mercado brasileiro, o produto é comercializado com as seguintes denominações: Folidol 600 (Bayer) e Folisuper 600BR (Agripec).

O paration (PaT) ( $C_{10}H_{14}NO_5PS$ ), precursor do MP, é parcialmente solúvel em água (20 a 25 ppm), mas seu metabólito ativo, o paraoxon (Pxn) ( $C_{10}H_{14}NO_6P$ ), é muito mais solúvel (2400 ppm). Em água, o PaT é lentamente hidrolisado para a forma *p*-nitrofenol e ácido dietilortotiofosfórico, sendo tal processo acelerado em meio alcalino (AGUIAR *et al.*, 2004).

Em solução aquosa, o MP tem vida média de 175 dias (U.S. Environmental Protection Agency n° 100) e de 10 dias a 2 meses no solo (U.S. Environmental Protection Agency n° 207). A taxa de degradação aumenta com a temperatura e com a exposição à luz. Quando grandes concentrações de MP atingem o solo, a degradação ocorre apenas após muitos anos (WAUCHOPE *et al.*, 1992).

De acordo com HOWARD (1989), o metil paration se degrada rapidamente na água do mar, lagos e rios, com 100% de degradação ocorrendo entre 2 semanas a 1 mês ou mais. A degradação é mais rápida na água doce que salgada e na presença de sedimento. Na água, o metil paration é sujeito a fotólise, com uma vida média de 8 dias durante o verão e 38 dias no inverno.

### **1.2. Efeitos do Metil Paration em Humanos.**

O MP é rapidamente absorvido na corrente sanguínea pelas rotas normais de exposição. Após a administração de uma única dose oral, a maior concentração de MP nos tecidos corpóreos ocorre dentro de 1 a 2 horas. Porém, o mesmo não é acumulado no organismo, sendo quase completamente excretado pelos rins (via urina) dentro de 24 horas sob a forma de metabólitos fenólicos (GALLO & LAWRYK, 1991; KIDD & JAMES, 1991).

O MP afeta primariamente o sistema nervoso e seus efeitos associados à exposição aguda são similares àqueles de outros OPs. Os sintomas são comuns aos causados por inibidores da acetilcolinesterase (AChE) e podem incluir sensações de dormência e formigamento, falta de coordenação, dores de cabeça, tontura, tremores, náusea, cólicas abdominais, sudorese, visão turva, depressão respiratória e bradicardia. Dosagens muito elevadas podem resultar em inconsciência, incontinência, convulsões e morte. A exposição crônica a pequenas doses deste OP (22 a 30 mg/pessoa/dia) resulta em inibição da AChE de hemácias (GALLO & LAWRYK, 1991).

### **1.3. Efeitos do Metil Paration em Outros Animais.**

Segundo MENZER (1991), o MP é altamente tóxico para invertebrados aquáticos, cujas  $CL_{50}$  (concentrações letais para 50% dos indivíduos testados) variam em torno de 40  $\mu\text{g/l}$ . KIDD & JAMES (1991) descreveram um efeito moderadamente tóxico do MP em peixes e animais que se alimentam de peixes, com valores de  $CL_{50}$  de 1,9 a 8,9 mg/l para espécies como truta, salmão, peixe dourado, carpas, bagres e percas, entre outras.

Os peixes são expostos aos pesticidas por 3 vias primárias: (1) pela absorção através da pele, quando nadam em águas contaminadas; (2) pela tomada direta do pesticida pelas brânquias durante a respiração e (3) por via oral, ingerindo água. O envenenamento de peixes pelo consumo de presas contaminadas é denominado envenenamento secundário (HELFRICH *et al.*, 1996).

Segundo ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA (1984) os inseticidas OP se acumulam nas membranas, especialmente em células musculares, alterando sua fluidez. Devido a esta característica, as enzimas ligadas à membrana são o alvo preferencial dos efeitos do MP. Os inseticidas OPs paration e metilparation também alteram a atividade da enzima

(Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>)-ATPase eritrocitária, tanto da forma plasmática quanto da forma ligada à membrana do retículo sarcoplasmático (RS), em diversos organismos (ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA, 1982; LUO & BODNARYK, 1988; DESHPANDE & SWANY, 1989). O MP causa também uma diminuição na atividade da enzima Ca<sup>2+</sup>-ATPase de tecidos nervosos e hepato-pancreáticos de lagostim (REDDY & RAO, 1990).

Foi observada também uma substancial diminuição na quantidade de proteínas do músculo esquelético de galinhas, após a exposição crônica ao MP, indicando um possível efeito deletério sobre o tecido muscular (DELI & KISS, 1988). Também foi observada uma malformação do músculo cervical em embriões de galinha, em resposta ao tratamento com o pesticida (VARNAGY & DELI, 1985).

LIU *et al.* (1984) estudaram os efeitos do metilparation sobre células adrenais bovinas e observaram que o inseticida inibe a secreção de catecolaminas e o influxo de cálcio nestas células, indicando que além da acetilcolinesterase, os canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem-dependentes e os receptores nicotínicos são possíveis sítios de ação dos inseticidas OPs em mamíferos.

Segundo PRASADA *et al.* (1985), ocorre uma diminuição da taxa de consumo de oxigênio de *Tilapia mossambica* submetida a uma concentração subletal de MP, assim como da atividade de enzimas respiratórias (succinato desidrogenase, malato desidrogenase e citocromo-c oxidase) em alguns tecidos como músculo, fígado, brânquias e cérebro. Em *Corydoras paleatus* ocorre hiperplasia epitelial, edema e destacamento das células nas lamelas respiratórias das brânquias (FANTA *et al.*, 2003).

AGUIAR *et al.* (2004) estudaram os efeitos do metil paration sobre a atividade das enzimas chave do metabolismo do matrinxã, *Brycon cephalus*. A CL<sub>50</sub> dessa espécie foi de 6,54 ± 0,87 mg/l durante 96 h de exposição a este OP, sendo que 1/3 desta concentração já foi suficiente para causar alterações hepáticas. O MP também causou anemia, redução da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) cerebral, alanina aminotransferase (ALAT), afetando o metabolismo de aminoácidos no fígado e conseqüentemente da glutamato desidrogenase (GDH) hepática, e aumento da atividade da aspartato aminotransferase (AAT) cardíaca, um indicativo de lesão da estrutura tissular com liberação do suco mitocondrial nesse tecido. Tais resultados demonstram o significativo efeito tóxico do MP sobre peixes, e particularmente, sobre o matrinxã.

MONTEIRO *et al.* (2006) estudaram o efeito da exposição a este OP nas atividades da catalase (CAT), da glutathione peroxidase (GPx), da superóxido dismutase (SOD) e da glutathione S-transferase (GST), bem como nos níveis de glutathione reduzida (GSH) e de peroxidação lipídica (LPO) no fígado, músculo branco, brânquias, eritrócitos e plasma de matrinxã após 96 h de tratamento. A exposição ao MP resultou na indução significativa da atividade da SOD e da CAT em todos os tecidos, exceto no plasma e redução da atividade

da GPx no músculo branco e nas brânquias. A exposição ao MP também induziu um aumento significativo na atividade da GST em todos os tecidos e uma simultânea diminuição nos níveis GSH do sangue e dos tecidos. Além disso, os valores de LPO no músculo branco, nas brânquias e no plasma aumentaram significativamente. Tais resultados sugeriram que o MP é um potente indutor de estresse oxidativo em matrinxã e que as brânquias e o músculo branco são os órgãos mais sensíveis e com um baixo potencial antioxidante.

Deve-se, ainda, levar em consideração que espécies mantidas em viveiros de cultivo encontram-se freqüentemente sujeitas a hipóxia e, baseados nos resultados acima citados, podemos inferir que exemplares submetidos a tratamentos com OPs devam sentir de forma mais pronunciada os efeitos da mesma. Porém, existem poucas informações a respeito do efeito do MP sobre a função cardio-respiratória de peixes e, em particular, do matrinxã.

#### **1.4. Respostas respiratórias em peixes.**

A capacidade dos peixes em ocupar determinado ambiente está diretamente relacionada à sua adaptação às variações dos parâmetros abióticos. A grande maioria dos organismos, com exceção das bactérias anaeróbias, necessita de um suprimento adequado de oxigênio. Assim, o O<sub>2</sub> é uma variável fundamental no meio aquático, pois é essencial ao metabolismo de todos os organismos de respiração aeróbica (BLASKA, 1958; HOCHACHKA, 1980). Para os peixes, particularmente, a respiração é um dos processos mais dependentes das flutuações do O<sub>2</sub> no ambiente, sendo talvez o parâmetro que melhor caracterize as espécies, populações e adaptações individuais ao meio ambiente (HALL, 1929; WOOD & HOHANSEN, 1972; POWERS, 1980; ALMEIDA-VAL & VAL, 1990; VAL, 1993).

Ao longo de sua trajetória do ambiente aquático até a mitocôndria, a tensão de O<sub>2</sub> decresce gradativamente, desde o momento em que é captado pelas brânquias até sua utilização na célula, evento chamado “cascata de oxigênio” (HUGHES, 1973). Os principais obstáculos são as membranas branquiais, a circulação sanguínea e as membranas celulares dos tecidos que receberão o O<sub>2</sub> (GALIS & BAREL, 1980; FERNANDES & RANTIN, 1989; 1994). Qualquer aumento na resistência à difusão do O<sub>2</sub> em um desses pontos pode causar um efeito hipóxico. Assim, qualquer substância que possa causar uma hipóxia ambiental pode reduzir a quantidade de O<sub>2</sub> disponível à mitocôndria de forma a assegurar os processos aeróbicos.

A manutenção de um transporte adequado de O<sub>2</sub> 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, com o meio em que vive, com a

superfície respiratória funcional e com parâmetros hematológicos (HUGHES, 1973). As respostas dos peixes à hipóxia representam formas de ajuste para os processos fisiológicos. Os peixes podem tolerar ou resistir a níveis reduzidos de  $O_2$  por curtos períodos de tempo apresentando respostas reflexas imediatas e por períodos maiores, apresentando respostas de longa duração, com ajustes fisiológicos e morfológicos, ou ainda sofrer mudanças a longo prazo relacionadas à afinidade sangue-oxigênio (HUGHES, 1973; KRAMER, 1983).

As respostas ventilatórias em relação ao decréscimo da tensão de  $O_2$  ambiental diferem entre as espécies. DAVIS (1975) demonstrou que o consumo de  $O_2$  entre os teleósteos varia de acordo com a habilidade de regular a tomada de  $O_2$  em relação às tensões desse gás disponíveis no ambiente. Para os organismos *oxiconformistas*, o consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) varia diretamente com a tensão de  $O_2$  ambiental, ao passo que nos *oxireguladores* a  $\dot{V}O_2$  é independente de tal variável.

A tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ) representa o limite da capacidade do animal em manter constante sua  $\dot{V}O_2$  em resposta à redução do  $O_2$  ambiental. Abaixo da  $P_cO_2$  a espécie se comporta como oxiconformista e a  $\dot{V}O_2$  passa a ser dependente da disponibilidade de  $O_2$  do meio. Alguns estudos demonstraram que a  $P_cO_2$  não é caracterizada apenas pela mudança no padrão de consumo de oxigênio, mas também pelo início do metabolismo energético anaeróbico (PORTNER & GRIESHABER, 1993; THILLART *et al.*, 1994).

De acordo com GERALD & CECH (1970), CAMERON (1971), FERNANDES & RANTIN (1989), KALININ (1991), RANTIN *et al.* (1992), a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) em resposta à hipóxia é imediatamente aumentada através da elevação da frequência respiratória ( $f_R$ ) e do volume corrente/ ventilatório ( $V_T$ ). Para HUGHES (1970) a difusão de gases através da superfície respiratória depende não apenas do volume ventilatório e da velocidade do fluxo de água, mas é determinada também pela área de difusão, pelo gradiente de pressão parcial dos gases entre a água e o sangue e pela distância de difusão. Segundo BOOTH (1979), a difusão de  $O_2$  nas brânquias pode ser aumentada também pelo recrutamento de lamelas secundárias.

### **1.5. Acoplamento Excitação-Contração.**

A seqüência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração muscular é denominada acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C). A principal diferença entre ectotérmicos e mamíferos no que concerne ao acoplamento E-C está relacionada à origem do cálcio que chega as miofibrilas.

Segundo DRIEDZIC & GESSER (1994), os mecanismos contráteis, ou seja, a interação acto-miosínica e sua regulação pelo cálcio, parecem ser similares nos diferentes

grupos de vertebrados. 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 cálcio 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 aos dos mamíferos (10 a 25  $\mu\text{m}$ ) (HELLE, 1983; KEEN *et al.*, 1992); limitado desenvolvimento anatômico do RS; arranjo periférico das miofibrilas e ausência de túbulos transversos (túbulos T). Essas diferenças anatômicas têm um profundo impacto sobre a contratilidade cardíaca destes animais (TIBBITS *et al.*, 1991).

O diâmetro reduzido dos miócitos confere algumas vantagens funcionais, tais como uma menor distância de difusão do exterior para o centro da célula e uma maior superfície relativa, características particularmente importantes para a difusão de substâncias, como o cálcio, do meio extra para o intracelular e *vice-versa* (FARRELL & JONES, 1992; DRIEDZIC & GESSER, 1994; VORNANEN, 1997).

Os túbulos T correspondem a invaginações da sarcolema, que servem para propagar o potencial de ação para o interior da célula (TIBBITS *et al.*, 1990) e diminuir a distância de difusão do cálcio do meio extra para o intracelular. Segundo BERS (2001), de 30 a 50% da área sarcolema do ventrículo de mamíferos está localizada no nível dos túbulos T, onde também é observada uma maior densidade de canais de cálcio. Como todos os vertebrados ectotérmicos (DRIEDZIC & GESSER, 1994; KEEN *et al.*, 1992; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992), além das aves (BERS, 2001) não apresentam túbulos T, o aumento na taxa de difusão de cálcio proporcionada por estes túbulos em mamíferos, é compensado nos peixes pela maior taxa de difusão proporcionada pelo menor diâmetro dos miócitos.

A consequência do RS esparso e pouco desenvolvido é a dependência apresentada pela maioria das espécies de peixes estudadas do meio extracelular como a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração muscular, com as miofibrilas localizando-se na parte periférica da célula (próximas à SL) de forma que a difusão do  $\text{Ca}^{2+}$  do espaço extracelular para a troponina-C é facilitada, compensando a ausência dos túbulos T (FARRELL & JONES, 1992).

Em mamíferos, diferente do que ocorre na maioria dos peixes já estudados, o  $\text{Ca}^{2+}$  que entra através da SL é insuficiente em magnitude para desencadear a contração muscular (BERS, 2001; CHAPMAN, 1983; DRIEDZIC & GESSER, 1994). Segundo FABIATO (1983), em mamíferos, o influxo transsarcolema do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , através da troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e de canais voltagem-dependentes do tipo L (lentos), dispara a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS, através de canais de cálcio denominados canais de rianodina, fenômeno chamado de liberação de cálcio cálcio-induzida. Apesar da magnitude do influxo transsarcolema 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 de todos os 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. Embora peixes como a truta arco-íris apresentem-no mais abundante (DRIEDZIC & GESSER, 1994), este desempenha um papel muito reduzido como fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o aparato contrátil em frequências e temperaturas encontradas *in vivo* (GESSER, 1996). Segundo TIBBITS *et al.* (1991), no miocárdio de anfíbios, o cálcio liberado do RS não é significativo para a contração, além de ter sido contestada a ocorrência da liberação de cálcio cálcio-induzida no ventrículo destes animais (FABIATO, 1983). Estudos mais recentes com miócitos atriais isolados de truta, porém, indicam que o RS é funcionalmente importante para o manejo de  $\text{Ca}^{2+}$ , contribuindo com aproximadamente 40% do cálcio ativador (HOVE-MADSEN *et al.*, 1998, 2001).

A contração ventricular tanto em anfíbios quanto em peixes, parece ser relativamente insensível à rianodina (BERS, 1985; DRIEDZIC & GESSER, 1988; GESSER, 1996; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; KEEN *et al.*, 1994; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992), mesmo em concentrações que comprovadamente bloqueiam a liberação de cálcio do RS (SUTKO & AIREY, 1996) e em temperaturas e frequências estimulatórias dentro da faixa fisiológica.

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, chamado de canal de rianodina (BERS, 2001). Segundo MEISSNER (1986) e ALDERSON & FEHER (1987) a liberação de cálcio pelo RS é afetada pela presença de rianodina, que em pequenas concentrações (nM) trava o canal de cálcio aberto em um estado de subcondutância, enquanto que em concentrações acima de 10  $\mu\text{M}$  fecha completamente o canal, impedindo a saída do cálcio a partir do RS.

O  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular entra na célula pela abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da SL, principalmente via canais do tipo L, que demoram a se abrir, mas que permanecem abertos por um período relativamente longo, sendo responsáveis pelo platô característico dos potenciais de ação da musculatura cardíaca.

Segundo TIBBITS *et al.* (1992), a importância do fluxo de cálcio através da sarcolema pode ser indicada pela presença de um potencial de ação de longa duração, com uma fase platô mais pronunciada em anfíbios ( $723 \pm 106$  ms) e na maioria dos teleósteos estudados até o momento ( $556 \pm 56$  ms, a 20 °C em carpa cruciana; VORNANEN, 1989), em comparação ao potencial de ação de mamíferos, nos quais até mesmo as espécies que

---

demonstram um potencial de ação longo ( $372 \pm 14$  ms, a  $23$  °C em coelhos), estes chegam apenas à metade do valor observado em anfíbios.

Os inseticidas OPs se acumulam nas membranas, especialmente em células musculares, alterando sua fluidez e conseqüentemente o transporte de íons pelos canais transmembrana (DELI & KISS, 1986). Devido a esta característica, as enzimas ligadas à membrana são o alvo preferencial dos efeitos do MP, muitas das quais são relacionadas com o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e com a manutenção da sua concentração no interior das células, motivo pelo qual se torna importante o conhecimento dos efeitos do MP sobre o acoplamento E-C no miocárdio de peixes.

Levando-se em conta a variabilidade dos regimes ambientais aos quais os peixes estão freqüentemente sujeitos, especialmente com relação à disponibilidade de  $\text{O}_2$  dissolvido, a provável redução na  $\dot{V}\text{O}_2$  e alteração nos parâmetros ventilatórios causados pela exposição ao MP (como descrito acima) e a falta de informações sobre os efeitos deste OP na fisiologia cardíaca de peixes, o presente trabalho propôs-se a estudar tais efeitos no teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus*.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do inseticida organofosforado metil paration (MP) sobre a função cardio-respiratória do teleosteo de água doce *Brycon cephalus*, assim como sobre o acoplamento E-C das tiras ventriculares desta espécie:

1. determinação da tomada de  $O_2$  total ( $\dot{V}O_2$ ) e comparação dos resultados obtidos para os grupos controle e exposto ao MP;
2. determinação dos parâmetros ventilatórios (ventilação branquial –  $\dot{V}_G$ ; necessidade ventilatória –  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ; volume ventilatório –  $V_T$ ; extração de  $O_2$  da corrente ventilatória –  $EO_2$ ), comparando-se os resultados obtidos para os grupos controle e;
3. determinação da frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$ ) dos grupos controle e exposto ao MP;
4. avaliar a possível ocorrência de uma deterioração da força de contração isométrica no decorrer do período experimental, tanto nas tiras do grupo controle quanto do grupo exposto ao MP;
5. analisar os possíveis efeitos do aumento da taxa de estimulação sobre a força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares das espécies, tanto nos animais controle quanto nos expostos ao MP, e relacionar esses resultados com o acoplamento E-C, além de comparar as taxas atingidas *in vitro* com a frequência cardíaca máxima previamente observada *in vivo*;
6. verificar a importância do cálcio extracelular para o acoplamento E-C destas espécies através do estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de cálcio ao meio extracelular sobre o desenvolvimento de força do músculo cardíaco isolado, tanto em preparações controle quanto nos animais expostos ao MP;
7. determinar indiretamente a importância do retículo sarcoplasmático como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil, através da comparação da força de contração obtida pelas tiras ventriculares na presença ou ausência de rianodina (bloqueador dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático) e um possível efeito do MP sobre a função desta organela;
8. verificar um possível efeito da adrenalina sobre o desenvolvimento de força das tiras ventriculares dos grupos controle e exposto ao MP.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS.

#### 3.1. Material.

Foram utilizados, para este projeto de pesquisa, 51 exemplares de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon cephalus* (Figura 1), com peso de  $191,8 \pm 20,0$  g (Média  $\pm$  E.P.M.).

#### 3.1.1. Posição Sistemática da Espécie.

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

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Superordem: OSTARIOPHYSI

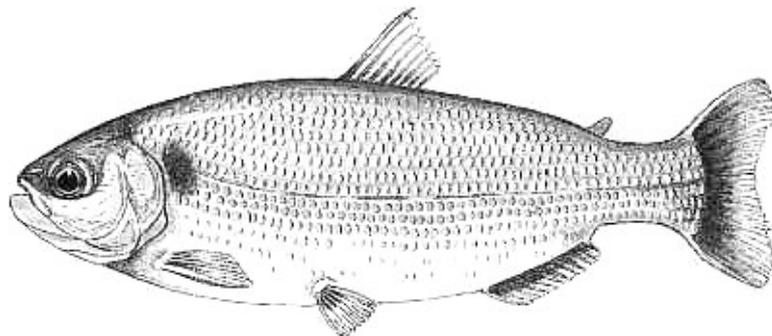
Ordem: CHARACIFORMES

Família: CHARACIDAE

Sub-Família: BRYCONINAE

Gênero: *Brycon* (Muller & Troschnel, 1844)

Espécie: *Brycon cephalus* (Günther, 1869)



**Figura 1-** Exemplar de matrinxã, *Brycon cephalus*.

### 3.1.2. Breves Considerações sobre a Espécie Estudada.

O matrinxã, *Brycon cephalus* é um peixe teleósteo de água doce, nativo das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins.

É um peixe de escamas, com coloração cinza prata uniforme, com uma mancha escura arredondada na região humeral e nadadeiras alaranjadas, exceto a nadadeira caudal que é geralmente cinza escuro. Os dentes são fortes e multicuspidados, com várias fileiras na maxila superior. Os adultos raramente ultrapassam 80 cm de comprimento e 5 kg (VAL & HONCZARIK, 1995).

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

É uma espécie rústica e tem crescimento rápido. A maturação sexual ocorre em torno dos 3 anos de idade. É uma espécie migratória, ou de piracema, e sua reprodução em ambiente natural ocorre no início do período de enchente, entre dezembro e fevereiro. São muito importantes comercialmente e encontram-se entre os peixes de escama mais esportivos da Amazônia (VAL & HONCZARIK, 1995).

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

## 3.2. Métodos.

### 3.2.1. Coleta e Manutenção em Laboratório.

Os exemplares de *B.cephalus* utilizados no presente estudo foram gentilmente cedidos pelo Centro de Piscicultura Águas Claras, Município de Mococa, SP.

Os peixes foram capturados, acondicionados em tanques com capacidade entre 25 e 50 litros e imediatamente transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do DCF/UFSCar, onde os experimentos foram realizados.

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

Os peixes foram divididos em 2 grupos experimentais: controle e submetidos ao tratamento com metil paration. Após o período de aclimatação, o grupo exposto ao MP foi mantido por 96 horas em aquários contendo MP na concentração de 2mg/l (2 ppm, 1/3 da  $CL_{50}$  para 96h) para, em seguida, serem utilizados nos experimentos descritos a seguir.

### 3.2.2. Preparações Experimentais.

#### 3.2.2.1. Parâmetros respiratórios e frequência cardíaca *in vivo*.

As preparações empregadas para a obtenção dos parâmetros respiratórios e dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca ( $f_H$ ) foram baseadas na metodologia utilizada por GLASS *et al.* (1991) e adaptada por RANTIN *et al.* (1993).

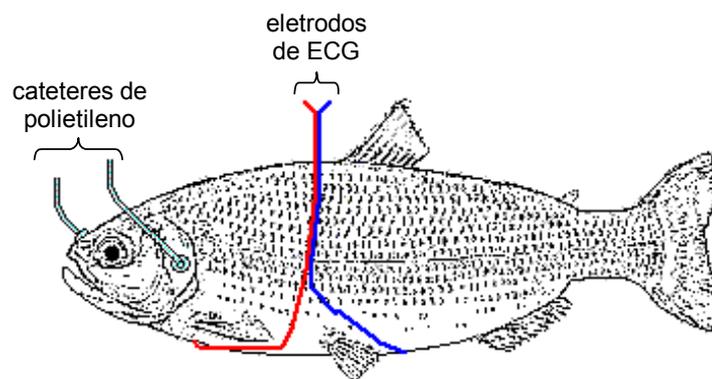
As cirurgias foram precedidas de um processo de anestesia, no qual os peixes foram submetidos a um banho em benzocaína 0,005% (0,5 g de benzocaína diluída em 10 litros de água) por aproximadamente 5 minutos (ou até a cessação da atividade espontânea). Imediatamente após a anestesia, os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica onde se procedeu a implantação dos cateteres de polietileno para o monitoramento das tensões de  $O_2$  da água inspirada e expirada e a sutura de eletrodos de eletrocardiografia para o registro da atividade cardíaca, sendo que tal processo teve a duração média de 10 minutos.

A canulação da cavidade bucal e da cavidade opercular permitiu obter amostras de água para determinação das tensões parciais de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ), bem como a determinação da frequência respiratória ( $f_R$ ). A canulação foi obtida pela

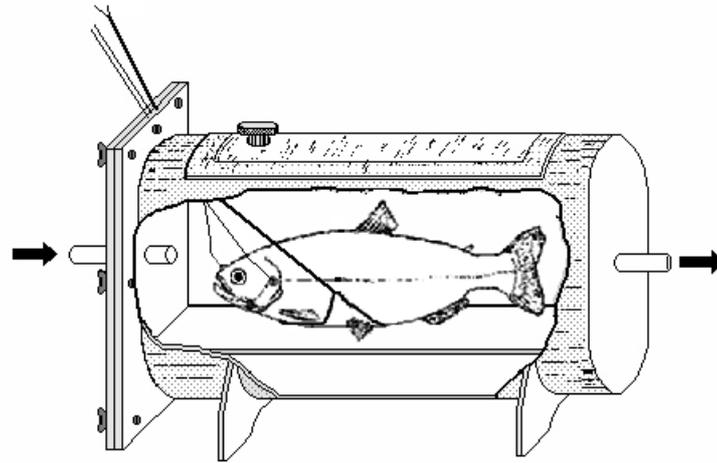
inserção de cateteres de polietileno na porção mediana superior da cavidade bucal (PE 100) e nas partes distais de ambos os cleitros operculares (PE 60) através de pequenos orifícios obtidos com o auxílio de uma broca. Os cateteres foram externados e fixados com a ajuda de um flange e cola de secagem rápida. (Figura 2).

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 para evitar seu deslocamento (Figura 2). Um terceiro eletrodo, de referência, foi colocado na água da câmara experimental. Os eletrodos foram conectados ao acoplador universal (Narco 7189) de um registrador Narco Narcotrace 40 (Narco Bio Systems, Houston, TX, USA). Esta preparação permite que sejam obtidos registros similares àqueles observados na derivação D<sub>1</sub> da eletrocardiografia padrão.

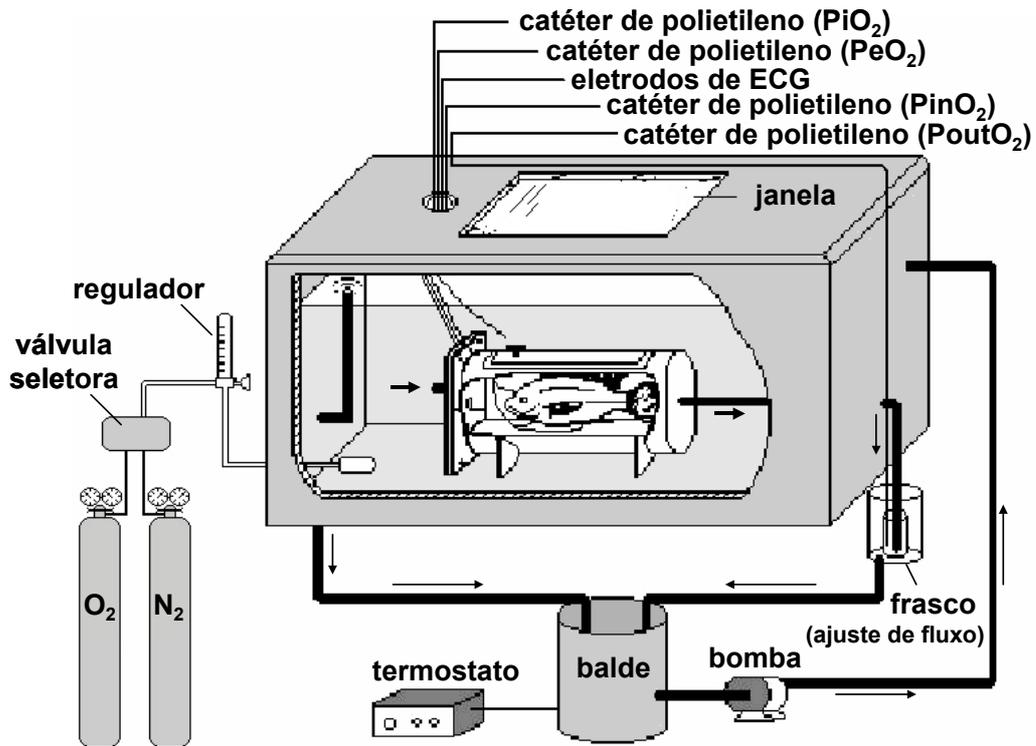
Após a preparação acima descrita os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante (Figura 3) e imediatamente transferidos para a câmara experimental, mantida em normóxia (140 mmHg) a 25 °C, onde permaneceram por um período de 12 horas para a recuperação da anestesia e restabelecimento das condições metabólicas de rotina (Figura 4).



**Figura 2-** Esquema mostrando a posição de inserção dos cateteres de polietileno e eletrodos de ECG para as medidas dos parâmetros cardio-respiratórios *in vivo*.



**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.



**Figura 4-** Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos *in vivo*.

As figuras 2, 3 e 4 mostram o esquema da preparação experimental utilizada para o estudo da  $f_H$  e das respostas ventilatórias de matrinxã, em animais controle e submetidos a 2 ppm (2 mg/l) de metil paration, durante normóxia e hipóxia gradual.

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se um animal de cada vez. A determinação da  $f_H$  e dos parâmetros ventilatórios foi feita em normóxia (140 mmHg) e nas seguintes tensões de  $O_2$  hipóxicas: 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de  $N_2$  e ar comprimido no interior da câmara experimental. A temperatura experimental foi mantida constante ( $25 \pm 1$  °C) por meio de um termostato FAC TempControl (FAC, São Carlos, SP) controlando uma resistência localizada no interior da câmara experimental.

Após a estabilização, cada tensão de  $O_2$  foi mantida por um período de 30 minutos antes de serem efetuadas as medidas e registros dos parâmetros acima citados. Os procedimentos de tomada de medidas e registros foram efetuados, em média, dentro de 5 minutos.

As tensões de  $O_2$  (mmHg) da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, bem como as tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ) pelos peixes foram continuamente monitoradas, conectando-se os cateteres de polietileno que coletavam amostras de água de entrada e de saída do respirômetro e aqueles implantados na boca e opérculos do peixe a um sistema consistindo de torneiras de 3 vias acopladas a eletrodos (FAC-001O<sub>2</sub>, FAC, São Carlos, SP) de analisadores de  $O_2$  (FAC-204A, FAC, São Carlos, SP).

A frequência respiratória  $f_R$  foi determinada através da contagem do número de ciclos respiratórios por minuto, obtidos a partir da cânula implantada na boca do animal, conectada a um transdutor de pressão Narco P-1000B ligado a um acoplador Universal (Narco 7189) de um fisiógrafo Narco Narcotrace 40 (Narco Bio Systems, Houston, TX, USA).

### 3.2.2.2. Contratilidade cardíaca *in vitro*.

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

Os animais de ambos os grupos experimentais (controle e exposto ao MP) foram sacrificados por meio de trauma na região cefálica sendo pesados em seguida. O coração foi retirado 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>, 2,5 mM de glicose, borbulhada com mistura carbogênica (2 % CO<sub>2</sub> e 98 % O<sub>2</sub>) a 25 °C. A solução fisiológica foi preparada no momento do experimento, a partir de soluções estoque previamente preparadas e armazenadas sob refrigeração (4 °C).

Em todos os protocolos experimentais foram utilizadas preparações pares de tiras ventriculares, constituídas por uma rede de fibras, obtidas do coração de um único peixe, após a retirada do bulbo arterioso e do átrio, para evitar contrações espontâneas do miocárdio.

Cada uma das tiras ventriculares, com diâmetro entre 2 e 4 mm, comprimento máximo de 0,5 cm e massa de  $4,16 \pm 0,30$  mg (Média  $\pm$  E.P.M.), foi transferida para um banho contendo 30 ml de solução fisiológica termostaticada a 25 °C, dotado de borbulhamento constante com a mistura carbogênica descrita acima. Uma extremidade da tira foi fixada, através de uma espiral metálica, em um gancho construído na extremidade de um eletrodo de estimulação. A outra extremidade foi conectada a um transdutor de força isométrica AECAD 0408 (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP) por meio de uma espiral metálica presa a uma linha cirúrgica, permitindo o registro da contração isométrica. Um segundo eletrodo de estimulação foi colocado no interior do banho, ao lado do primeiro (Figura 5). Os eletrodos de estimulação foram acoplados a estimuladores AVS 100D (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP), permitindo a estimulação elétrica das tiras para o desenvolvimento da força de contração a diferentes taxas. Os traçados das contrações isométricas e os tempos de contração e relaxamento cardíacos foram adquiridos e analisados por um sistema informatizado Soft & Solutions (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP). A figura 5 mostra o set experimental a ser utilizado no presente estudo.

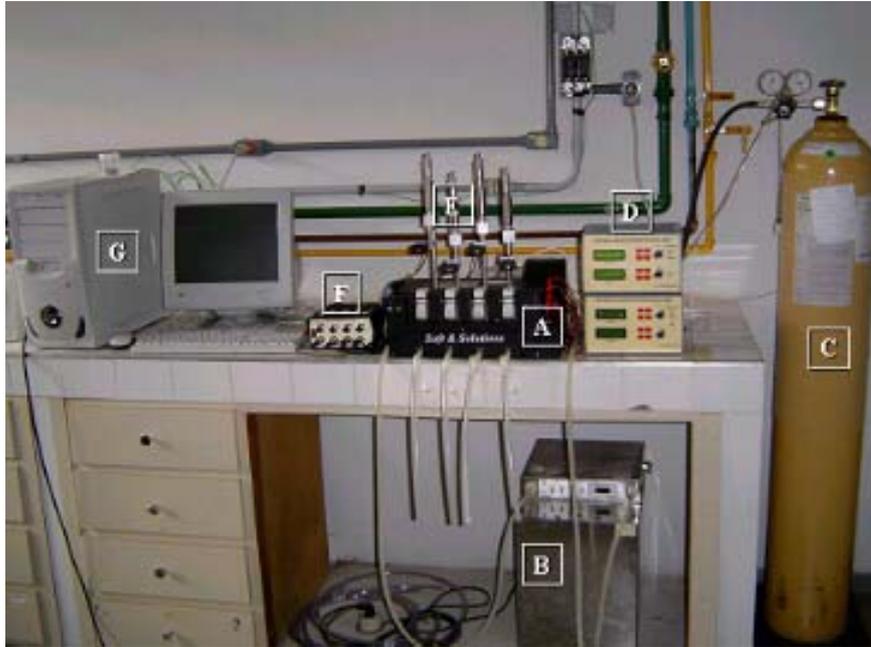
Inicialmente, as fibras foram estimuladas a uma taxa de 12 bpm (0,2 Hz) e estiradas para aumentar a distância entre o transdutor e o gancho de fixação, até que uma relação constante entre o pico de comprimento e a força de contração fosse obtida.

Após estabilização, os diferentes protocolos experimentais foram aplicados, incluindo aumento da concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup>, tensão pós-reposo, mudanças na taxa de estimulação e adição de rianodina e de adrenalina.

Todos os protocolos experimentais foram aplicados nas preparações controle e naquelas retiradas dos animais expostos ao MP.

Ao término de cada protocolo, as tiras ventriculares foram levemente secas em papel de filtro e o peso úmido foi determinado da porção da tira cujas contrações isométricas haviam sido registradas.

Em todos os protocolos experimentais, registros em alta velocidade foram efetuados para as medidas da força de contração ( $F_c$ ) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR).



**Figura 5**– Fotografia do set experimental a ser utilizado para a obtenção das respostas inotrópicas e cronotrópicas *in vitro* das tiras ventriculares de matrinxã. **A**: banho para órgãos com quatro cubetas; **B**: banho termostatizado; **C**: cilindro de mistura carbogênica; **D**: estimuladores elétricos; **E**: transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; **F**: amplificador de força; **G**: sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.

### 3.2.3. Protocolos Experimentais.

#### 3.2.3.1. Experimentos *in vivo*.

##### 3.2.3.1.1. Freqüência cardíaca ( $f_H$ ).

Após o período de recuperação, a  $f_H$  foi registrada em normóxia e nas subseqüentes tensões de  $O_2$  hipóxicas, durante as quais os registros foram obtidos. A  $f_H$  foi expressa em batimentos cardíacos por minuto (bpm).

##### 3.2.3.1.2. Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ).

A tomada de  $O_2$  total ( $\dot{V}O_2$ ) em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi determinada utilizando-se o sistema de respirometria de fluxo constante, pelo monitoramento das tensões de  $O_2$  da água de entrada e de saída do respirômetro.

A  $\dot{V}O_2$  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  $O_2$  da água de entrada do respirômetro (mmHg);

$P_{out}O_2$  = tensão de  $O_2$  da água de saída do respirômetro (mmHg);

$\alpha_{O_2}$  = coeficiente de solubilidade do  $O_2$  na água ( $mlO_2 \cdot l^{-1} \cdot mmHg^{-1}$ );

$V_R$  = fluxo de água através do respirômetro ( $l \cdot h^{-1}$ );

$W_T$  = peso fresco do animal (kg).

Os valores de  $\dot{V}O_2$  assim obtidos foram expressos em  $mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ .

##### 3.2.3.1.3. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ).

Para a determinação da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) foi empregado o método descrito por SAUNDERS (1962). Tal método, envolvendo respirometria de fluxo constante, consiste na tomada de amostras da água de entrada e de saída do respirômetro, bem como da água inspirada e expirada pelos peixes em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais (figuras 2, 3 e 4).

A  $\dot{V}_G$  foi calculada de acordo com KALININ *et al.* (1996), por meio da expressão:

$$\dot{V}_G = \frac{(P_{in}O_2 - P_{out}O_2 / P_iO_2 - P_eO_2) \cdot V_R}{W_T}, \text{ onde:}$$

$P_{in}O_2$  = 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).

Os valores finais de  $\dot{V}_G$  foram expressos em  $mlH_2O \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ .

#### 3.2.3.1.4. Freqüência respiratória ( $f_R$ ).

Para as medidas de freqüência respiratória ( $f_R$ ) os cateteres de polietileno inseridos na boca e opérculos do peixe foram conectados a transdutores de pressão, sendo seus sinais registrados no fisiógrafo Narco Narcotrace 40 (figuras 2, 3 e 4).

Analisando-se os registros assim obtidos, a contagem do número de ciclos respiratórios por unidade de tempo em cada tensão de  $O_2$  experimental forneceu os valores de  $f_R$ , que foram expressos em ciclos respiratórios. $min^{-1}$ .

#### 3.2.3.1.5. Volume corrente/ ventilatório ( $\dot{V}_T$ ).

O volume corrente, ou volume ventilatório ( $\dot{V}_T$ ) em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e a respectiva freqüência respiratória. O  $\dot{V}_T$  foi expresso em  $mlH_2O \cdot kg^{-1} \cdot ciclo\ respiratório^{-1}$ .

#### 3.2.3.1.6. Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).

A necessidade ventilatória, ou “water convection requirement” (requerimento branquial de convecção de água -  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi calculada pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e o respectivo valor de tomada de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ). Os valores finais de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  foram expressos em  $mlH_2O \cdot mlO_2^{-1}$ .

#### 3.2.3.1.7. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ ).

A extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) pelas brânquias, em normóxia e durante hipóxia gradual, foi calculada a partir da equação:

$$EO_2 = \frac{P_iO_2 - P_eO_2}{P_iO_2} \cdot 100, \text{ onde:}$$

$P_iO_2$  = tensão de  $O_2$  da água inspirada pelo animal (mmHg);

$P_eO_2$  = tensão de  $O_2$  da água expirada pelo animal (mmHg);

Dessa forma, a  $EO_2$  foi expressa em porcentagem (%).

### **3.2.3.2. Experimentos *in vitro*.**

#### **3.2.3.2.1. Efeito do tempo.**

Pares de tiras ventriculares foram mantidas a 12 bpm na temperatura de aclimação (25 °C) por um período de 40 minutos, durante o qual a força de contração (Fc) foi registrada ininterruptamente para avaliar a possível ocorrência de uma deterioração da força de contração isométrica ou alterações na dinâmica cardíaca no decorrer do período experimental que pudessem fazer necessárias correções dos valores de Fc, TPT e THR obtidos nos demais protocolos experimentais no decorrer do período experimental.

#### **3.2.3.2.2. Aumento da concentração de cálcio extracelular.**

Para se verificar a dependência da contração em relação ao cálcio extracelular pares de tiras ventriculares foram estabilizados a 12 bpm e 25 °C em um banho contendo 1,5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , por um período de aproximadamente 15 min. Em seguida, foram efetuados registros do desenvolvimento de força isométrica de contração (Fc) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) das tiras por 3 min. A seguir, as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  foram elevadas em 2 mM a cada 5 min ou até que o  $\text{Ca}^{2+}$  tenha produzido seu efeito completo.

#### **3.2.3.2.3. Tensão pós-reposo.**

As preparações experimentais descritas em 3.2.2.1 foram repetidas, sendo que um dos banhos recebeu 10  $\mu\text{M}$  de rianodina 30 minutos antes do início do experimento. A rianodina foi dissolvida em água destilada na concentração adequada e então mantida congelada a - 18 °C.

Após a estabilização, as tiras ventriculares foram estimuladas a uma taxa constante (12 bpm) durante 3 minutos. Seguiram-se então períodos de repouso de 10 s, 30 s, 60 s e 5 min, após os quais as tiras foram novamente estimuladas, sendo que a primeira contração registrada após a primeira estimulação foi considerada a tensão pós-reposo.

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 o repouso prolongado.

#### **3.2.3.2.4. Aumento da frequência de estimulação.**

Pares de tiras ventriculares foram estabilizadas a 12 bpm na temperatura de aclimação (25 °C) por um período de aproximadamente 15 minutos. Após esse período,

foram efetuados os registros do desenvolvimento de força isométrica (Fc) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) de ambas as tiras por 3 minutos. Ao final desse tempo, as taxas de estimulação foram progressivamente aumentadas, até que os registros se tornaram irregulares. Foi considerada a frequência de estimulação máxima aquela na qual pelo menos 50 % das tiras ainda foram capazes de se contrair regularmente.

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

Com o objetivo de se determinar a importância funcional do RS em diferentes frequências de estimulação, o mesmo protocolo descrito acima foi repetido, porém o banho experimental recebeu 10  $\mu$ M de rianodina (Sigma – C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>9</sub>) 30 min antes do início do experimento.

#### **3.2.3.2.5. Adição de adrenalina.**

Este protocolo foi realizado com o objetivo de obter informações sobre a capacidade máxima do acoplamento excitação-contração e sobre a modulação adrenérgica na contratilidade cardíaca da espécie estudada, assim como um possível efeito do metilparation.

Após o período de estabilização das tiras ventriculares a 12 bpm, foram realizados registros de Fc, TPT e THR em concentrações crescentes (10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 5 x 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M) de adrenalina (Merck – C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>), dos grupos controle e intoxicado.

Soluções estoque de adrenalina em concentrações adequadas foram previamente preparadas e mantidas sob refrigeração ( $\approx$  4 °C). No momento de cada experimento foram acrescentadas ao banho as quantidades necessárias de cada estoque para perfazer as diferentes concentrações utilizadas neste protocolo.

A utilização da adrenalina como o único agonista adrenérgico deveu-se ao fato desta substância, segundo alguns estudos desenvolvidos com peixes (CAMERON & BROWN, 1981; GRAHAM & FARRELL, 1989), ser cerca de 10 vezes mais eficaz que a noradrenalina na estimulação dos  $\beta$ -adrenoceptores cardíacos de peixes.

### 3.3. Forma de apresentação dos dados.

#### 3.3.1. Experimentos *in vivo*.

Os parâmetros ventilatórios de *B. cephalus* foram comparados aos valores obtidos inicialmente em cada protocolo (normóxia – 140 mmHg) e expressos como se segue:

A frequência cardíaca ( $f_H$ ) foi expressa em batimentos cardíacos por minuto (bpm);

A frequência respiratória ( $f_R$ ) foi expressa em ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>;

Os valores de consumo de O<sub>2</sub> ( $\dot{V}O_2$ ) foram expressos em mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>;

Os valores da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) foram expressos em mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>;

O volume corrente/ventilatório ( $\dot{V}_T$ ) foi expresso em mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>;

Os valores da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ) foram expressos em mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup>;

A extração de O<sub>2</sub> (EO<sub>2</sub>) foi expressa em porcentagem (%).

#### 3.3.2. Experimentos *in vitro*.

A força de contração (Fc) está representada em valores absolutos (mN.mm<sup>-2</sup>) e os parâmetros tempo-dependentes foram apresentados em ms.

Nos experimentos onde foi analisada a tensão (Fc) pós-reposo, na ausência ou presença de rianodina, os valores obtidos são dados como uma porcentagem da última contração precedente ao reposo.

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

- Tempo para o pico de força (TPT - *time to peak tension*): representado em valores absolutos (ms) e comparado em relação aos valores iniciais de cada protocolo.
- Tempo para 50% do Relaxamento (THR - *time to half relaxation*): expresso da mesma forma que a descrita para TPT, ou seja, em valores absolutos (ms), sendo também comparado em relação aos valores inicialmente observados em cada protocolo.

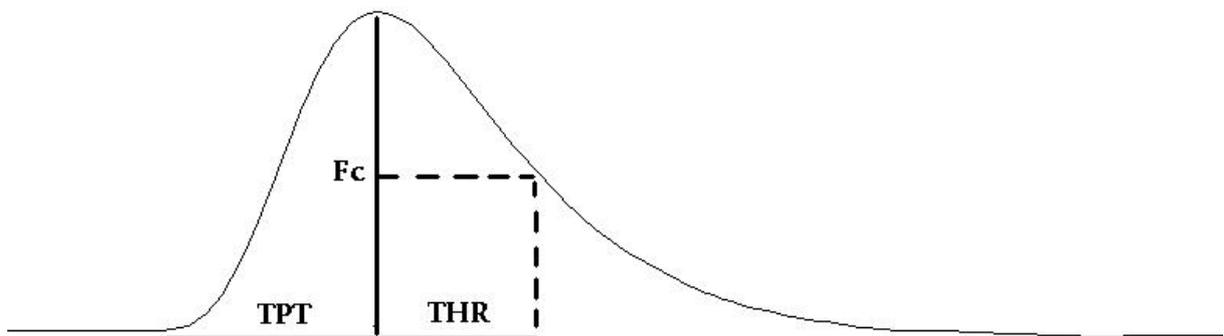
A representação de um registro de força de contração com as medidas dos parâmetros descritos acima é mostrada na figura 6.

### 3.4. Tratamento estatístico dos dados.

O seguinte procedimento estatístico foi utilizado, com o auxílio do software GraphPad InStat versão 3.00 (San Diego, CA, USA), para análise dos dados obtidos no presente estudo:

- Teste T não pareado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças estatísticas e significativas entre os valores de um mesmo protocolo;
- Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, utilizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas encontradas entre valores correspondentes obtidos em diferentes grupos experimentais.

Os níveis de significância foram considerados quando  $P < 0,05$ .



**Figura 6-** Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo. Fc: Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50% do relaxamento.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Frequência cardíaca de *Brycon cephalus* submetido à hipóxia gradual.

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$ - bpm) dos grupos controle e exposto ao MP, submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água.

No grupo controle, os valores médios de  $f_H$  obtidos em normóxia ( $63,1 \pm 1,9$  bpm) não diferiram significativamente daqueles obtidos nas tensões de  $O_2$  de 120, 100 e 80 mmHg (Figura 7). A partir da tensão de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ) de 60 mmHg, foi observada uma bradicardia crescente, sendo que a  $f_H$  atingiu o valor mínimo de  $31,3 \pm 1,6$  bpm, na menor tensão de  $O_2$  utilizada no experimento (20 mmHg), correspondente a uma diminuição de 50,5 % no valor observado em normóxia.

No grupo exposto ao MP, os valores médios da  $f_H$  nas tensões de 120 e 100 mmHg também não diferiram significativamente daqueles observados em normóxia ( $57,8 \pm 1,5$  bpm). A partir da  $P_{in}O_2$  de 80 mmHg, foi observada uma bradicardia crescente e a  $f_H$  atingiu o valor mínimo de  $28,3 \pm 1,5$  bpm a 20 mmHg, correspondente a uma redução de 51,1 % em relação ao valor observado em normóxia (Figura 7).

Quando comparados os dois grupos experimentais, observou-se que os valores de  $f_H$  do grupo exposto ao MP foram menores que os obtidos para o grupo controle em todas as tensões de  $O_2$  utilizadas no experimento, exceto nas duas menores (40 e 20 mmHg).

### 4.2. Respostas respiratórias de *Brycon cephalus* submetido à hipóxia gradual.

#### 4.2.1. Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e Tensão Crítica de Oxigênio ( $P_cO_2$ ).

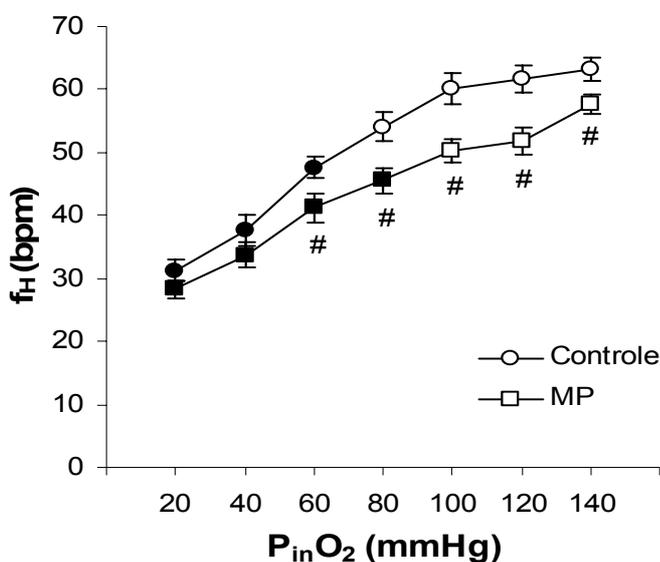
##### 4.2.1.1. Grupo controle.

Os valores médios do consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2 - mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ), do grupo controle frente às diferentes tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ) são apresentados na Tabela 2 e representados graficamente na Figura 8.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a  $\dot{V}O_2$  de *B. cephalus* manteve-se constante até a tensão de 40 mmHg, com valor médio de  $95,0 \pm 2,5 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ . Somente na menor tensão de  $O_2$  utilizada (20 mmHg) observou-se uma redução significativa dos valores de  $\dot{V}O_2$ , atingindo  $57,4 \pm 3,9 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ , o que representa uma redução de ~46% em relação aos valores observados em normóxia ( $107,0 \pm 6,3 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ).

**Tabela 1-** Valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) de espécimes de *B. cephalus*, do grupo controle ( $n = 8$ ) e exposto ao MP ( $n = 8$ ), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

$P_{in}O_2$ (mmHg)	$f_H$ (bpm)	
	Controle	MP
140,1 $\pm$ 0,1	63,1 $\pm$ 1,9	# 57,8 $\pm$ 1,5
119,7 $\pm$ 0,3	61,8 $\pm$ 2,2	# 51,8 $\pm$ 2,1
99,8 $\pm$ 0,5	60,1 $\pm$ 2,6	# 50,3 $\pm$ 1,9
80,7 $\pm$ 0,2	54,0 $\pm$ 2,3	# <b>45,5 <math>\pm</math> 2,1</b>
60,5 $\pm$ 0,3	<b>47,6 <math>\pm</math> 1,6</b>	# <b>41,3 <math>\pm</math> 2,4</b>
40,4 $\pm$ 0,3	<b>37,8 <math>\pm</math> 2,5</b>	<b>33,8 <math>\pm</math> 2,1</b>
20,8 $\pm$ 0,4	<b>31,3 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b>28,3 <math>\pm</math> 1,5</b>



**Figura 7-** Efeito da diminuição da tensão de  $O_2$  da água no desenvolvimento de frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) de espécimes de matrinxã, dos grupos controle ( $n = 8$ ) e exposto ao MP ( $n = 8$ ). Valores médios + 1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. ( $p < 0,05$ ).

A reta paralela ao eixo das abcissas, que passa entre os pontos compreendidos entre as  $P_{in}O_2$  de 140 e 40 mmHg, foi ajustada pela média dos valores de  $\dot{V}O_2$  em tais tensões. O ajuste da reta que passa por entre os pontos localizados em  $P_{in}O_2$  inferiores a estas foi obtido a partir da expressão  $Y = a + bX$ , onde  $a$  e  $b$  foram estimados através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A intersecção das retas assim ajustadas determinou um ponto que, projetado sobre o eixo das abcissas, permitiu a estimativa da tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ), definida RANTIN *et al.* (1992) como sendo a tensão de  $O_2$  abaixo da qual a  $\dot{V}O_2$  do animal deixa de ser independente do  $O_2$  disponível e o animal não consegue mais regular eficientemente sua tomada de oxigênio do meio. A  $P_cO_2$  para *B. cephalus*, calculada pelo método descrito acima, foi de ~35,4 mmHg, abaixo da qual essa espécie não foi mais capaz de manter constante o consumo de  $O_2$ .

#### 4.2.1.2. Grupo exposto ao MP.

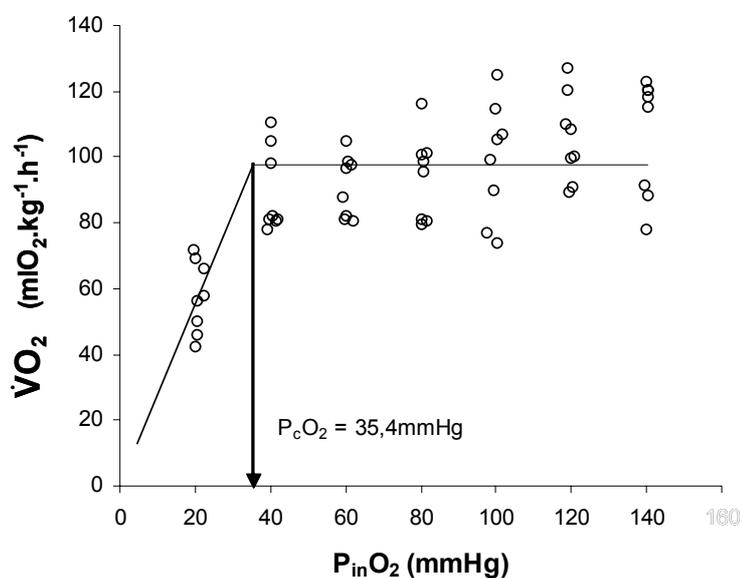
Os valores médios do consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2 - mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ), do grupo exposto ao MP, dos exemplares de *B. cephalus* frente às diferentes tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$ ) são apresentados na Tabela 2 e representados graficamente na Figura 9.

Observou-se que a  $\dot{V}O_2$  manteve-se constante até a tensão de 60 mmHg, com valor médio de  $97,8 \pm 2,2 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ . Somente nas tensões de  $O_2$  de 40 e 20 mmHg foi observada uma redução significativa dos valores de  $\dot{V}O_2$ , atingindo, na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg, o valor mínimo de  $45,7 \pm 3,0 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ , o que representa uma redução de  $\approx 56\%$  em relação aos valores observados em normóxia ( $105,2 \pm 4,5 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ).

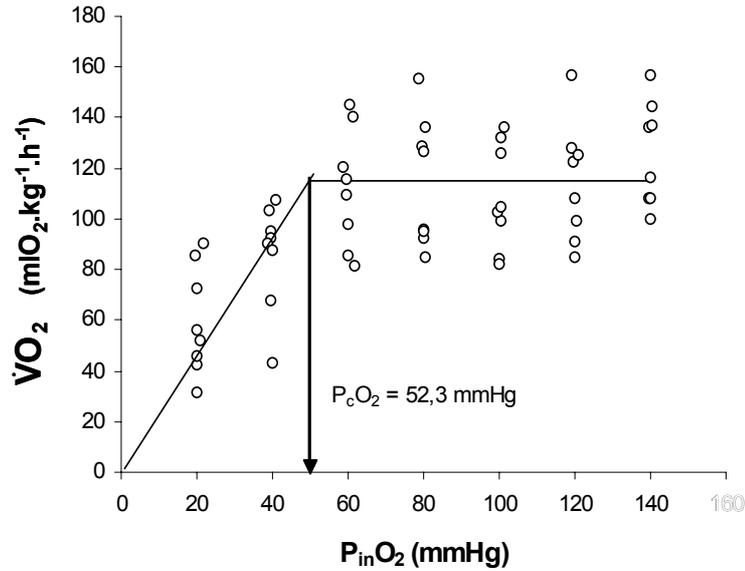
A  $P_cO_2$  para *B. cephalus*, calculada pela intersecção das retas de regressão obtida pelo método descrito por RANTIN *et al.* (1992), foi de ~52,3 mmHg, abaixo da qual essa espécie não foi mais capaz de manter constante o consumo de  $O_2$ .

**Tabela 2-** Valores médios do consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2 - \text{mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) de espécimes de *B. cephalus*, no grupo controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

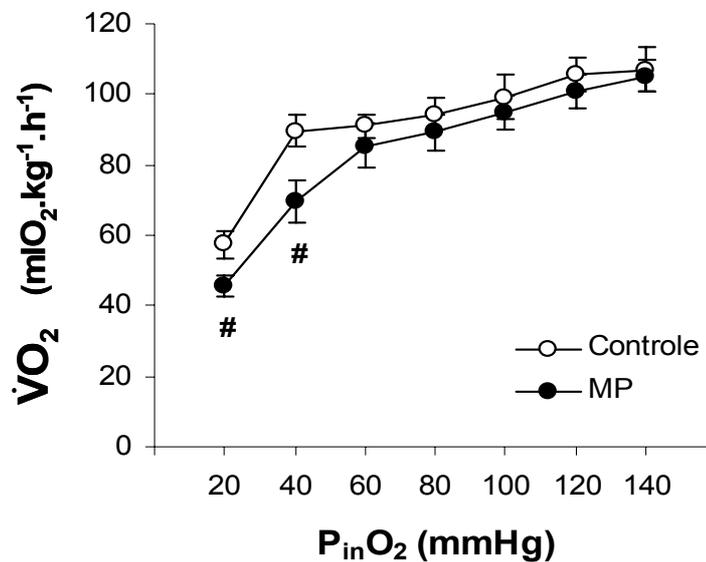
$P_{in}O_2$ (mmHg)	$\dot{V}O_2$ ( $\text{mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	
	Controle	MP
140,1 $\pm$ 0,1	107,0 $\pm$ 6,3	105,2 $\pm$ 4,5
119,7 $\pm$ 0,3	105,7 $\pm$ 4,7	100,7 $\pm$ 4,8
99,8 $\pm$ 0,5	99,1 $\pm$ 6,3	94,7 $\pm$ 4,8
80,7 $\pm$ 0,2	94,3 $\pm$ 4,5	89,2 $\pm$ 5,2
60,5 $\pm$ 0,3	91,2 $\pm$ 3,3	85,3 $\pm$ 6,3
40,4 $\pm$ 0,3	89,6 $\pm$ 4,6	# <b>69,6 <math>\pm</math> 6,1</b>
20,8 $\pm$ 0,4	<b>57,4 <math>\pm</math> 3,9</b>	# <b>45,7 <math>\pm</math> 3,0</b>



**Figura 8-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2 - \text{mmHg}$ ) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2 - \text{mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) do grupo controle (n = 8) de *B. cephalus*. A seta representa a  $P_{cO_2}$ .



**Figura 9-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) do grupo exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. A seta representa a  $P_{c}O_2$ .



**Figura 10-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## 4.2.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ ).

### 4.2.2.1. Grupo controle.

Os valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), da frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e do volume ventilatório, ( $V_T$  – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) dos exemplares do grupo controle de *B. cephalus*, quando submetidos à diminuição gradual da tensão de O<sub>2</sub> da água, são apresentados na Tabela 3 e representados graficamente nas Figuras 11, 12 e 13.

A  $\dot{V}_G$  foi mantida constante desde normóxia até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 60 mmHg a partir da qual aumentos progressivos e significativos foram registrados. O maior valor de  $\dot{V}_G$  foi registrado a 20 mmHg (2608,5 ± 250,9 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), valor esse 5,5 vezes mais elevado que o obtido em normóxia (471,1 ± 47,4 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

A  $f_R$  obtida em normóxia foi de 79,0 ± 3,1 ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>, mantendo-se constante somente até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 80 mmHg. Nas demais tensões, todos os valores de  $f_R$  foram superiores aos registrados em normóxia. O maior valor da  $f_R$ , observado na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada (20 mmHg), foi de 137,0 ± 3,7 ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>, valor este 1,7 vezes maior que o observado em normóxia.

A redução da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> provocou um aumento significativo do  $V_T$  de *B. cephalus* somente a partir de 40 mmHg. O valor de  $V_T$  observado em normóxia foi de 6,9 ± 1,6 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>. Na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 20 mmHg, o  $V_T$  atingiu o valor máximo de 19,7 ± 1,7 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>, valor este 2,9 vezes maior que o obtido em normóxia.

### 4.2.2.2. Grupo exposto ao MP

Os valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), da frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e do volume ventilatório ( $V_T$  – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) dos exemplares do grupo exposto ao MP de *B. cephalus*, quando submetidos à diminuição gradual da tensão de O<sub>2</sub> da água, são apresentados na Tabela 4 e representados graficamente nas Figuras 11, 12 e 13.

A diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água provocou um aumento da  $\dot{V}_G$  a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 60 mmHg, até o valor máximo de 4139,9 ± 324,4 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada (20 mmHg), valor esse 7,7 vezes maior que o obtido em normóxia (540,4 ± 68,7 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

A  $f_R$  observada em normóxia foi de 80,0 ± 4,7 ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>, mantendo-se constante até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg. Na tensão de O<sub>2</sub> de 20 mmHg, o valor de  $f_R$  foi de

133,8 ± 4,1 ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>, valor este 1,7 vezes maior que o observado em normóxia.

A redução gradual da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> provocou um aumento significativo do V<sub>T</sub> do grupo exposto ao MP a partir de 60 mmHg. O valor de V<sub>T</sub> observado em normóxia foi de 5,9 ± 0,6 mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>. Na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada (20 mmHg), o V<sub>T</sub> atingiu o valor máximo de 33,4 ± 2,8 mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>, valor este 5,6 vezes maior que o obtido em normóxia.

#### 4.2.3. Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).

Os valores médios da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ) dos grupos controle e exposto ao MP de matrinxã, em resposta à diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro, são elencados na tabela 5. A representação gráfica desses resultados pode ser observada na figura 14. Houve um aumento significativo da  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  do grupo controle a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg, partindo do valor de 4,4 ± 0,4 mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, observado em normóxia, até o valor máximo de 46,4 ± 4,8 mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, observado na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada no experimento (20 mmHg).

No grupo exposto ao MP, houve um aumento significativo da  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ , também a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg, partindo do valor de 5,2 ± 0,7 mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, observado em normóxia, até o valor máximo de 95,1 ± 13,2 mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, observado na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada no experimento (20 mmHg).

Comparando-se os dados obtidos em ambos os grupos experimentais, observou-se que o valor máximo da  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  do grupo exposto ao MP, na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada, foi ~2 vezes maior do que aquele obtido para o grupo controle.

#### 4.2.4. Extração de oxigênio da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>).

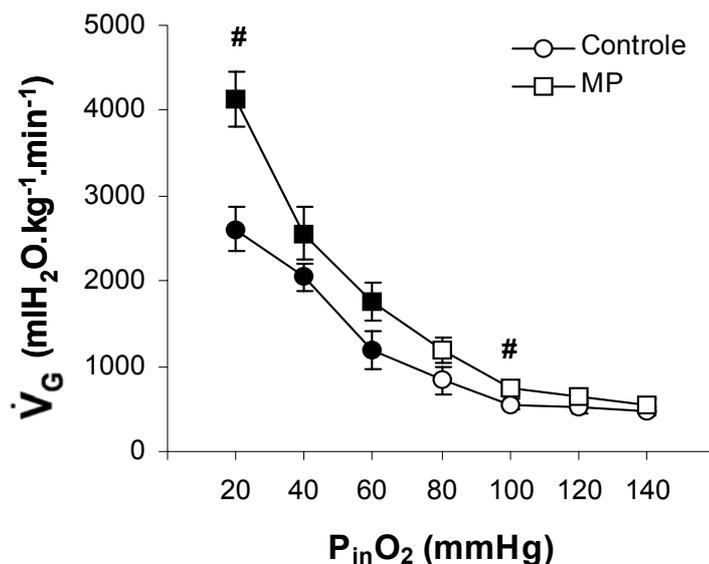
Os valores médios da extração de O<sub>2</sub> dos grupos controle e exposto ao MP de matrinxã, em resposta à diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro, são apresentados na tabela 6. A representação gráfica desses resultados pode ser observada na figura 15. Os resultados mostram que houve uma diminuição significativa da EO<sub>2</sub> do grupo controle apenas na P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 20 mmHg, partindo do valor de 59,6 ± 5,1 %, observado em normóxia, até o valor mínimo de 43,1 ± 3,4 %, observado na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> utilizada no experimento (20 mmHg). No grupo exposto ao MP, houve uma redução significativa da EO<sub>2</sub> em relação aos valores em normóxia (67,0 ± 4,7 %), a partir da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg, atingindo o valor mínimo de 43,7 ± 5,6 %, na menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> (20 mmHg). Não houve diferença significativa entre os dois grupos experimentais.

**Tabela 3-** Valores da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), da frequência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e do volume ventilatório ( $V_T$  - mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) do grupo controle (n = 8) de *B. cephalus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O<sub>2</sub> da água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

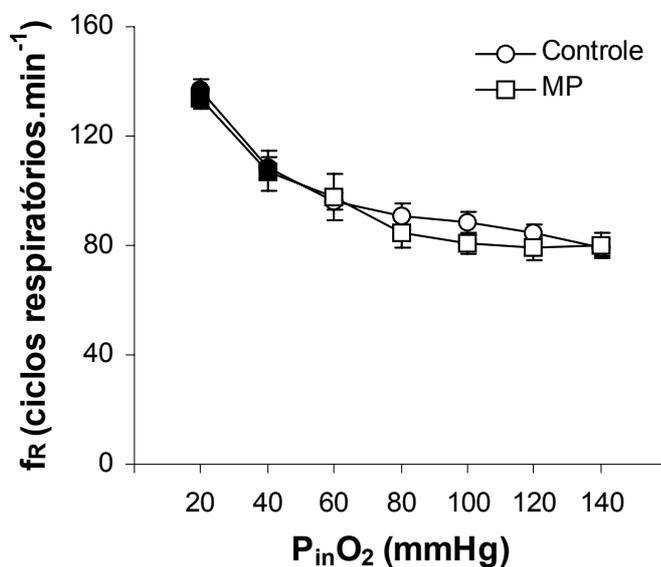
<b>P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> (mmHg)</b>	<b><math>\dot{V}_G</math></b>	<b>f<sub>R</sub></b>	<b>V<sub>T</sub></b>
140,1 ± 0,1	471,0 ± 47,4	79,0 ± 3,1	6,9 ± 1,6
119,7 ± 0,3	512,6 ± 62,7	84,3 ± 3,6	5,7 ± 0,6
99,8 ± 0,5	553,6 ± 60,8	88,3 ± 4,2	6,3 ± 0,6
80,7 ± 0,2	832,7 ± 156,7	90,8 ± 4,9	8,9 ± 1,1
60,5 ± 0,3	<b>1185,6 ± 228,5</b>	<b>96,3 ± 3,0</b>	11,8 ± 1,6
40,4 ± 0,3	<b>2048,0 ± 161,4</b>	<b>108,3 ± 3,8</b>	<b>17,9 ± 1,3</b>
20,8 ± 0,4	<b>2608,5 ± 250,9</b>	<b>137,0 ± 3,7</b>	<b>19,7 ± 1,7</b>

**Tabela 4-** Valores da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), da frequência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e do volume ventilatório ( $V_T$  - mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) do grupo exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O<sub>2</sub> da água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

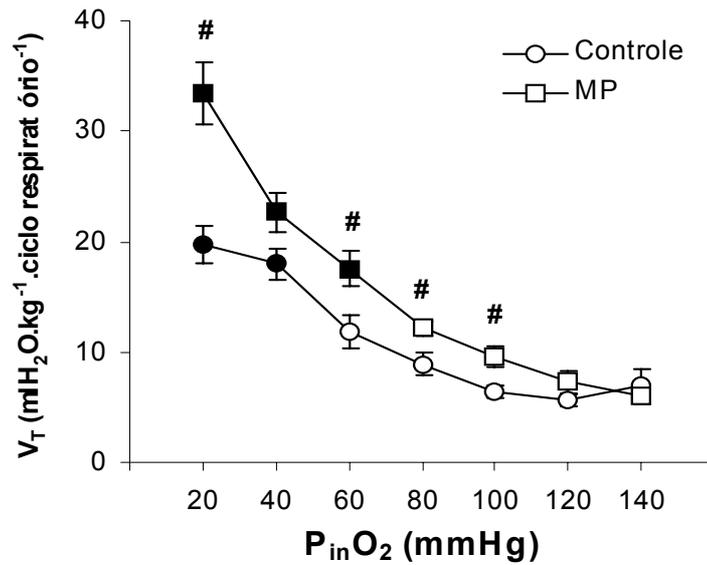
<b>P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> (mmHg)</b>	<b><math>\dot{V}_G</math></b>	<b>f<sub>R</sub></b>	<b>V<sub>T</sub></b>
140,1 ± 0,1	540,4 ± 68,7	80,0 ± 4,7	5,9 ± 0,6
119,7 ± 0,3	643,1 ± 60,0	79,0 ± 4,4	7,3 ± 1,0
99,8 ± 0,5	754,1 ± 60,8	80,8 ± 3,8	9,6 ± 0,9
80,7 ± 0,2	1190,2 ± 147,8	84,5 ± 5,4	12,1 ± 0,7
60,5 ± 0,3	<b>1749,8 ± 224,4</b>	97,8 ± 8,5	<b>17,5 ± 1,6</b>
40,4 ± 0,3	<b>2557,6 ± 312,2</b>	<b>107,3 ± 7,5</b>	<b>22,6 ± 1,8</b>
20,8 ± 0,4	<b>4139,9 ± 324,4</b>	<b>133,8 ± 4,1</b>	<b>33,4 ± 2,8</b>



**Figura 11-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).



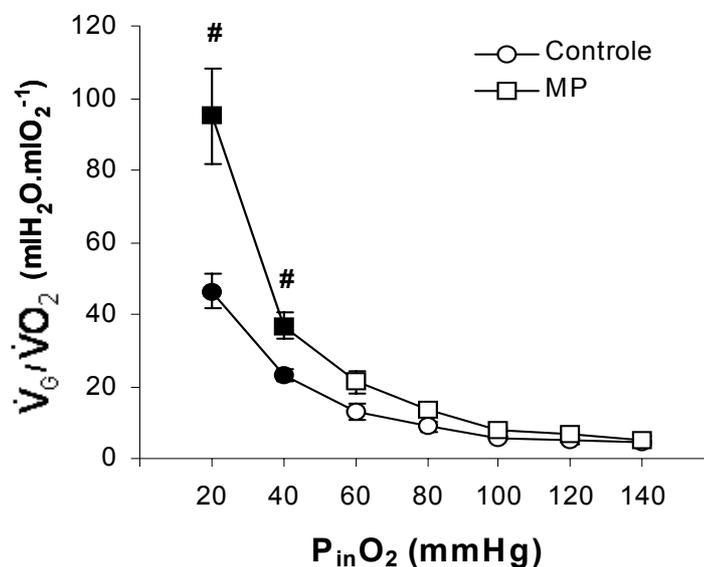
**Figura 12-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o volume ventilatório ( $V_T$  -  $mlH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$ ) dos grupos controle ( $n = 8$ ) e exposto ao MP ( $n = 8$ ) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5-** Valores da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  -  $\text{mlH}_2\text{O}.\text{mlO}_2^{-1}$ ) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*, submetido a diminuições graduais na tensão de  $O_2$  da água. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

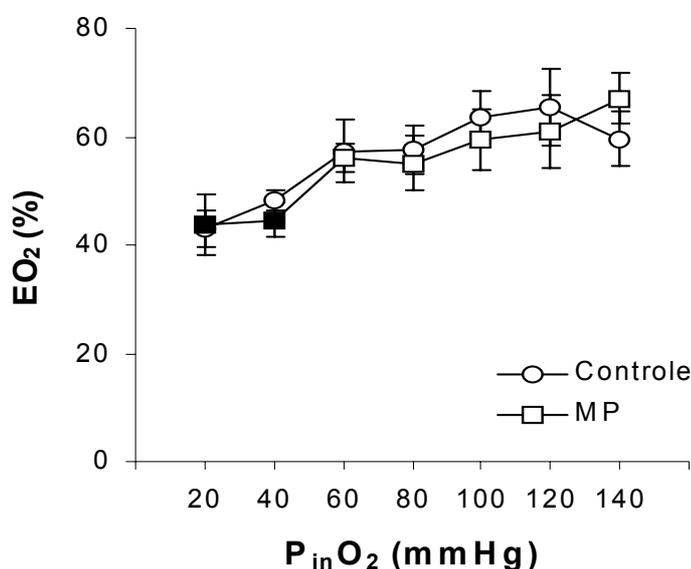
$P_{in}O_2$ (mmHg)	$\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ( $\text{mlH}_2\text{O}.\text{mlO}_2^{-1}$ )	
	Controle	MP
140,1 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,7
119,7 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 0,7
99,8 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,6
80,7 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 1,5	13,6 $\pm$ 1,6
60,5 $\pm$ 0,3	13,0 $\pm$ 2,4	21,3 $\pm$ 3,2
40,4 $\pm$ 0,3	<b>23,0 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b># 36,8 <math>\pm</math> 3,8</b>
20,8 $\pm$ 0,4	<b>46,4 <math>\pm</math> 4,8</b>	<b># 95,1 <math>\pm</math> 13,2</b>



**Figura 14-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  -  $\text{mlH}_2\text{O}.\text{mlO}_2^{-1}$ ) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6-** Valores da extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub> - %) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*, submetido a diminuições graduais na tensão de O<sub>2</sub> da água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

P <sub>in</sub> O <sub>2</sub> (mmHg)	EO <sub>2</sub>	
	Controle	MP
140,1 ± 0,1	59,6 ± 5,1	67,0 ± 4,7
119,7 ± 0,3	65,4 ± 7,2	60,9 ± 6,7
99,8 ± 0,5	63,7 ± 4,9	59,5 ± 5,7
80,7 ± 0,2	57,6 ± 4,4	55,1 ± 5,1
60,5 ± 0,3	57,3 ± 5,8	56,1 ± 2,6
40,4 ± 0,3	48,2 ± 1,7	<b>44,5 ± 3,2</b>
20,8 ± 0,4	<b>43,1 ± 3,4</b>	<b>43,7 ± 5,6</b>



**Figura 15-** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre a extração de O<sub>2</sub> (EO<sub>2</sub> - %) dos grupos controle (n = 8) e exposto ao MP (n = 8) de *B. cephalus*. Valores médios ± 1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

### **4.3. Contratilidade cardíaca de *Brycon cephalus in vitro*.**

#### **4.3.1. Efeito do tempo de exposição.**

Os valores médios da força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  e % dos valores iniciais) desenvolvida pelo músculo cardíaco isolado de *B. cephalus*, estimulados a 12 bpm ao longo do tempo de exposição (40 min), no grupo controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ), são apresentados na Tabela 7 e representados graficamente na Figura 16. Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR – ms e % dos valores iniciais) são apresentados na Tabela 8 e representados na Figura 17.

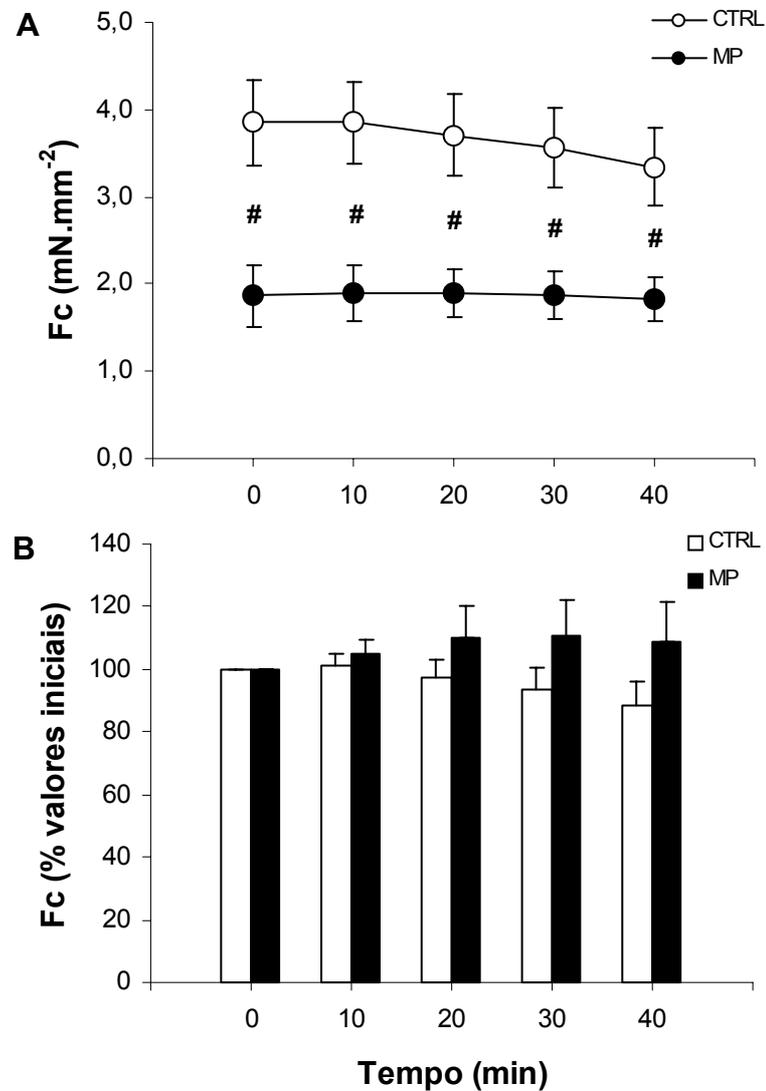
Apesar de ter sido observada uma tendência de deterioração da  $F_c$  no grupo controle, a análise estatística dos dados indica que esta não apresentou diferença significativa em relação aos valores iniciais. O mesmo ocorreu no grupo exposto ao MP.

A comparação dos valores de  $F_c$  dos dois grupos experimentais ao longo do tempo revelou diferença significativa entre ambos, sendo que o desenvolvimento de força pelo músculo isolado do grupo exposto ao MP foi de aproximadamente 50% daquele apresentado pelo grupo controle.

A análise estatística dos resultados indica que não houve diferença significativa entre os valores de TPT e THR durante o período experimental para nenhum dos grupos, nem tampouco apresenta diferença na variação de TPT e THR, considerando-se os mesmos tempos experimentais. No entanto, ao compararem-se os valores normalizados de THR, observa-se uma diferença na variação proporcional deste parâmetro entre os dois grupos experimentais, considerando-se os mesmos períodos de exposição.

**Tabela 7-** Valores da força de contração (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>) de tiras ventriculares de *B. cephalus*, no grupo controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 12 bpm. Valores médios ± 1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.

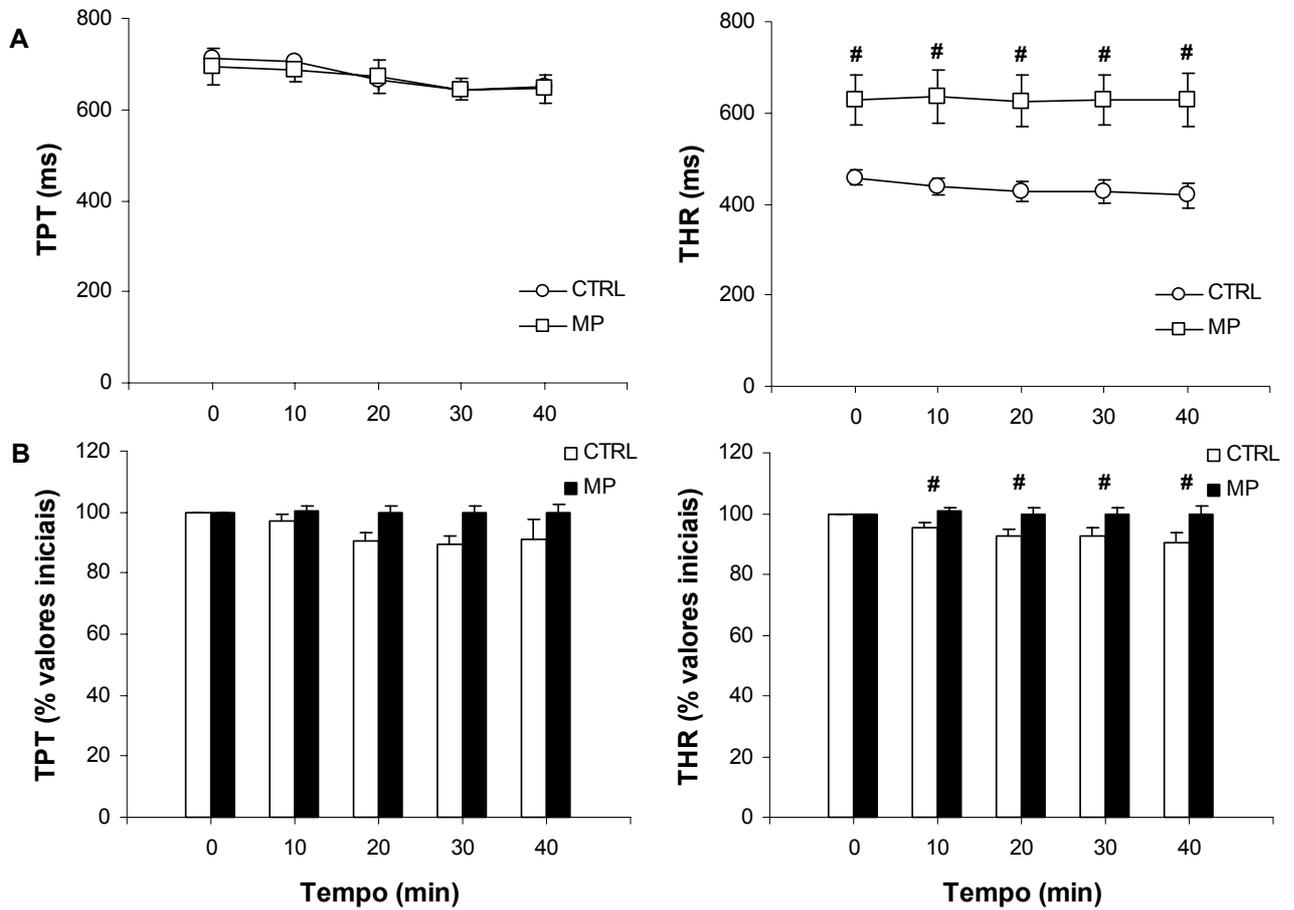
Tempo (min)	Fc (mN.mm <sup>-2</sup> )		
	Controle		MP
0	3,8 ± 0,5	#	1,9 ± 0,3
10	3,9 ± 0,5	#	1,9 ± 0,3
20	3,7 ± 0,5	#	1,9 ± 0,3
30	3,6 ± 0,5	#	1,9 ± 0,3
40	3,3 ± 0,4	#	1,8 ± 0,3



**Figura 16-** Efeito do tempo de exposição (40 minutos) no desenvolvimento de força de contração de tiras ventriculares de matrizã, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n =10). **A:** Valores absolutos (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>), **B:** Valores normalizados (Fc - % dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8-** Valores do tempo para o pico de tensão e tempo para 50% de relaxamento (TPT e THR - ms) de tiras ventriculares de *B. cephalus*, no grupo controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 12 bpm. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.

TPT (ms)			
Tempo (min)	Controle		MP
0	712,9 $\pm$ 13,0		694,7 $\pm$ 41,3
10	706,1 $\pm$ 17,0		686,0 $\pm$ 24,7
20	663,7 $\pm$ 21,0		672,9 $\pm$ 36,1
30	642,9 $\pm$ 10,7		643,3 $\pm$ 23,6
40	649,5 $\pm$ 27,5		645,8 $\pm$ 31,4
THR (ms)			
Tempo (min)	Controle		MP
0	458,4 $\pm$ 15,9	#	629,4 $\pm$ 54,8
10	438,4 $\pm$ 19,1	#	635,1 $\pm$ 57,6
20	426,2 $\pm$ 22,3	#	626,3 $\pm$ 55,9
30	426,4 $\pm$ 26,1	#	628,6 $\pm$ 55,4
40	418,6 $\pm$ 27,6	#	629,8 $\pm$ 58,7



**Figura 17-** Efeito do tempo de exposição (40 minutos) nos tempos para o pico de tensão (TPT) e no tempo para 50% de relaxamento (THR) de tiras ventriculares de matrizã, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10). **A:** Valores absolutos (TPT e THR - ms); **B:** Valores normalizados (TPT e THR - % dos valores iniciais). Valores médios + 1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.

#### 4.3.2. Aumento da Concentração de Cálcio Extracelular.

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle e exposto ao MP de *B. cephalus*, quando submetidos a incrementos sucessivos na concentração de cálcio no meio extracelular, são apresentados na Tabela 9 e representados graficamente na Figura 18.

A análise dos dados revela que a elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no banho fisiológico provocou um efeito inotrópico positivo nas tiras ventriculares de *B. cephalus*, a partir da concentração de 7,5 mM para o grupo controle e a partir de 9,5 mM para o grupo exposto ao MP, entretanto a análise dos dados normalizados indica que a elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  implicou em aumentos da  $F_c$  a partir do primeiro incremento (3,5 mM) para o grupo controle e 5,5 mM para o grupo exposto ao MP.

Apesar da tendência observada de aumentos sucessivos na  $F_c$  após os demais incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , a análise estatística indica que, apesar de diferentes em relação aos valores iniciais, os respectivos valores não são significativamente distintos dos valores observados nas concentrações extracelulares de 7,5 e 9,5 mM para os grupos controle e exposto ao MP, respectivamente. Na concentração mais elevada de cálcio (19,5 mM), a  $F_c$  média das tiras ventriculares atingiu um valor aproximadamente 2,3 vezes superior ao inicial, nos dois grupos experimentais.

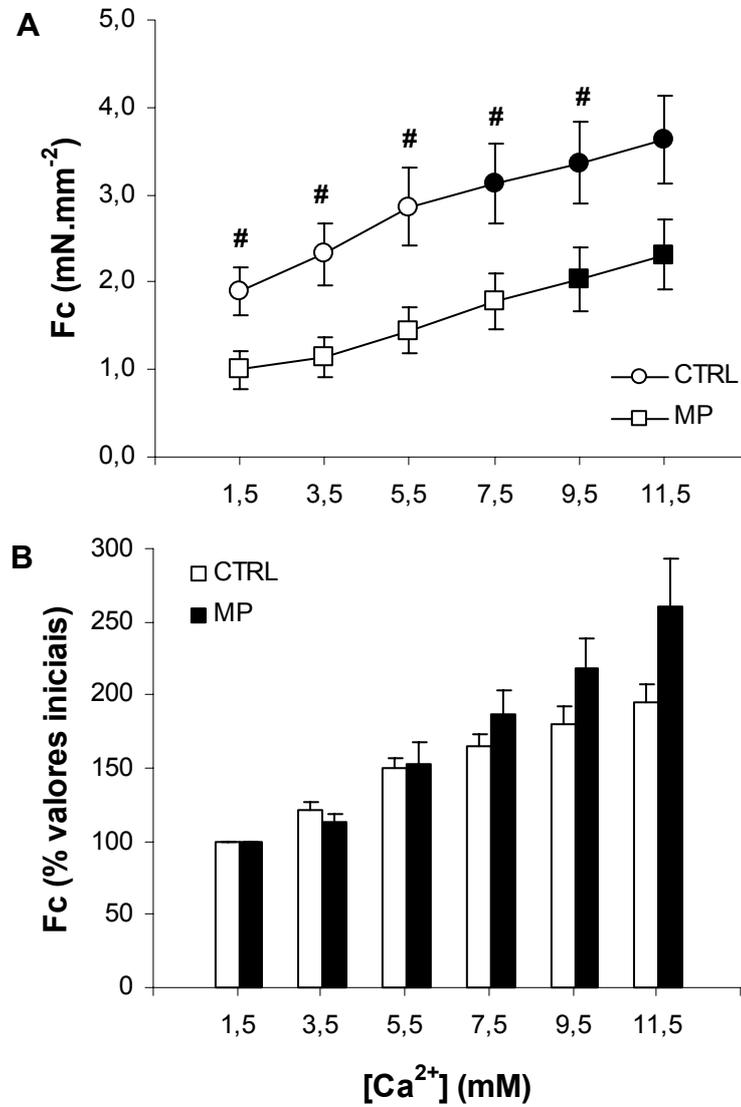
A Tabela 10 apresenta os valores médios do tempo para o pico máximo de tensão (TPT – Time to Peak tension) e do tempo para 50% de relaxamento (THR – Time to Half Relaxation) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *B. cephalus* quando submetidas à elevação gradual da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esses valores encontram-se representados graficamente nas figuras 19 e 20.

A análise estatística revela que, durante as elevações da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , os valores de TPT não sofreram alterações significativas (Figura 19). Os valores de THR obtidos em todas as concentrações extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  seguiram a mesma tendência apresentada pelos valores de TPT, não sendo observadas alterações significativas deste parâmetro (Figura 20).

Normalizando-se os valores de TPT e THR (% dos valores iniciais), observou-se ainda que não houve diferença significativa entre esses dois parâmetros em nenhuma das concentrações extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  para nenhum dos grupos experimentais, indicando que a elevação na concentração extracelular de este íon não agiu diferentemente sobre os tempos de contração e relaxamento cardíacos, nestas condições experimentais (Figura 21).

**Tabela 9-** Valores da força de contração ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelo músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

[ $\text{Ca}^{2+}$ ] (mM)	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )		
	Controle		MP
1,5	1,9 $\pm$ 0,3	#	1,0 $\pm$ 0,2
3,5	2,3 $\pm$ 0,3	#	1,4 $\pm$ 0,2
5,5	2,9 $\pm$ 0,5	#	1,4 $\pm$ 0,3
7,5	<b>3,1 <math>\pm</math> 0,5</b>	#	1,8 $\pm$ 0,3
9,5	<b>3,4 <math>\pm</math> 0,5</b>	#	<b>2,0 <math>\pm</math> 0,4</b>
11,5	<b>3,6 <math>\pm</math> 0,5</b>		<b>2,3 <math>\pm</math> 0,4</b>



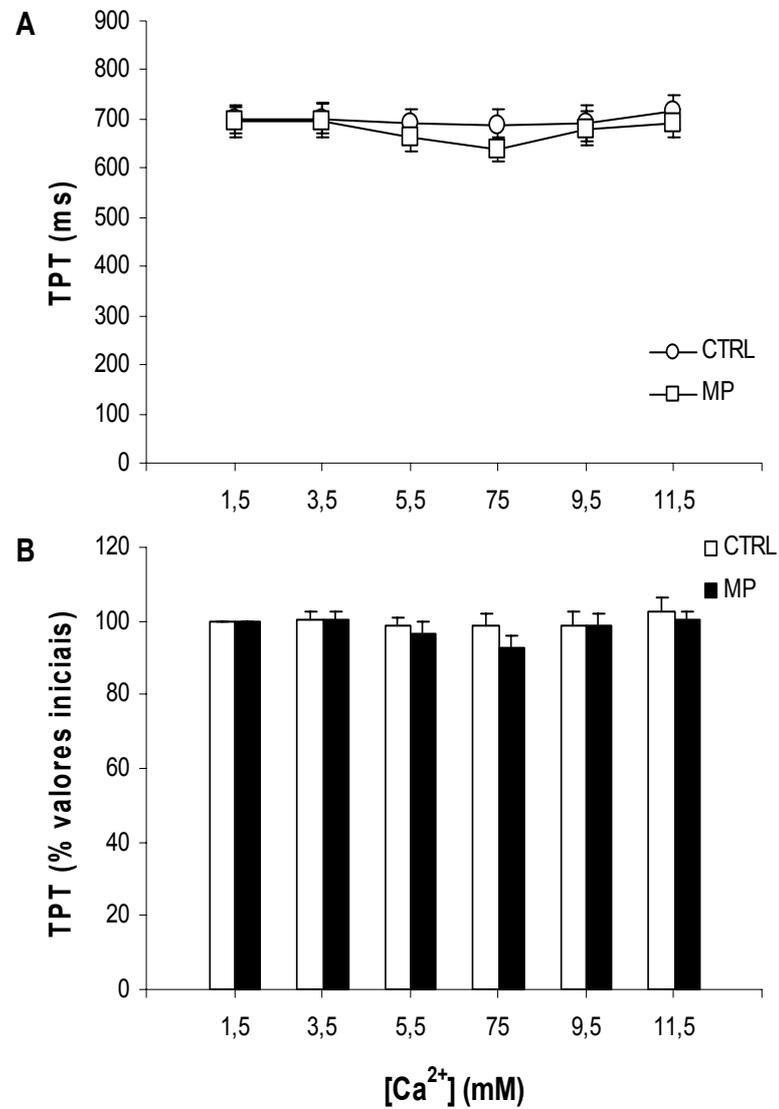
**Figura 18-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a força de contração (Fc) de tiras ventriculares de matrizã dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ). **A:** Valores absolutos ( $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ); **B:** Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 10-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão e tempo para 50% de relaxamento (TPT e THR - ms) desenvolvidos pelo músculo cardíaco isolado dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de *B. cephalus*, em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais.

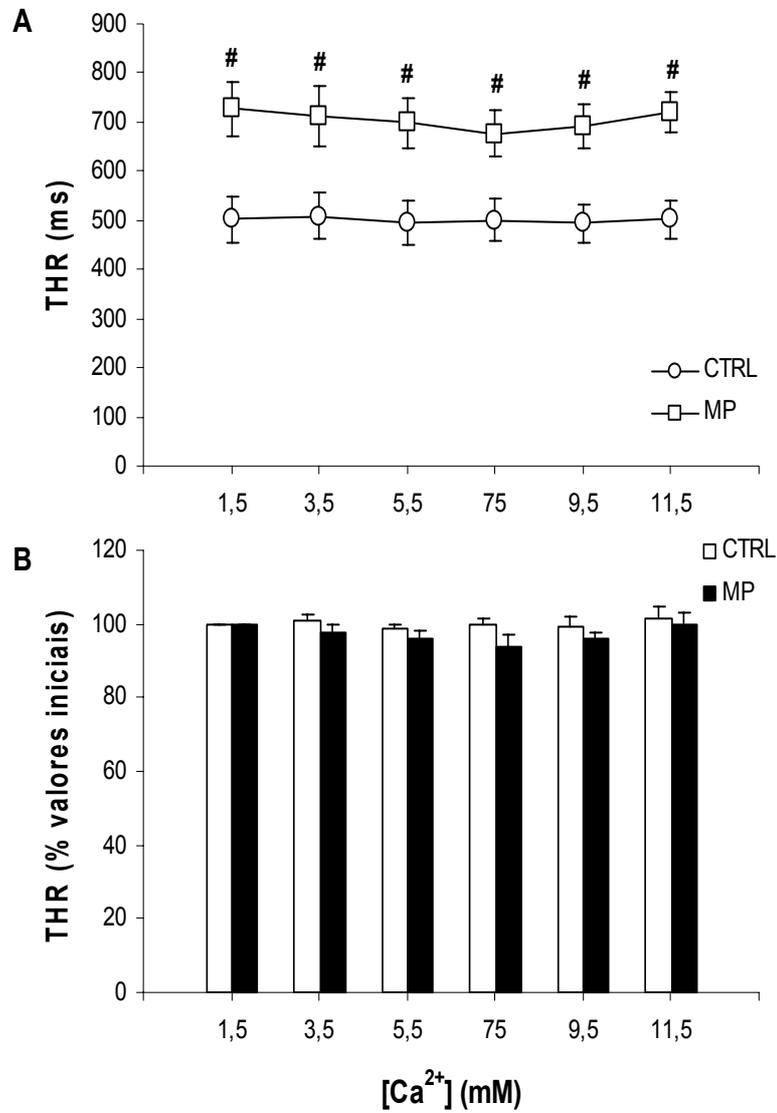
TPT (ms)			
[Ca <sup>2+</sup> ] (mM)	Controle		MP
1,5	700,0 $\pm$ 27,8		693,5 $\pm$ 31,6
3,5	700,9 $\pm$ 31,6		696,5 $\pm$ 35,2
5,5	690,3 $\pm$ 30,9		664,4 $\pm$ 30,5
7,5	688,8 $\pm$ 31,5		638,3 $\pm$ 25,7
9,5	691,3 $\pm$ 36,3		680,3 $\pm$ 35,6
11,5	714,6 $\pm$ 34,2		690,5 $\pm$ 28,0

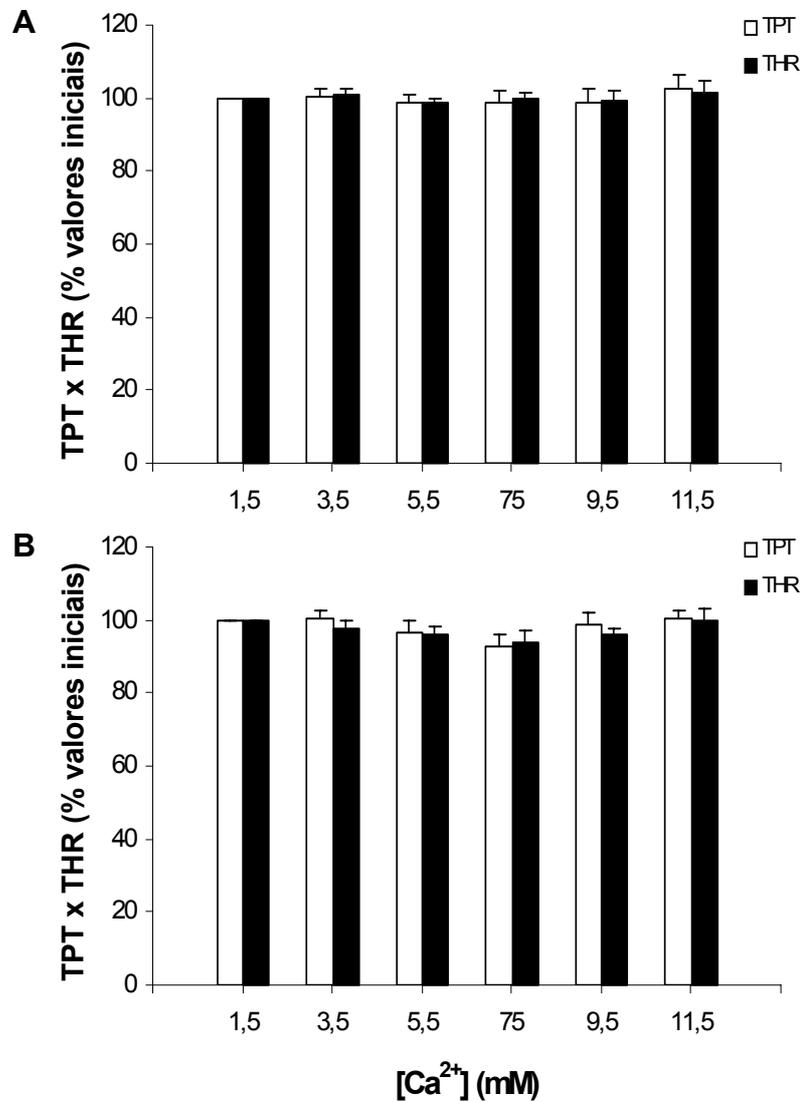
THR (ms)			
[Ca <sup>2+</sup> ] (mM)	Controle		MP
1,5	502,8 $\pm$ 47,0	#	726,1 $\pm$ 54,7
3,5	508,2 $\pm$ 47,4	#	711,5 $\pm$ 61,8
5,5	495,4 $\pm$ 44,2	#	697,5 $\pm$ 52,3
7,5	499,8 $\pm$ 43,5	#	676,8 $\pm$ 47,6
9,5	494,4 $\pm$ 38,8	#	692,3 $\pm$ 43,9
11,5	502,1 $\pm$ 38,2	#	719,0 $\pm$ 40,0



**Figura 19-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre o tempo para o pico de tensão (TPT) de tiras ventriculares dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de matrinxã. **A:** Valores absolutos (ms); **B:** Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.



**Figura 20-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  sobre o tempo para 50% de relaxamento (THR) de tiras ventriculares dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de matrixinã. **A:** Valores absolutos (ms); **B:** Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).



**Figura 21-** Comparação entre os valores normalizados dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares dos grupos controle (A, n = 10) e exposto ao MP (B, n = 10) de matrixã, em resposta à elevação gradual da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ . Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

### **4.3.3. Tensão pós-reposo.**

Os valores médios da força de contração ( $F_c$ ), dados como uma porcentagem dos valores observados na última contração precedente ao período de repouso (% antes do repouso) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de matrinxã em resposta a pausas diastólicas prolongadas variando de 10 a 300 s, são elencados na tabela 11, que apresenta os resultados obtidos na ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. A representação gráfica desses resultados pode ser observada nas figuras 22 e 23.

#### **4.3.3.1. Grupo controle.**

Houve resposta inotrópica positiva na tensão pós-reposo (ou potenciação pós-pausa) do grupo controle em todas as pausas diastólicas utilizadas no experimento. Quando comparados os valores de  $F_c$  pós-reposo e os observados imediatamente antes da pausa, a potenciação máxima foi de 58,8 %, para a maior pausa diastólica (5 min). Após o tratamento com rianodina, contudo, o miocárdio ventricular de *B. cephalus* não apresentou potenciação pós-reposo, retornando aos valores obtidos antes das pausas diastólicas.

#### **4.3.3.2. Grupo exposto ao MP.**

Houve resposta inotrópica positiva na tensão pós-reposo do grupo exposto ao MP, para todas as pausas diastólicas utilizadas. Quando comparados os valores de  $F_c$  pós-reposo e os observados imediatamente antes da pausa, a potenciação máxima foi de 57,9 %. Após o tratamento com rianodina, o miocárdio ventricular de *B. cephalus* não apresentou potenciação pós-reposo, retornando aos valores obtidos antes das pausas diastólicas.

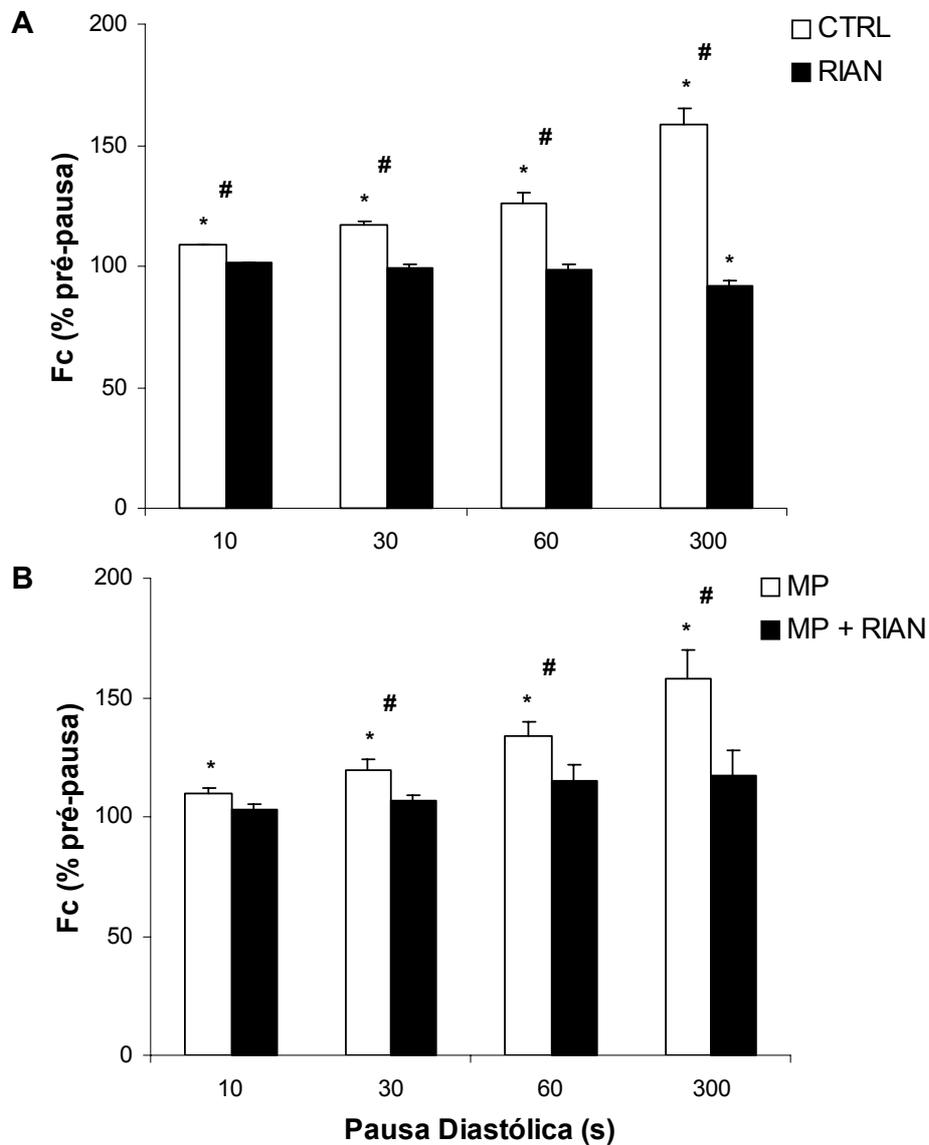
#### **4.3.3.3. Controle x Exposto ao MP.**

A comparação dos efeitos das pausas diastólicas prolongadas sobre a  $F_c$  das tiras ventriculares de matrinxã, na presença e ausência de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina revela que não houve diferença significativa nas potenciações pós-pausa entre o grupo controle e o grupo exposto ao MP, em nenhuma das pausas diastólicas utilizadas.

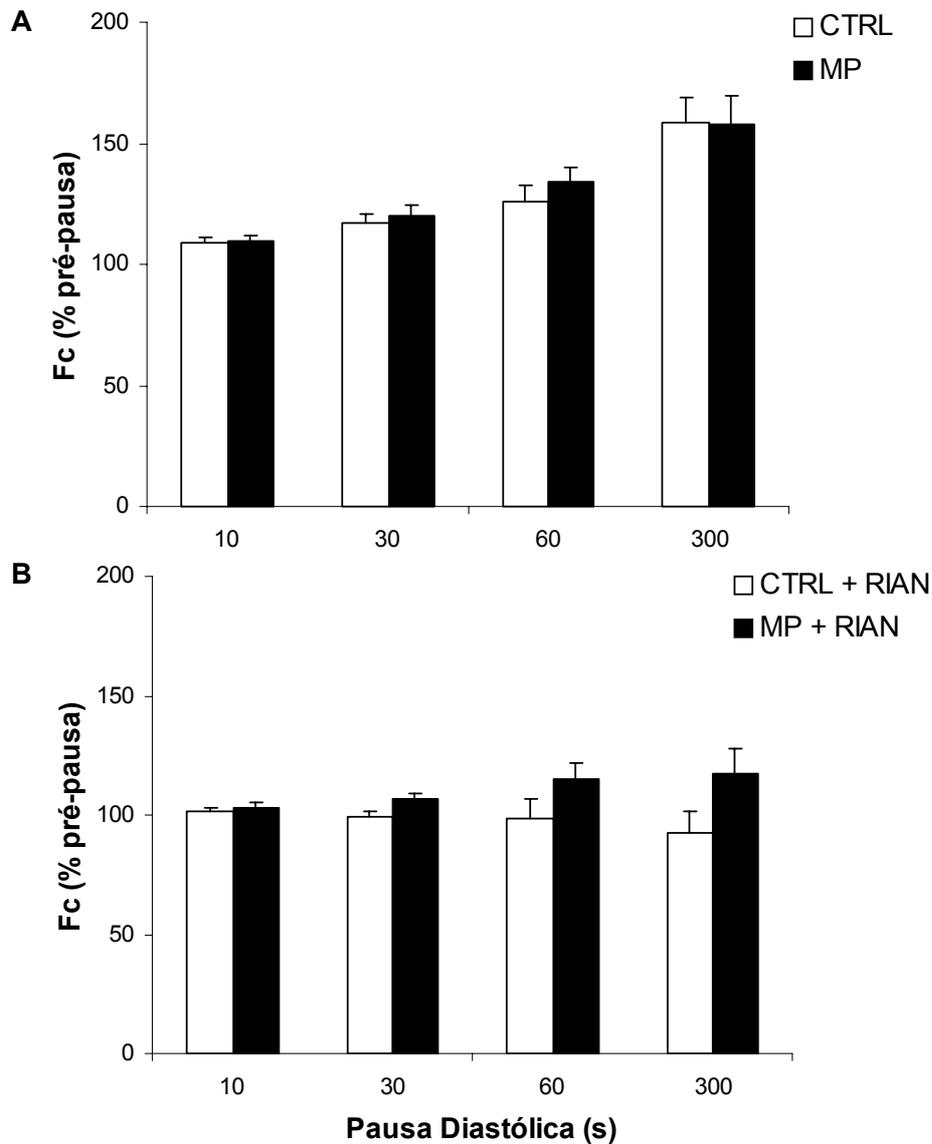
Quando tratadas com rianodina, a  $F_c$  das tiras ventriculares de ambos os grupos experimentais retornaram aos valores observados anteriormente à pausa diastólica em todas as pausas diastólicas utilizadas.

**Tabela 11-** Valores da Tensão pós-repouso (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *B. cephalus* dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) registrados na primeira contração após períodos crescentes de repouso (% antes do repouso) em preparações não tratadas e tratadas com 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa diastólica. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).

Tensão Pós-Repouso (Fc)				
	Pausa Diastólica (s)	0 rianodina (%)		10 $\mu$ M rianodina (%)
Controle	10	<b>109,3 <math>\pm</math> 1,9</b>	#	101,6 $\pm$ 1,4
	30	<b>116,8 <math>\pm</math> 4,3</b>	#	99,1 $\pm$ 2,5
	60	<b>125,8 <math>\pm</math> 6,6</b>	#	98,3 $\pm$ 1,7
	300	<b>158,8 <math>\pm</math> 9,9</b>	#	92,2 $\pm$ 3,9
MP	10	<b>109,7 <math>\pm</math> 2,3</b>		103,2 $\pm$ 2,0
	30	<b>119,8 <math>\pm</math> 4,4</b>	#	106,7 $\pm$ 2,1
	60	<b>133,7 <math>\pm</math> 6,2</b>	#	115,1 $\pm$ 7,0
	300	<b>157,9 <math>\pm</math> 11,6</b>	#	117,3 $\pm$ 10,3



**Figura 22-** Valores da força de contração (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas crescentes de tiras ventriculares dos grupos controle (**A**: n = 10) e exposto ao MP (**B**: n = 10) de *B. cephalus*, na ausência e na presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa em relação aos valores obtidos antes da pausa; #: diferença significativa entre as preparações controle e tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).



**Figura 23-** Valores da força de contração (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas crescentes de tiras ventriculares dos grupos controle (**A**: n = 10) e exposto ao MP (**B**: n = 10) de *B. cephalus*, na ausência e na presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

#### 4.3.4. Aumento da frequência de estimulação (Relação Força-freqüência).

##### 4.3.4.1. Relação força-freqüência sem rianodina.

A Tabela 12 apresenta os valores médios da força de contração ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, sujeitos a incrementos na frequência de estimulação (bpm) até que os registros se tornassem irregulares. Esses valores encontram-se representados graficamente na Figura 24, que revela que, para o grupo controle, houve uma redução significativa da força de contração ( $F_c$ ) em relação aos valores iniciais (12 bpm), a partir da frequência de estimulação de 48 bpm. Acima de 48 bpm ocorreu uma diminuição progressiva da  $F_c$ , cujo valor mínimo observado foi de  $0,3 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ , na frequência de 120 bpm, frequência acima da qual os registros tornaram-se irregulares. Para o grupo exposto ao MP, a redução da  $F_c$  ocorreu a partir da frequência de 36 bpm, atingindo o valor mínimo de  $0,2 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na frequência de 108 bpm, a máxima atingida por este grupo experimental.

A análise dos dados normalizados indica que os aumentos progressivos na frequência de estimulação não interferem na  $F_c$  diferentemente entre o grupo controle e exposto ao MP.

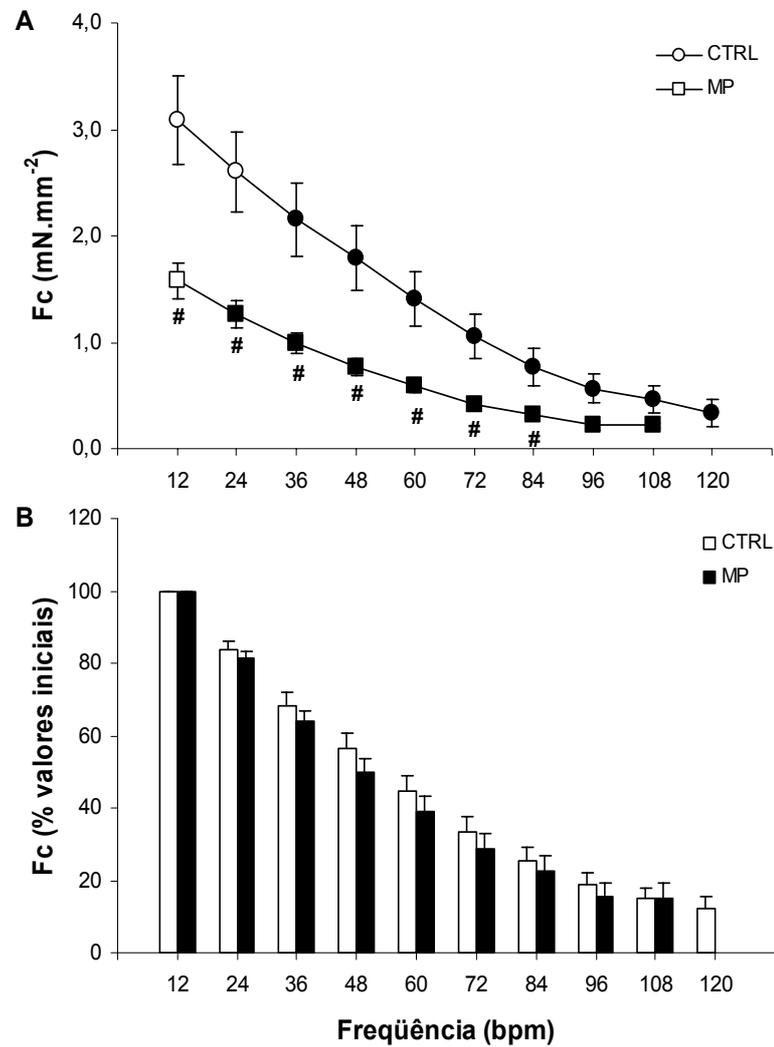
Os valores médios do tempo para o pico máximo de tensão (TPT – Time to Peak Tension) e tempo para 50% de relaxamento (THR – Time to Half Relaxation) desenvolvidos pelo músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, quando submetidas a incrementos na frequência de estimulação são apresentados nas Tabelas 13 e 14. Esses dados estão representados graficamente nas figuras 25 e 26.

Os valores de TPT obtidos em todas as frequências de estimulação foram significativamente inferiores aos valores iniciais (12 bpm) para ambos os grupos experimentais, chegando ao valor mínimo de 246 ms na frequência de 120 bpm, para o grupo controle e 269 ms para o grupo exposto ao MP, na frequência de 108 bpm.

Os valores obtidos para o THR foram significativamente inferiores aos valores iniciais (12 bpm), a partir da frequência de 36 bpm para o grupo controle, chegando ao valor mínimo de 136 ms na frequência de 120 bpm. No grupo exposto ao MP, os valores foram significativamente inferiores aos valores iniciais a partir de 24 bpm, chegando ao valor mínimo de 156 ms, aos 108 bpm.

**Tabela 12-** Valores da força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus* em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

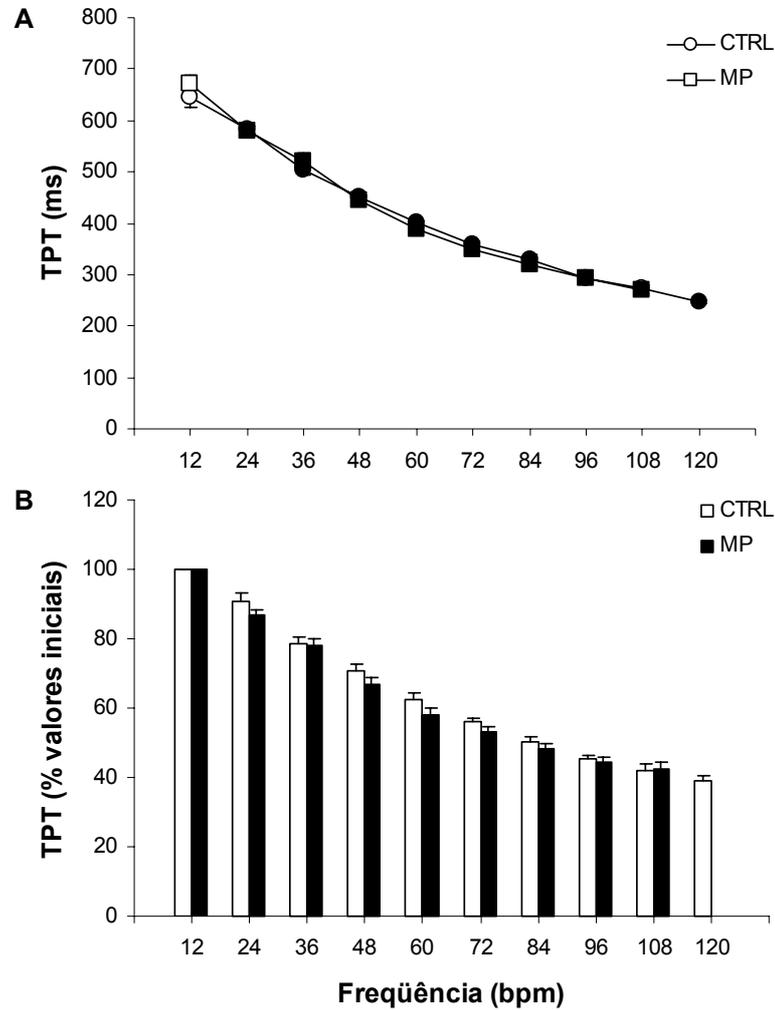
<b>Fc (<math>\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}</math>)</b>			
<b>Frequência (bpm)</b>	<b>Controle</b>		<b>MP</b>
12	3,1 $\pm$ 0,4	<b>#</b>	1,6 $\pm$ 0,2
24	2,6 $\pm$ 0,4	<b>#</b>	1,3 $\pm$ 0,1
36	2,2 $\pm$ 0,3	<b>#</b>	<b>1,0 <math>\pm</math> 0,1</b>
48	<b>1,8 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>#</b>	<b>0,8 <math>\pm</math> 0,1</b>
60	<b>1,4 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>#</b>	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,1</b>
72	<b>1,1 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>#</b>	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>
84	<b>0,8 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>#</b>	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>
96	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>#</b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,0</b>
108	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,1</b>		<b>0,2 <math>\pm</math> 0,0</b>
120	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>		



**Figura 24-** Efeito do aumento da freqüência de estimulação sobre a força de contração (Fc – **A**: mN.mm<sup>-2</sup>; **B**: % dos valores iniciais) dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de tiras ventriculares de matrinxã. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

**Tabela 13-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão (TPT - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de *B. cephalus* em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

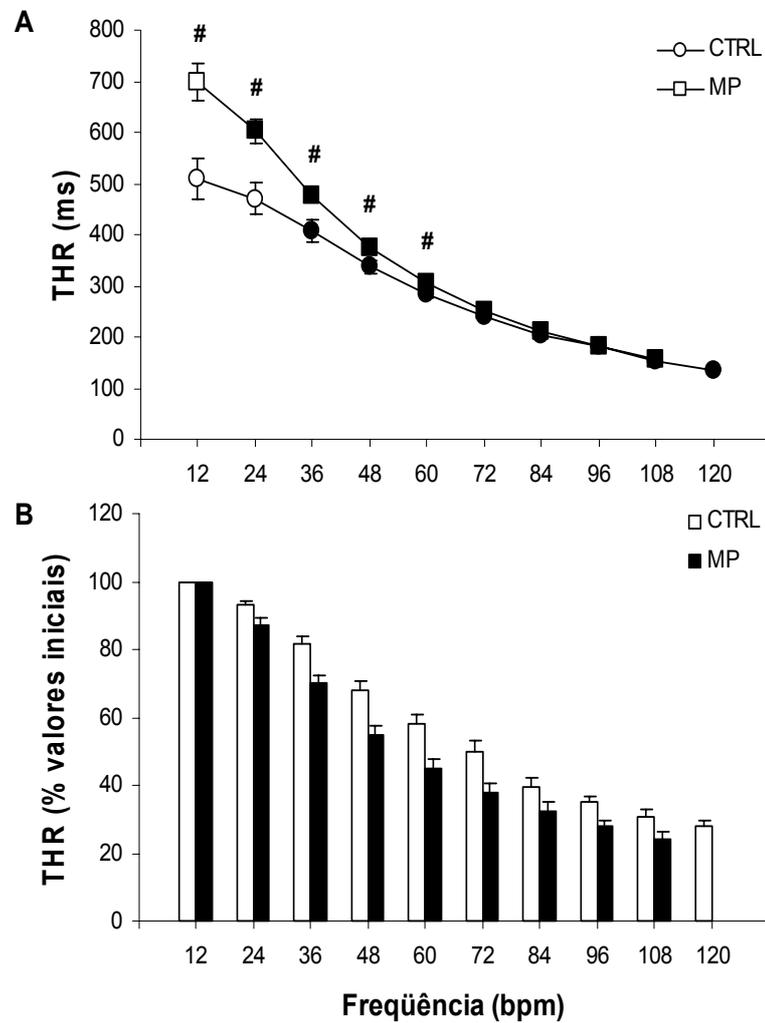
TPT (ms)		
Frequência (bpm)	Controle	MP
12	644,1 $\pm$ 17,6	670,9 $\pm$ 18,5
24	<b>582,3 <math>\pm</math> 7,5</b>	<b>578,6 <math>\pm</math> 9,5</b>
36	<b>502,3 <math>\pm</math> 9,2</b>	<b>521,4 <math>\pm</math> 16,3</b>
48	<b>451,4 <math>\pm</math> 4,0</b>	<b>445,7 <math>\pm</math> 5,3</b>
60	<b>400,4 <math>\pm</math> 4,3</b>	<b>388,2 <math>\pm</math> 4,3</b>
72	<b>357,8 <math>\pm</math> 2,9</b>	<b>349,8 <math>\pm</math> 4,2</b>
84	<b>328,4 <math>\pm</math> 10,2</b>	<b>318,6 <math>\pm</math> 4,5</b>
96	<b>293,5 <math>\pm</math> 3,9</b>	<b>292,8 <math>\pm</math> 4,2</b>
108	<b>272,1 <math>\pm</math> 8,1</b>	<b>269,0 <math>\pm</math> 9,4</b>
120	<b>245,9 <math>\pm</math> 2,6</b>	



**Figura 25-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão (TPT – **A**: ms; **B**: % dos valores iniciais) dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de tiras ventriculares de matrizã. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 14-** Valores para o tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de *B. cephalus* em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

THR (ms)			
Frequência (bpm)	Controle		MP
12	508,6 $\pm$ 39,2	#	697,7 $\pm$ 37,1
24	470,7 $\pm$ 32,0	#	<b>601,8 <math>\pm</math> 22,2</b>
36	<b>408,7 <math>\pm</math> 21,5</b>	#	<b>478,1 <math>\pm</math> 12,0</b>
48	<b>337,7 <math>\pm</math> 12,9</b>	#	<b>373,8 <math>\pm</math> 6,0</b>
60	<b>283,6 <math>\pm</math> 7,0</b>	#	<b>305,1 <math>\pm</math> 3,4</b>
72	<b>241,6 <math>\pm</math> 4,4</b>		<b>251,9 <math>\pm</math> 3,5</b>
84	<b>203,0 <math>\pm</math> 2,9</b>		<b>212,6 <math>\pm</math> 5,6</b>
96	<b>180,3 <math>\pm</math> 1,9</b>		<b>182,6 <math>\pm</math> 3,2</b>
108	<b>153,9 <math>\pm</math> 2,2</b>		<b>156,4 <math>\pm</math> 2,5</b>
120	<b>136,2 <math>\pm</math> 3,4</b>		



**Figura 26-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para 50% de relaxamento (THR – **A**: ms; **B**: % dos valores iniciais) dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de tiras ventriculares de matrizã. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4.2. Relação força-freqüência com rianodina.

A Tabela 15 apresenta os valores médios da força de contração ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus* na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina, sujeito a incrementos na freqüência de estimulação (bpm) até que os registros se tornassem irregulares.

Esses valores encontram-se representados graficamente na Figura 27, que revela que houve uma redução significativa da  $F_c$  em relação aos valores iniciais (12 bpm) a partir da freqüência de estimulação de 48 bpm no grupo controle, atingindo o valor mínimo de  $0,2 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na freqüência de 108 bpm, freqüência máxima atingida, a partir da qual os registros se tornaram irregulares. No grupo exposto ao MP a  $F_c$  também foi significativamente inferior aos valores iniciais a partir da freqüência de 48 bpm, atingindo o valor mínimo de  $0,1 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na freqüência de 96 bpm, a máxima alcançada neste grupo experimental.

O efeito do aumento da freqüência de estimulação sobre os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) das tiras ventriculares de *B. cephalus*, na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina, estão representados nas Tabelas 16 e 17, e apresentados graficamente nas Figuras 28 e 29.

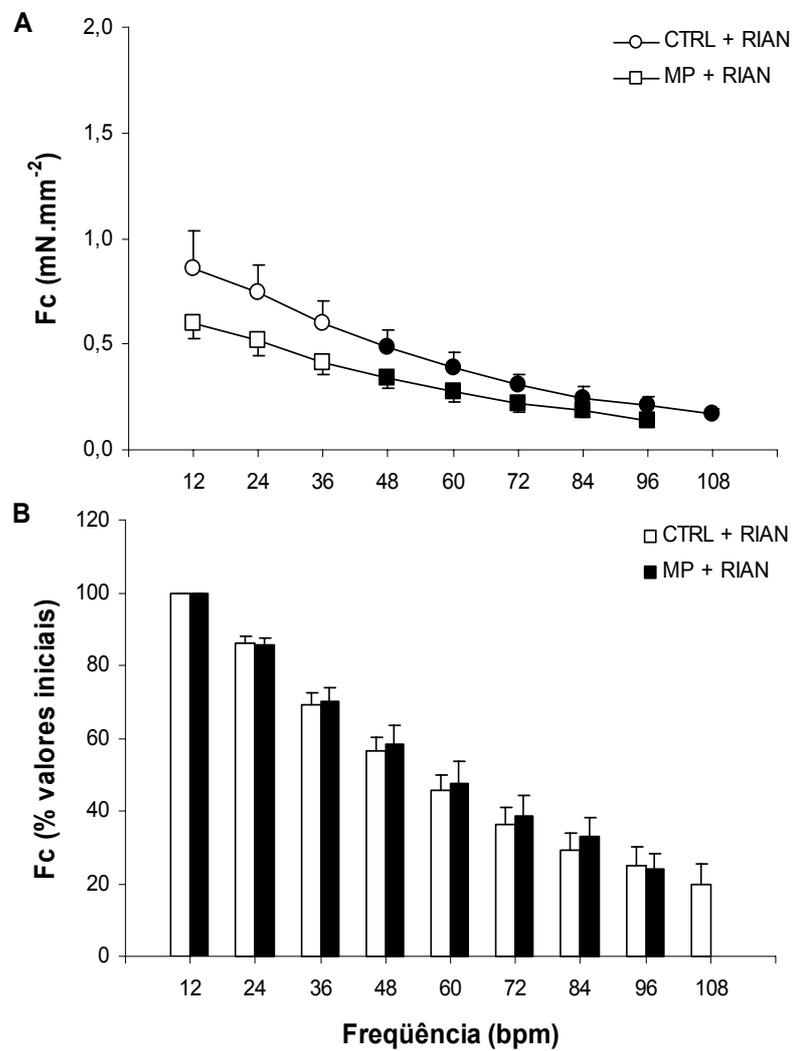
Os valores de TPT obtidos em todas as freqüências de estimulação foram significativamente inferiores aos valores iniciais (12 bpm), chegando aos valores mínimos de  $257,4 \pm 21,3$  ms na freqüência de 108 bpm, para o grupo controle e  $281,9 \pm 3,1$  ms na freqüência de 96 bpm, para o grupo exposto ao MP.

Os valores obtidos para o THR foram significativamente inferiores aos valores iniciais (12 bpm) em todas as freqüências de estimulação, chegando aos valores mínimos de  $171,2 \pm 16,1$  ms no grupo controle e  $180,4 \pm 2,6$  ms no grupo exposto ao MP.

A análise estatística dos dados normalizados de  $F_c$ , TPT e THR (% valores iniciais) não aponta quaisquer diferenças significativas entre os grupos controle e exposto ao MP em nenhuma das freqüências de estimulação utilizadas.

**Tabela 15-** Valores da força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de *B. cephalus*, na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina, em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

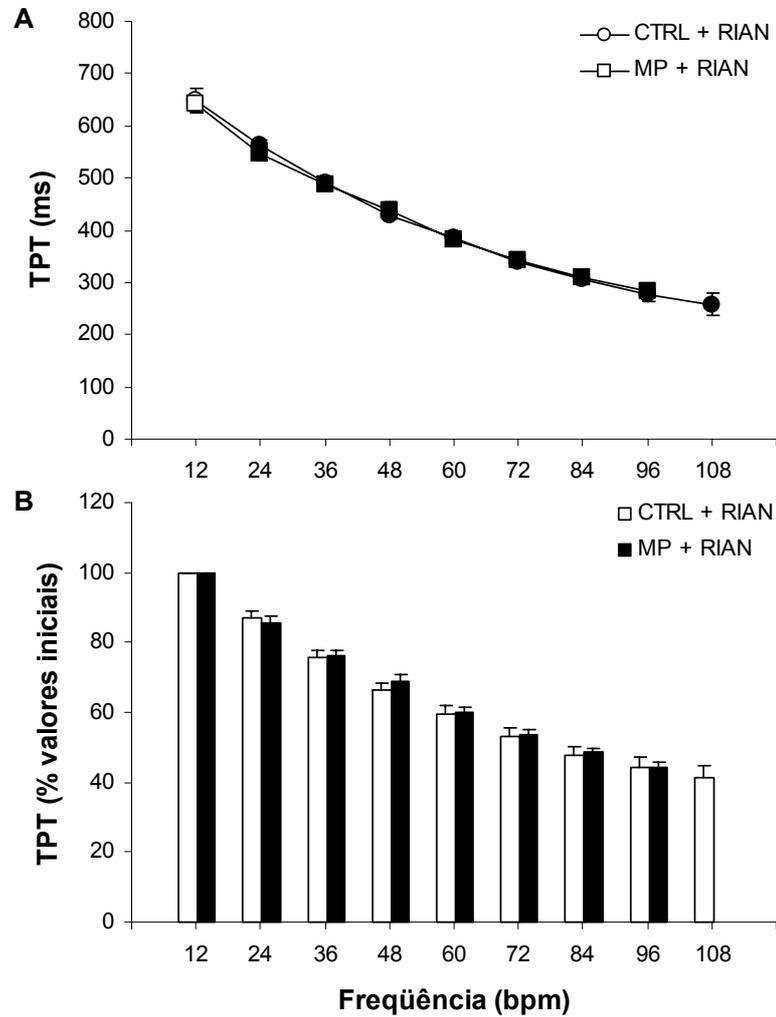
Frequência (bpm)	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	
	Controle	MP
12	0,9 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
24	0,7 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
36	0,6 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
48	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>
60	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,0</b>
72	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,0</b>
84	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,0</b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,0</b>
96	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,0</b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,0</b>
108	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,0</b>	



**Figura 27-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração ( $F_c$  – **A**:  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ; **B**: % dos valores iniciais) dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de tiras ventriculares de matrixã, na presença de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 16-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão (TPT - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de *B. cephalus*, na presença de 10  $\mu$ M de rianodina, em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

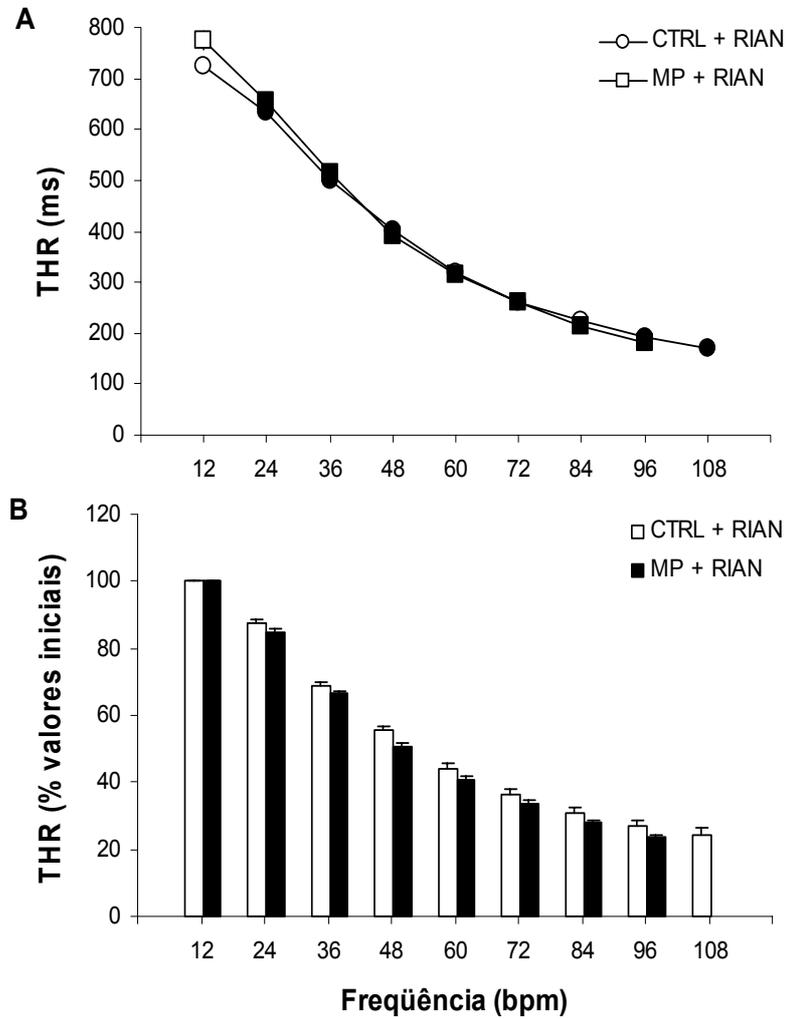
TPT (ms)		
Frequência (bpm)	Controle	MP
12	649,3 $\pm$ 22,9	640,8 $\pm$ 15,9
24	<b>561,9 <math>\pm</math> 11,6</b>	<b>547,6 <math>\pm</math> 14,8</b>
36	<b>489,0 <math>\pm</math> 7,9</b>	<b>486,2 <math>\pm</math> 8,9</b>
48	<b>427,9 <math>\pm</math> 7,5</b>	<b>439,5 <math>\pm</math> 14,2</b>
60	<b>383,9 <math>\pm</math> 8,5</b>	<b>383,4 <math>\pm</math> 8,1</b>
72	<b>339,8 <math>\pm</math> 10,9</b>	<b>341,2 <math>\pm</math> 6,0</b>
84	<b>306,1 <math>\pm</math> 11,2</b>	<b>310,3 <math>\pm</math> 5,0</b>
96	<b>274,9 <math>\pm</math> 13,1</b>	<b>281,9 <math>\pm</math> 3,1</b>
108	<b>257,4 <math>\pm</math> 21,3</b>	



**Figura 28-** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão (TPT – **A**: ms; **B**: % dos valores iniciais) dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de tiras ventriculares de matrizã, na presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 17-** Valores para o tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) do músculo cardíaco isolado dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de *B. cephalus*, na presença de 10  $\mu$ M de rianodina, em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os valores em negrito representam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

THR (ms)		
Frequência (bpm)	Controle	MP
12	724,9 $\pm$ 12,4	774,9 $\pm$ 16,7
24	<b>635,2 <math>\pm</math> 12,0</b>	<b>655,0 <math>\pm</math> 10,5</b>
36	<b>498,8 <math>\pm</math> 4,4</b>	<b>514,5 <math>\pm</math> 9,4</b>
48	<b>400,6 <math>\pm</math> 8,9</b>	<b>391,8 <math>\pm</math> 5,2</b>
60	<b>317,3 <math>\pm</math> 10,4</b>	<b>316,1 <math>\pm</math> 4,3</b>
72	<b>262,3 <math>\pm</math> 11,6</b>	<b>261,1 <math>\pm</math> 4,1</b>
84	<b>222,7 <math>\pm</math> 13,4</b>	<b>213,8 <math>\pm</math> 2,6</b>
96	<b>191,5 <math>\pm</math> 14,0</b>	<b>180,4 <math>\pm</math> 2,6</b>
108	<b>171,2 <math>\pm</math> 16,1</b>	



**Figura 29-** Efeito do aumento da freqüência de estimulação sobre o tempo para 50% de relaxamento (THR – **A**: ms; **B**: % dos valores iniciais) dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de tiras ventriculares de matrinxã, na presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4.3. Sem rianodina x Com rianodina.

Uma comparação entre os valores de Fc, TPT e THR desenvolvidos pelo músculo cardíaco isolado dos grupos controle e exposto ao MP de *B. cephalus* em resposta a incrementos na frequência de estimulação, obtidos na ausência e na presença de 10  $\mu$ M de rianodina é mostrada nas tabelas 18, 19, 20, 21, 22 e 23 e representada graficamente nas figuras 30, 31 e 32.

Para o grupo controle, os resultados indicam que a Fc do grupo tratado com rianodina foi menor em todas as frequências de estimulação até 84 bpm, frequência abaixo da qual não houve diferença significativa entre os tratamentos (0 rianodina x 10  $\mu$ M rianodina). No grupo exposto ao MP, a Fc apresentada pelas tiras ventriculares tratadas com rianodina foi significativamente inferior àquelas na condição controle em todas as frequências de estimulação utilizadas.

A análise estatística revela que não ocorreu diferença significativa entre os valores de TPT em nenhuma das frequências de estimulação testadas entre as tiras ventriculares tratadas com rianodina e as não tratadas, em ambos os grupos experimentais.

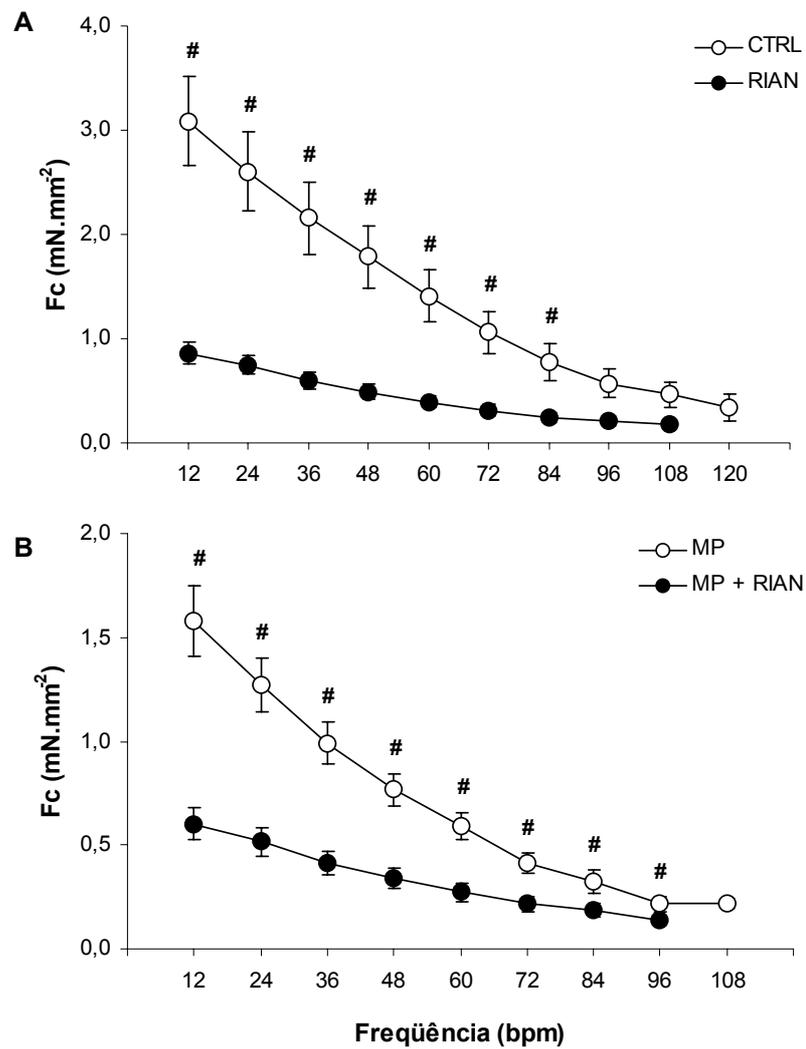
Ao contrário de TPT, os resultados mostram que THR foi significativamente maior no grupo tratado com rianodina, em ambos os grupos experimentais, sendo que no grupo controle a diferença se manteve até a frequência de 60 bpm e no grupo exposto ao MP até 48 bpm.

**Tabela 18-** Comparação entre os valores da força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado do grupo controle de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).

Frequência (bpm)	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )		
	0 rianodina	#	10 $\mu\text{M}$ rianodina
12	3,1 $\pm$ 0,4	#	0,9 $\pm$ 0,1
24	2,6 $\pm$ 0,4	#	0,7 $\pm$ 0,1
36	2,2 $\pm$ 0,3	#	0,6 $\pm$ 0,1
48	1,8 $\pm$ 0,3	#	0,5 $\pm$ 0,1
60	1,4 $\pm$ 0,3	#	0,4 $\pm$ 0,1
72	1,1 $\pm$ 0,2	#	0,3 $\pm$ 0,1
84	0,8 $\pm$ 0,2	#	0,2 $\pm$ 0,0
96	0,6 $\pm$ 0,1		0,2 $\pm$ 0,0
108	0,5 $\pm$ 0,1		0,2 $\pm$ 0,0
120	0,3 $\pm$ 0,1		

**Tabela 19-** Comparação entre os valores da força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) do músculo cardíaco isolado do grupo exposto ao MP de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, nas ausências ( $n = 10$ ) e na presença ( $n = 10$ ) de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).

Frequência (bpm)	F <sub>c</sub> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )		
	0 rianodina		10 $\mu\text{M}$ rianodina
12	1,6 $\pm$ 0,2	#	0,6 $\pm$ 0,1
24	1,3 $\pm$ 0,1	#	0,5 $\pm$ 0,1
36	1,0 $\pm$ 0,1	#	0,4 $\pm$ 0,1
48	0,8 $\pm$ 0,1	#	0,3 $\pm$ 0,1
60	0,6 $\pm$ 0,1	#	0,3 $\pm$ 0,0
72	0,4 $\pm$ 0,1	#	0,2 $\pm$ 0,0
84	0,3 $\pm$ 0,1	#	0,2 $\pm$ 0,0
96	0,2 $\pm$ 0,0	#	0,1 $\pm$ 0,0
108	0,2 $\pm$ 0,0		



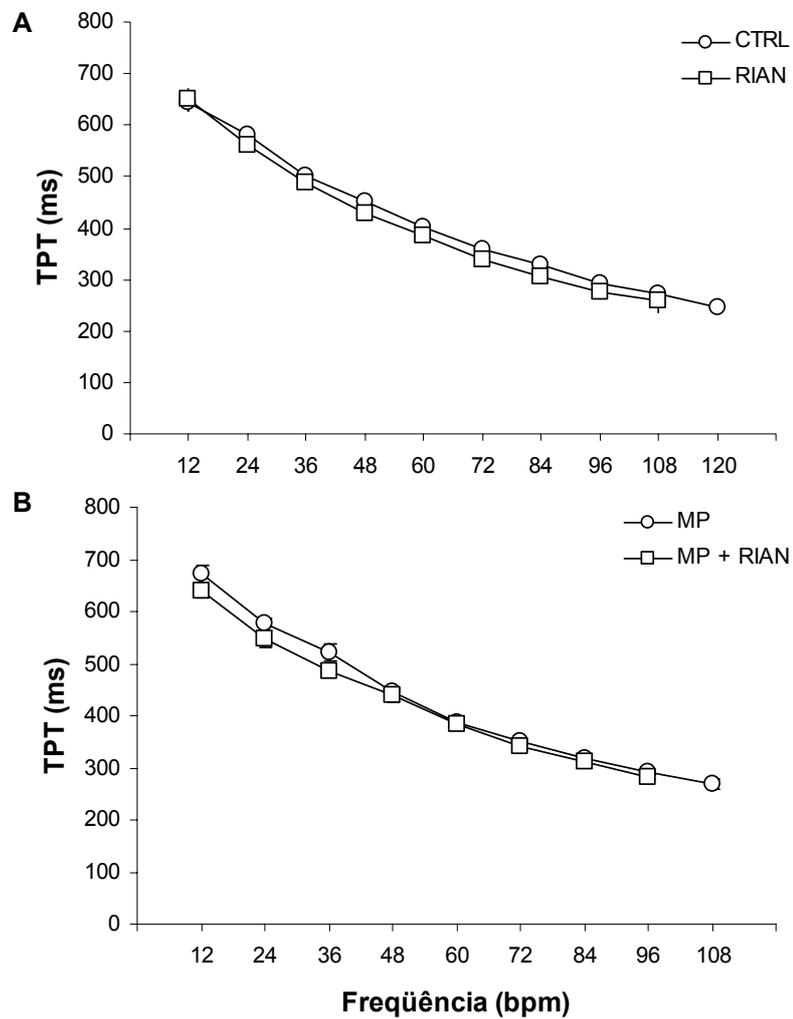
**Figura 30-** Comparação entre os valores de Fc (mN.mm<sup>-2</sup>) de tiras ventriculares de matrinxã, *B. cephalus*, em resposta ao aumento na frequência de estimulação, no grupo controle (**A**: n = 10) e exposto ao MP (**B**: n = 10) na ausência e presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 20-** Comparação entre os valores do tempo para o pico máximo de tensão (TPT – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo controle de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência (n = 10) e na presença (n = 10) de 10 $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

Frequência (bpm)	TPT (ms)	
	0 rianodina	10 $\mu$ M rianodina
12	644,1 $\pm$ 17,6	649,3 $\pm$ 22,9
24	582,3 $\pm$ 7,5	561,9 $\pm$ 11,6
36	502,3 $\pm$ 9,2	489,0 $\pm$ 7,9
48	451,4 $\pm$ 4,0	427,9 $\pm$ 7,5
60	400,4 $\pm$ 4,3	383,9 $\pm$ 8,5
72	357,8 $\pm$ 2,9	339,8 $\pm$ 10,9
84	328,4 $\pm$ 10,2	306,1 $\pm$ 11,2
96	293,5 $\pm$ 3,9	274,9 $\pm$ 13,1
108	272,1 $\pm$ 8,1	257,4 $\pm$ 21,3
120	245,9 $\pm$ 2,6	

**Tabela 21-** Comparação entre os valores do tempo para o pico máximo de tensão (TPT – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo exposto ao MP de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência (n = 10) e na presença (n = 10) de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

Frequência (bpm)	TPT (ms)	
	0 rianodina	10 $\mu$ M rianodina
12	670,9 $\pm$ 18,5	640,8 $\pm$ 15,9
24	578,6 $\pm$ 9,5	547,6 $\pm$ 14,8
36	521,4 $\pm$ 16,3	486,2 $\pm$ 8,9
48	445,7 $\pm$ 5,3	439,5 $\pm$ 14,2
60	388,2 $\pm$ 4,3	383,4 $\pm$ 8,1
72	349,8 $\pm$ 4,2	341,2 $\pm$ 6,0
84	318,6 $\pm$ 4,5	310,3 $\pm$ 5,0
96	292,8 $\pm$ 4,2	281,9 $\pm$ 3,1
108	269,0 $\pm$ 9,4	



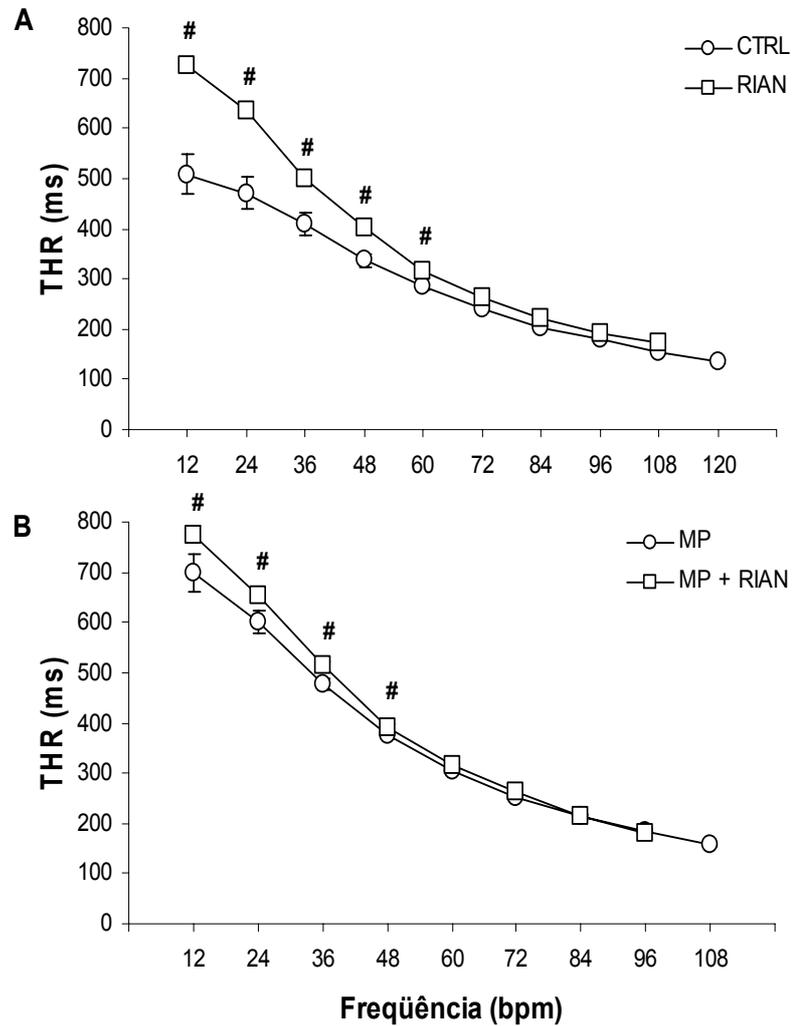
**Figura 31-** Comparação entre os valores de TPT de tiras ventriculares de matrinxã, *B. cephalus*, em resposta ao aumento na freqüência de estimulação, nos grupos controle (**A**: n = 10) e exposto ao MP (**B**: n = 10) na ausência e presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

**Tabela 22-** Comparação entre os valores do tempo para 50 % de relaxamento (THR – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo controle de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência (n = 10) e na presença (n = 10) de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).

Frequência (bpm)	THR (ms)		
	0 rianodina	#	10 $\mu$ M rianodina
12	508,6 $\pm$ 39,2	#	724,9 $\pm$ 12,4
24	470,7 $\pm$ 32,0	#	635,2 $\pm$ 12,0
36	408,7 $\pm$ 21,5	#	498,8 $\pm$ 4,4
48	337,7 $\pm$ 12,9	#	400,6 $\pm$ 8,9
60	283,6 $\pm$ 7,0	#	317,3 $\pm$ 10,4
72	241,6 $\pm$ 4,4		262,3 $\pm$ 11,6
84	203,0 $\pm$ 2,9		222,7 $\pm$ 13,4
96	180,3 $\pm$ 1,9		191,5 $\pm$ 14,0
108	153,9 $\pm$ 2,2		171,2 $\pm$ 16,1
120	136,2 $\pm$ 3,4		

**Tabela 23-** Comparação entre os valores do tempo para 50 % de relaxamento (THR – ms) do músculo cardíaco isolado do grupo exposto ao MP de *B. cephalus*, em resposta a incrementos na frequência de estimulação, na ausência (n = 10) e na presença (n = 10) de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).

Frequência (bpm)	THR (ms)	
	0 rianodina	10 $\mu$ M rianodina
12	697,7 $\pm$ 37,1	# 774,9 $\pm$ 16,7
24	601,8 $\pm$ 22,2	# 655,0 $\pm$ 10,5
36	478,1 $\pm$ 12,0	# 514,5 $\pm$ 9,4
48	373,8 $\pm$ 6,0	# 391,8 $\pm$ 5,2
60	305,1 $\pm$ 3,4	316,1 $\pm$ 4,3
72	251,9 $\pm$ 3,5	261,1 $\pm$ 4,1
84	212,6 $\pm$ 5,6	213,8 $\pm$ 2,6
96	182,6 $\pm$ 3,2	180,4 $\pm$ 2,6
108	156,4 $\pm$ 2,5	



**Figura 32-** Comparação entre os valores de THR de tiras ventriculares de matrinxã, *B. cephalus*, em resposta ao aumento na freqüência de estimulação, nos grupos controle (**A**: n = 10) e exposto ao MP (**B**: n = 10) na ausência e presença de 10  $\mu$ M de rianodina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre as preparações controle e as tratadas com rianodina ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.5. Adição de Adrenalina.

Os valores médios da força de contração ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  e % dos valores iniciais) desenvolvida pelo músculo cardíaco isolado dos grupos controle e exposto ao MP de *B. cephalus*, em resposta à adição de doses crescentes de adrenalina ao meio extracelular são apresentados na Tabela 24 e representados graficamente na Figura 33.

Considerando-se os resultados obtidos, apesar da tendência de elevação apresentada pela  $F_c$  de ambos os grupos experimentais, não foi verificada diferença significativa em relação aos valores iniciais. A análise estatística dos dados normalizados indica uma diferença significativa em relação aos valores iniciais na  $F_c$  do grupo exposto ao MP, a partir da concentração de  $5 \times 10^{-7}$  M de adrenalina e mostra também uma diferença entre a  $F_c$  dos dois grupos experimentais nas concentrações de adrenalina a partir de  $5 \times 10^{-7}$ .

Os valores médios do tempo para o pico máximo de tensão (TPT – Time to Peak Tension) e tempo para 50% de relaxamento (THR – Time to Half Relaxation) desenvolvidos pelas tiras ventriculares dos grupos controle e exposto ao MP de *B. cephalus*., quando submetidas à adição de doses crescentes de adrenalina ao meio extracelular, estão representados na Tabela 25. A Figura 34 apresenta graficamente esses valores.

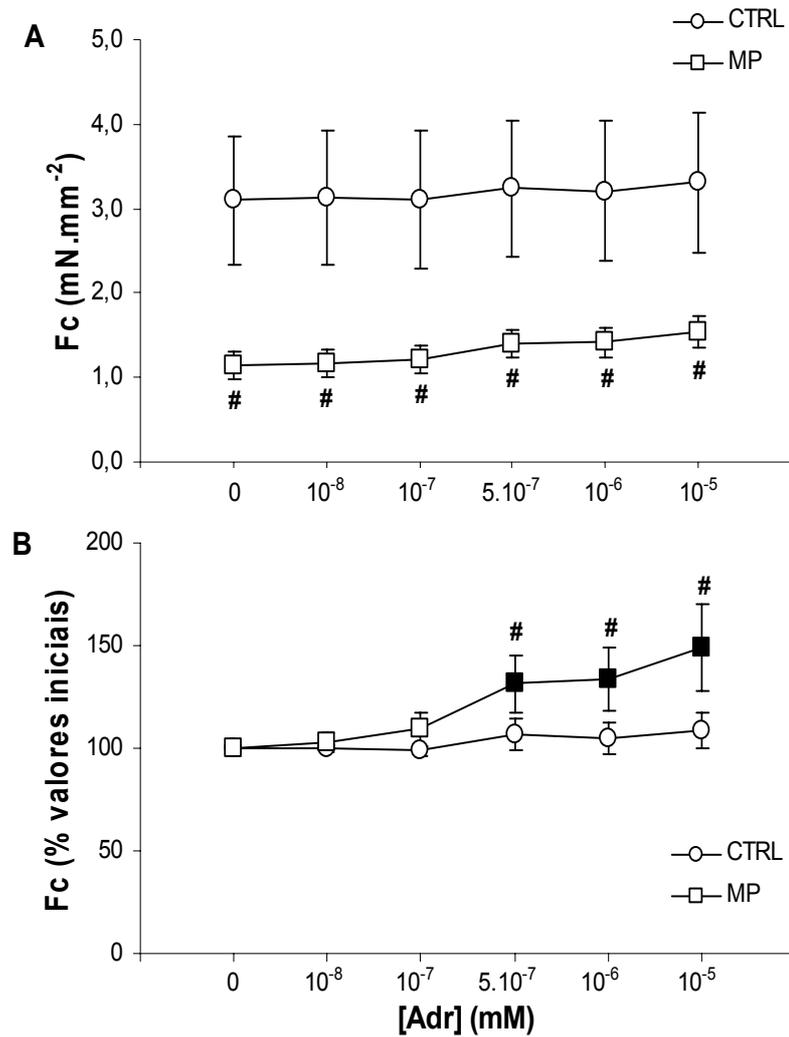
Os valores de TPT e de THR obtidos em todas as concentrações experimentais de adrenalina não apresentaram diferença significativa em relação aos valores iniciais, em nenhum dos grupos experimentais (controle e exposto ao MP).

A análise estatística dos dados revela que os valores obtidos para o THR do grupo exposto ao MP foram significativamente superiores àqueles observados para o grupo controle, em todas as concentrações experimentais de adrenalina.

A comparação entre os dados normalizados de TPT e THR não indica diferença entre os grupos experimentais, sugerindo que a adrenalina não age diferentemente sobre os tempos de contração e relaxamento cardíacos.

**Tabela 24-** Força de contração (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de *B. cephalus*, em resposta à elevação na concentração extracelular de adrenalina. Valores médios ± 1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

[Adr] (mM)	Fc (mN.mm <sup>-2</sup> )		
	Controle	#	MP
0	3,1 ± 0,8	#	1,1 ± 0,2
10 <sup>-8</sup>	3,2 ± 0,8	#	1,2 ± 0,2
10 <sup>-7</sup>	3,1 ± 0,8	#	1,2 ± 0,2
5 x 10 <sup>-7</sup>	3,2 ± 0,8	#	1,4 ± 0,2
10 <sup>-6</sup>	3,2 ± 0,8	#	1,4 ± 0,2
10 <sup>-5</sup>	3,3 ± 0,8	#	1,5 ± 0,2



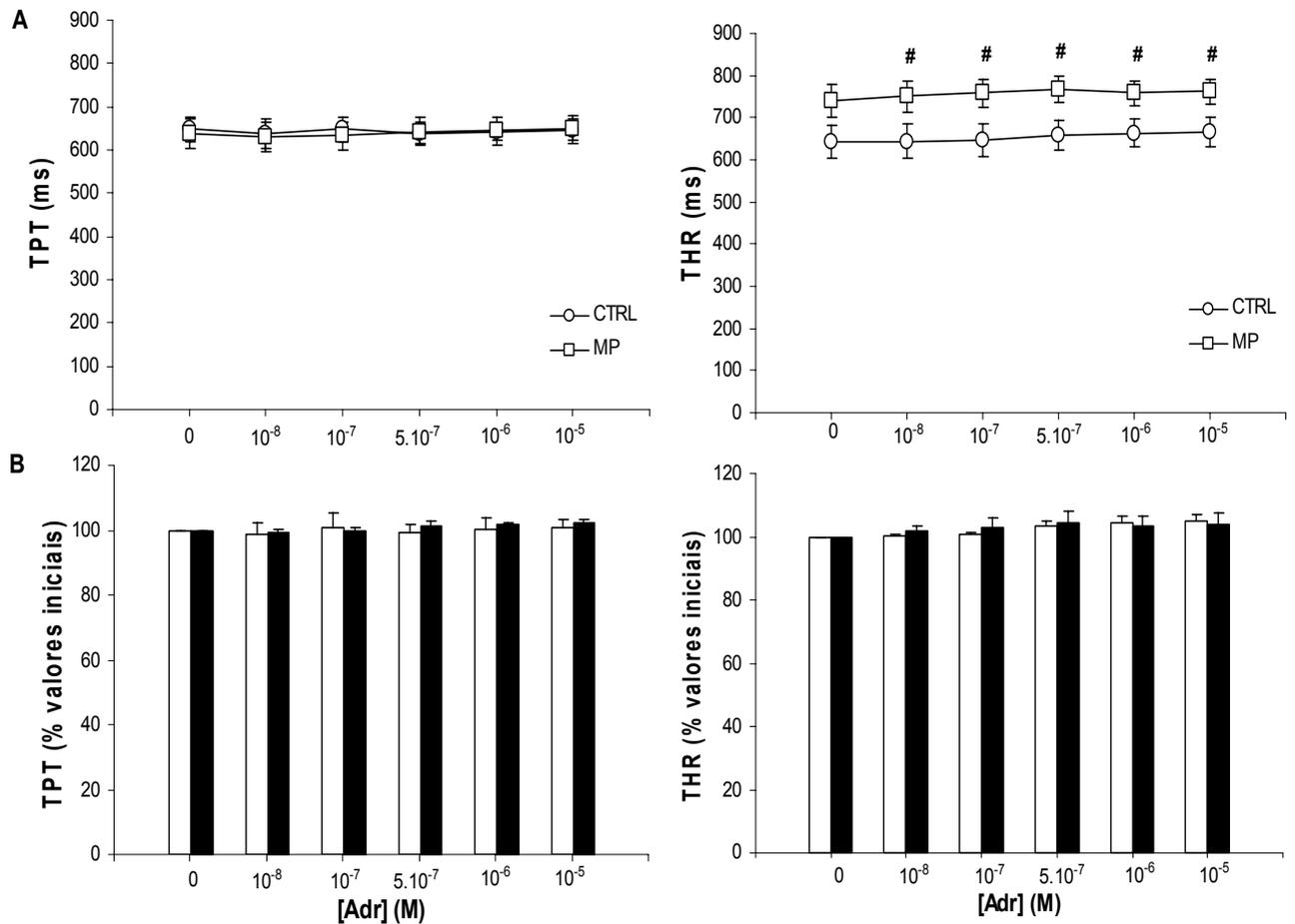
**Figura 33-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de adrenalina sobre a força de contração ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MP ( $n = 10$ ) de matrixinã. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos cheios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais; #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 25-** Valores para o tempo para o pico máximo de tensão e para 50% de relaxamento (TPT e THR - ms) de tiras ventriculares dos grupos controle e exposto ao MP de matrizã em resposta à elevação na concentração extracelular de adrenalina. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

TPT (ms)		
[Adr] (mM)	Controle	MP
0	648,1 $\pm$ 29,5	636,4 $\pm$ 34,3
10 <sup>-8</sup>	637,8 $\pm$ 34,3	631,6 $\pm$ 34,0
10 <sup>-7</sup>	647,5 $\pm$ 28,9	632,5 $\pm$ 32,7
5 x 10 <sup>-7</sup>	639,3 $\pm$ 23,9	643,5 $\pm$ 31,0
10 <sup>-6</sup>	642,6 $\pm$ 19,6	645,1 $\pm$ 32,7
10 <sup>-5</sup>	647,4 $\pm$ 23,6	647,5 $\pm$ 31,0

THR (ms)			
[Adr] (mM)	Controle		MP
0	642,7 $\pm$ 39,5		741,0 $\pm$ 38,2
10 <sup>-8</sup>	644,2 $\pm$ 41,2	#	750,2 $\pm$ 35,3
10 <sup>-7</sup>	646,0 $\pm$ 38,9	#	758,4 $\pm$ 32,4
5 x 10 <sup>-7</sup>	658,3 $\pm$ 35,3	#	768,0 $\pm$ 31,2
10 <sup>-6</sup>	663,5 $\pm$ 33,2	#	757,9 $\pm$ 29,5
10 <sup>-5</sup>	666,1 $\pm$ 33,5	#	762,0 $\pm$ 28,1



**Figura 34-** Efeito da elevação gradual da concentração extracelular de adrenalina sobre os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MP (n = 10) de matrizã. **A:** Valores absolutos (ms); **B:** Valores normalizados (% dos valores iniciais). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. #: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO.

### 5.1. Freqüência cardíaca de *Brycon cephalus* submetido à hipóxia gradual.

A  $f_H$  média de *B. cephalus* em normóxia manteve-se em ~63 bpm e 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 o dourado, *Salminus maxillosus* (97 bpm; SOUZA *et al.*, 2001), e os atuns *Katsuwonus pelamis* e *Thunnus albacares* (BUSHNELL & BRILL, 1992; KORSMEYER *et al.*, 1993). Em todas essas espécies, 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 iguais ou inferiores à tensão crítica ( $P_cO_2$ ).

MARVIN & HEAT (1968), estudando respostas cardíacas de espécies de hábitos lentos (*Ictalurus nebulosus*), moderados (*Lepomis macrochirus*) e ativos (*Onchorynchus mykiss*), expostas a uma hipóxia gradual, observou que todas respondem de forma uniforme, com uma pronunciada bradicardia.

*B. cephalus* foi capaz de manter a  $f_H$  constante somente até a  $P_{in}O_2$  de 80 mmHg, tensão a partir da qual ocorreu uma bradicardia, até que, na menor tensão de  $O_2$  utilizada (20 mmHg), a  $f_H$  foi de apenas 31 bpm, valor este ~50 % menor que o observado em normóxia.

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  $f_H$  do matrinxã provavelmente preserva o gasto energético do coração quando a disponibilidade de  $O_2$  se torna reduzida. Além disso, a bradicardia aumenta o tempo de residência do sangue dentro do ventrículo, o que poderia permitir um aumento da  $EO_2$  pelo próprio miocárdio esponjoso. Alternativamente, segundo GLASS *et al.* (1991), a bradicardia aumenta a eficiência da transferência de gases nas brânquias pelo desenvolvimento da sincronia cardio-respiratória.

A  $f_H$  tem sido usada como indicador dos efeitos tóxicos de contaminantes ambientais em peixes (TEUSCHLER *et al.*, 2005). De acordo com HEATH (1995), reduções na  $f_H$  com concomitantes aumentos na ventilação branquial são as respostas comuns quando os peixes são expostos a uma variedade de xenobióticos. Reduções na  $f_H$  foram descritas como resultado da exposição ao tolueno (STOSS & HAINES, 1979), metilmercúrio (DIAL, 1978), aos pesticidas carbaril, malation e paration (SOLOMON & WEIS, 1979) e ao tricloroetileno (VILLALOBOS *et al.*, 2000) em “medaka”, *Oryzias latipes*, bem como após exposição do “killifish”, *Fundulus heteroclitus*, a inseticidas (WEIS & WEIS, 1974).

No presente trabalho, os valores de  $f_H$  do grupo exposto ao MP foram significativamente inferiores aos do grupo controle, seguindo a tendência descrita acima. De acordo com GEHRKE (1988), esta bradicardia é resultante do aumento da inibição cardíaca pelas fibras colinérgicas que inervam o coração. No entanto, o efeito deste OP diretamente nos mecanismos contráteis não pode ser esquecido, o que será discutido posteriormente.

## 5.2. Respostas respiratórias de *Brycon cephalus* submetido à hipóxia gradual.

### 5.2.1. Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de $O_2$ ( $P_cO_2$ ).

O consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  -  $mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ) de *B. cephalus* mostrou-se independente da concentração de  $O_2$  no meio, comportando-se como uma espécie oxirreguladora, capaz de manter a  $\dot{V}O_2$  constante em torno de  $95,0 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$  até a tensão de  $O_2$  na água de aproximadamente 40 mmHg. Nas  $P_{in}O_2$  inferiores, essa espécie não foi capaz de manter a  $\dot{V}O_2$ , tornando-se dependente da concentração de  $O_2$  na água. Isso mostra uma redução gradual na eficiência dos mecanismos homeostáticos envolvidos na captação de  $O_2$  pelas brânquias e na difusão desse gás para os tecidos.

A  $\dot{V}O_2$  em normóxia de *B. cephalus* foi semelhante à verificada em trutas (HOLETON & RANDALL, 1967; MARVIN & HEAT, 1968), espécie considerada ativa, cuja  $\dot{V}O_2$  em normóxia fica em torno de  $100 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ , ligeiramente superior ao observado em dourado, *S. maxillosus*, espécie também ativa e migratória (SOUZA *et al.*, 2001). Em comparação com algumas espécies tropicais, a  $\dot{V}O_2$  de *B. cephalus* foi semelhante à encontrada para espécies ativas, como o pacu, *P. mesopotamicus* ( $72 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ; GUERRA, 1992), o tambaqui, *C. macropomum* ( $78 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ; CORRÊA, 1996), o curimatá, *P. scrofa* ( $90 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ; FERNANDES *et al.*, 1995) e mais alta que para algumas espécies sedentárias, como a traíra, *H. malabaricus* ( $37 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ; KALININ, 1991) e o cascudo, *H. regani* ( $40 mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ; MATTIAS, 1994).

Segundo CHRISTIANSEN *et al.* (1982), peixes submetidos a diferentes intensidades de exercício apresentam um aumento do consumo de oxigênio. Em duas espécies de atuns muito ativos (*K. pelamis* e *T. albacares*), foram observados altos valores de  $\dot{V}O_2$  (BUSHNELL & BRILL, 1992). Considerando-se que *Brycon cephalus* é uma espécie ativa, migratória, sendo encontrada em ambientes de águas rápidas e bem oxigenadas e em constante movimento, a forma com que essa espécie é capaz de regular a  $\dot{V}O_2$  se assemelha ao que é observado em espécies com características semelhantes.

Comparando-se os dados obtidos com alguns serrasalmídeos tropicais, o valor normóxico médio de  $\dot{V}O_2$  obtido para *B. cephalus* foi semelhante ao verificado em espécies também migratórias, como pacu, *P. mesopotamicus* (GUERRA, 1992; RANTIN *et al.*, 1998), o curimatã, *Prochilodus scrofa* (FERNANDES *et al.*, 1995) e o tambaqui, *C. macropomum* (CORRÊA, 1996). Essas espécies geralmente habitam ambientes sujeitos a oscilações drásticas na disponibilidade de  $O_2$  do meio.

Algumas espécies pertencentes à família Loricariidae, de respiração aérea facultativa, habitats lânticos e capturadas nos mesmos ambientes que *B. cephalus*, apresentam uma  $\dot{V}O_2$  em normóxia em torno de  $40 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e  $23 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente (MATTIAS *et al.*, 1996; TAKASUSUKI, 1994), valores considerados muito inferiores aos observados no presente estudo, evidenciando o modo de vida ativo que a espécie apresenta em seu habitat, refletida pelos altos valores de  $\dot{V}O_2$ . KALININ *et al.* (1996), estudando a tolerância à hipóxia de traíra, *Hoplias malabaricus*, espécie sedentária de hábitos lentos, observaram um valor médio de  $\dot{V}O_2$  em torno de  $20 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

A  $P_{cO_2}$  calculada para *B. cephalus* (35,4 mmHg) é semelhante à encontrada para espécies ativas como o "black-bass", *Micropterus salmoides* ( $P_{cO_2} = 40 \text{ mmHg}$ ) (CECH *et al.*, 1979). Ao ser comparado a serrasalmídeos tropicais, como o tambaqui ( $P_{cO_2} = 24 \text{ mmHg}$ ), o pacu ( $P_{cO_2} = 30 \text{ mmHg}$ ), o curimatã ( $P_{cO_2} = 21,9 \text{ mmHg}$ ), observa-se que os valores de  $P_{cO_2}$  desses animais são inferiores aos encontrados para *B. cephalus* no presente estudo (CORRÊA, 1996; GUERRA, 1992; FERNANDES *et al.*, 1995, respectivamente). É importante ressaltar que estas espécies são encontradas também em locais de alimentação, sujeitos freqüentemente a grandes oscilações da concentração de  $O_2$  da água.

Espécies sedentárias que vivem no fundo de lagos ou rios, geralmente pobres em oxigênio, como a traíra e a carpa (*Cyprinus carpio*), apresentaram uma  $P_{cO_2}$  em torno de 19 mmHg (KALININ, 1991; OTT *et al.*, 1980). Tais valores são nitidamente mais baixos do que os observados para as espécies descritas anteriormente e do que os apresentados por *B. cephalus* no presente estudo. Segundo FERNANDES & RANTIN (1989), as espécies tropicais estão mais sujeitas à hipóxia ambiental e os baixos valores de  $P_{cO_2}$  podem representar uma vantagem adaptativa, pois permitem uma maior capacidade de regular a tomada de  $O_2$  do meio. Dessa maneira, o alto valor da  $P_{cO_2}$  observado em *B. cephalus* parece refletir o hábito e o habitat dessa espécie, sugerindo uma incapacidade em manter a  $\dot{V}O_2$  em ambientes com baixas tensões de  $O_2$ .

A exposição ao MP aumentou significativamente a  $P_{cO_2}$  de *B. cephalus*, de ~35 para ~52 mmHg. Assim, o MP reduziu a capacidade de manter a tomada de  $O_2$  constante e a

$\dot{V}O_2$  da espécie passa a ser dependente da concentração de  $O_2$  do meio em tensões de  $O_2$  mais elevadas, reduzindo sua capacidade de sobrevivência em ambientes hipóxicos.

MACHADO & FANTA (2003) estudaram o efeito da exposição ao MP sobre as brânquias de pacu prata, *Metynnis roosevelti*. Na primeira hora de exposição à dose subletal de 1 ppm de MP, toda a estrutura das lamelas respiratórias já foi alterada, incluindo o colapso das células pilares, o que aumentou progressivamente ao longo de 96 horas de exposição. Durante as 96 horas, o MP causou aumento da produção de muco, intenso descolamento do epitélio branquial e alterações morfológicas da superfície das células, hiperplasia e degeneração das células lamelares e interlamelares, colapsamento dos espaços sanguíneos e alteração na forma dos eritrócitos. De acordo com estes autores, estas alterações causam desequilíbrio osmótico e iônico, aumento da distância de difusão água-sangue e redução da capacidade de difusão do  $O_2$  além de redução da perfusão dos filamentos branquiais e das lamelas secundárias, reduzindo drasticamente a eficiência das trocas gasosas. Se este for também o caso para *B.cephalus*, estes efeitos explicariam os menores valores de  $\dot{V}O_2$  em hipóxia severa e os maiores valores de  $P_cO_2$  para os animais expostos ao MP.

SAHIB *et al.* (1981) estudaram o efeito do OP malation sobre a função respiratória de *Tilapia mossambica* e sugeriram que a redução no consumo de  $O_2$  da espécie é devida ao diminuído nível de enzimas oxidativas após 48 h de exposição e, provavelmente, à maior absorção deste pesticida pelas brânquias. Em consonância com tais afirmações, MONTEIRO *et al.* (2006) verificaram que a exposição de matrinxã ao MP por 96 h resulta em indução significativa da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) e redução na atividade da glutatona peroxidase (GPx) nas brânquias. A exposição ao MP também induz um aumento significativo na atividade da glutatona S-transferase (GST) e aumento da peroxidação lipídica neste tecido, demonstrando que o MP é um potente indutor de estresse oxidativo em *B. cephalus* e que as brânquias são órgãos muito sensíveis e com um baixo potencial antioxidante. Tais resultados podem explicar, ao menos em parte, a reduzida  $\dot{V}O_2$  e os maiores valores de  $P_cO_2$  apresentados pelo grupo exposto ao MP no presente estudo.

### 5.2.2. Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume Corrente/Ventilatório ( $V_T$ ).

A  $\dot{V}_G$  de *Brycon cephalus* em normóxia, determinada no presente estudo, foi semelhante à encontrada para outras espécies estudadas nas mesmas condições, como *P. mesopotamicus* (546 mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; GUERRA, 1992), *P. scrofa* (451 mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>;

FERNANDES *et al.*, 1995), *C. macropomum* (313 mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; CORRÊA, 1996) e menor do que a encontrada para o cascudo *Hypostomus regani* (913 mlH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; MATTIAS, 1994) e para 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.

De acordo com a "equação fundamental da fisiologia respiratória" de DEJOURS (1981):

$$(\dot{V}_G / \dot{V}O_2) \cdot EO_2 \cdot P_{in}O_2 = 1,$$

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  $\dot{V}O_2$  (KALININ, 1996).

Durante a hipóxia gradual, a  $\dot{V}_G$  de *B. cephalus* aumentou 5,5 vezes de normóxia a 20 mmHg (menor P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> estudada). BUSHNELL & BRILL (1992), estudando duas espécies de atuns muito ativas (*K. pelamis* e *T. albacares*), observaram aumentos significativos da  $\dot{V}_G$  quando compararam seus valores em normóxia e após a exposição à hipóxia moderada. Em truta arco-íris (*Onchorhynchus mikiss*), foi observado um aumento de 13 vezes na  $\dot{V}_G$  em resposta à hipóxia, indicando a grande capacidade do aparato respiratório dessa espécie em elevar a ventilação branquial (HOLETON & RANDALL, 1967). Tal resposta também foi observada para outras espécies de teleósteos, submetidos a diferentes níveis de hipóxia ambiental (HUGHES, 1973; GLASS, 1992; NONNOTTE *et al.*, 1993).

Aumentos na  $\dot{V}_G$  durante hipóxia gradual também foram verificados para outras espécies de peixes tropicais ativos. *C. macropomum* foi capaz de aumentar a  $\dot{V}_G$  em 10,9 vezes (CORRÊA, 1996), *P. scrofa*, 12 vezes (FERNANDES *et al.*, 1995) e *Hoplias lacerdae*, 8,5 vezes (KALININ *et al.*, 1996). A comparação destes resultados com os obtidos no presente estudo sugere que *B. cephalus* tem uma reduzida capacidade de elevação da  $\dot{V}_G$ , a contrário das espécies consideradas resistentes à hipóxia, que apresentam maior capacidade de aumento da  $\dot{V}_G$ . Porém, em seu ambiente natural, *B. cephalus* pode lançar mão da chamada *ram ventilation*, que consiste da 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).

A exposição ao MP fez com que o aumento da  $\dot{V}_G$  em resposta à hipóxia fosse mais pronunciado (7,7 vezes) que aquele apresentado pelos peixes controle, reforçando a hipótese de prejuízo à superfície de troca gasosa causado por este MP. Em hipóxia severa (40 e 20 mmHg), os peixes expostos ao MP apresentaram valores de tomada de O<sub>2</sub>

significativamente inferiores aos apresentados pelos controles, e na tentativa de manter a tomada de  $O_2$ , apresentaram valores de  $\dot{V}_G$  mais elevados.

Durante a exposição gradual à hipóxia, o aumento de 5,5 vezes da  $\dot{V}_G$  observado em *B. cephalus* é devido, primariamente, ao aumento de 2,9 vezes no  $V_T$ , enquanto que a  $f_R$  aumenta 1,7 vezes. Esta resposta permanece nos animais expostos ao MP, onde o aumento da  $\dot{V}_G$  de 7,7 vezes tem como principal componente o aumento da  $V_T$ , de 5,6 vezes, contra a elevação da  $f_R$  de 1,7 vezes. Esse padrão de resposta parece ser comum em peixes, conforme observado por PERRY & WOOD (1989) e por PERRY & GILMOUR (1996).

Entre as diversas espécies de teleósteos, observam-se diferentes estratégias para acionar a hiperventilação em resposta à hipóxia. Por exemplo, em carpa, *Cyprinus carpio* e em *Lepomis macrochirus*, o aumento da  $\dot{V}_G$  é devido à maior elevação da  $f_R$  do que no  $V_T$  (MARVIN & HEAT, 1968; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979). Em tilápia, *Oreochromis niloticus*, o aumento da  $\dot{V}_G$  ocorre com a elevação simultânea da  $f_R$  e do  $V_T$  (FERNANDES & RANTIN, 1989). Apesar da diversidade de estratégias entre as espécies, a resposta mais comumente observada em teleósteos é a hiperventilação através de um maior aumento do  $V_T$  do que da  $f_R$ , sendo exatamente a mesma resposta observada para *B. cephalus* no presente estudo.

Tal padrão de resposta parece estar relacionado à vantagem representada pelo menor custo energético da elevação da  $\dot{V}_G$  através de um maior aumento do  $V_T$  do que na  $f_R$ . Segundo RANTIN *et al.* (1992), a utilização desta estratégia baseia-se no baixo custo para a manutenção da velocidade e constância da contração muscular, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho muscular contra uma alta viscosidade da água ventilada.

### 5.2.3. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).

A eficiência das brânquias como órgão trocador de  $O_2$  pode ser avaliada por meio da necessidade ventilatória ("water convection requirement" -  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), também chamada de requerimento branquial de convecção de água (DEJOURS, 1981). Aumentos na  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  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, a necessidade ventilatória manteve-se constante até a  $P_{in}O_2$  de 60 mmHg, indicando uma grande eficiência da superfície respiratória funcional nas trocas

gasosas. Nas  $P_{in}O_2$  mais baixas, a  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  aumentou significativamente, mas em proporção diferente nos dois grupos experimentais. No grupo controle, a  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg foi de  $\sim 46 \text{ mlH}_2\text{O} \cdot \text{mlO}_2^{-1}$ , valor 10,5 vezes maior que o observado em normóxia ( $4,4 \text{ mlH}_2\text{O} \cdot \text{mlO}_2^{-1}$ ), ao passo que nos peixes expostos ao MP a  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  na mesma  $P_{in}O_2$  foi de  $\sim 95 \text{ mlH}_2\text{O} \cdot \text{mlO}_2^{-1}$ , valor este 18,3 vezes mais elevado do que aquele observado em normóxia ( $5,2 \text{ mlH}_2\text{O} \cdot \text{mlO}_2^{-1}$ ) e  $\sim 2$  vezes mais alto em comparação ao grupo controle.

Esse resultado mostra uma diminuição significativa da eficiência das brânquias na troca de  $O_2$  após a exposição ao MP, provavelmente devido aos efeitos descritos acima, de forma que os peixes do grupo MP necessitaram ventilar uma quantidade muito maior de água para obter uma mesma quantidade de  $O_2$  que os peixes do grupo controle. Desta forma, pode-se inferir que, além dos efeitos discutidos acima, o MP implica em um maior gasto energético para a troca gasosa.

#### 5.2.4. Extração de $O_2$ da Corrente Ventilatória ( $EO_2$ ).

A extração de  $O_2$  da água observada para *B. cephalus* no presente estudo é relativamente baixa quando comparada a outras espécies de peixes, como a tilápia, *O. niloticus*, o tambaqui, *C. macropomum*, o pacu, *P. mesopotamicus*, o curimatá, *P. scrofa*, a traíra, *H. malabaricus* e carpas, todas apresentando uma  $EO_2$  em normóxia maior que 70 % (KALININ, 1996; CORRÊA, 1996; GUERRA, 1992; FERNANDES *et al.*, 1995; MATTIAS *et al.*, 1996; SAUNDERS, 1962).

No grupo controle, a  $EO_2$  se mantém constante, em torno de 59 %, até a  $P_{in}O_2$  de 40 mmHg. Apenas na menor  $P_{in}O_2$  (20 mmHg) a  $EO_2$  diminui, atingindo  $\sim 43$  %. Estes valores são semelhantes aos encontrados para outras espécies de peixes ativos, como os atuns *K. pelamis* e *T. albacares*, para os quais foi observada uma  $EO_2$  de 55 % em normóxia. Porém, nessas espécies a  $EO_2$  diminui significativamente quando os peixes são expostos a uma hipóxia moderada (BUSHNELL & BRILL, 1992), o que não ocorreu com *B. cephalus*, que apresentou redução da  $EO_2$  apenas nas  $P_{in}O_2$  de 20 e 40 mmHg para os grupos controle e exposto ao MP, respectivamente.

Interessante ressaltar que *Hoplerythrinus unitaeniatus*, um eritrinídeo de respiração aérea facultativa, foi capaz de manter a  $EO_2$  constante em torno de 80%, mesmo quando exposto a concentrações muito baixas de  $O_2$  na água (MATTIAS *et al.*, 1996). *Rhinelepis strigosa* e *H. regani*, duas espécies de loricariídeos, também de respiração aérea facultativa, foram capazes de aumentar a  $EO_2$  quando expostos à hipóxia gradual (TAKASUSUKI, 1994; MATTIAS, 1994). Tal fato pode ser explicado pela grande superfície de trocas gasosas observada nesses animais

Considerando-se a “equação fundamental da fisiologia respiratória”, observa-se que a extração e/ou a ventilação devem aumentar para manter a tomada de  $O_2$  quando a concentração de  $O_2$  da água inspirada diminui. Como o potencial para aumentar a  $EO_2$  é freqüentemente limitado, uma relação inversa entre a  $\dot{V}_G$  e a  $P_{in}O_2$  é esperada, se a  $\dot{V}O_2$  for mantida constante. Essa relação entre  $\dot{V}_G$  e  $P_{in}O_2$  é conhecida para todos os grupos de vertebrados, refletindo que os reflexos ventilatórios freqüentemente mantêm a tomada de  $O_2$ .

### **5.3. Contratilidade cardíaca de *Brycon cephalus in vitro*.**

#### **5.3.1. Efeito do Tempo de Duração do Experimento**

Esta série experimental foi realizada no intuito de se verificar se o tempo de duração dos protocolos experimentais, que tiveram duração máxima de 40 minutos, poderia ter qualquer efeito inotrópico negativo devido à deterioração das preparações.

Os resultados mostraram que a força contrátil da tiras ventriculares, tanto do grupo controle quanto do exposto ao MP, se manteve constante ao longo do tempo experimental. Adicionalmente, foi possível observar o efeito inotrópico negativo do MP sobre as preparações do grupo exposto ao MP quando comparado ao grupo controle, uma vez que a  $F_c$  média deste grupo ( $\sim 1,9 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) foi aproximadamente 2 vezes menor que a do grupo controle ( $\sim 3,7 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ).

O tempo experimental também não alterou os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR), uma vez que os mesmos mantiveram-se constantes ao longo dos 40 minutos em ambos os grupos experimentais. Quanto ao efeito específico do MP, não foram observadas diferenças entre os valores de TPT do grupo controle e do exposto ao MP, indicando que este pesticida aparentemente não altera a velocidade de contração ventricular. Entretanto, os valores de THR do grupo exposto ao MP ( $\sim 630 \text{ ms}$ ) foram significativamente mais elevados que os do grupo controle ( $\sim 434 \text{ ms}$ ). Tal efeito do MP no relaxamento cardíaco, bem como na força de contração, será discutido nos itens seguintes.

#### **5.3.2. Aumento da Concentração de Cálcio Extracelular.**

Segundo CHAPMAN (1983), a variação da força de contração do músculo cardíaco envolve um número variável de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, que irão requerer quantidades variáveis de íons  $Ca^{2+}$ . Essa alteração na força de contração pode ser obtida alterando-se as propriedades de ligação das proteínas contráteis ao cálcio, por exemplo, pela alteração na quantidade disponível deste íon e pela estimulação adrenérgica.

Elevações do  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular parecem aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema (SL) sem a atuação de qualquer via de transdução de sinal, diferente do que ocorre com a estimulação adrenérgica (SHIELS & FARRELL, 1997).

Diversos estudos têm comprovado que a contratilidade cardíaca da maioria dos peixes é dependente da concentração extracelular de cálcio, refletindo a importância dos movimentos transarcolêmicos de  $\text{Ca}^{2+}$  para o acoplamento E-C cardíaco (TIBBITS *et al.*, 1992, DRIEDZIC & GESSER, 1994; VORNANEN, 1996). Em diversas espécies de elasmobrânquios e teleosteos, dentre elas *Alosa pseudoharengus*, *Bathygobius soporator*, *Cyclopterus lumpus*, *Hemitripterus americanus*, *Katsuwonus pelamis*, *Lophius americanus*, *Macrozoarces americanus*, *Myxocephalus octodecimspinosus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*, *Salmo salar*, *Scomber scombrus*, a força isométrica máxima de suas tiras ventriculares aumenta significativamente após elevações nas concentrações extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (DRIEDZIC & GESSER, 1985, 1988; KEEN *et al.*, 1992, RANTIN *et al.*, 1998, COSTA *et al.*, 2000).

A importância do cálcio extracelular para a contração cardíaca de *Brycon cephalus* pôde ser evidenciada pela adição de concentrações crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio. No grupo controle, tais incrementos resultaram em um aumento da força de contração de 2 vezes, quando atingida uma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  de 11,5 mM, sendo que o efeito inotrópico positivo foi observado na concentração de 7,5 mM. No grupo exposto ao metilparation (MP), o cálcio extracelular continua sendo importante para a contração cardíaca, já que um efeito inotrópico positivo foi observado a partir da concentração de 9,5 mM, com um aumento da força de contração de 1,8 vezes na concentração máxima utilizada (11,5 mM).

Analisando-se os dados normalizados do desenvolvimento de força de contração pelas tiras ventriculares de matrinxã, nota-se uma tendência maior de aumento no grupo exposto ao MP, (apesar de não serem observadas diferenças significativas). Este fato corrobora os resultados obtidos por GREENWOOD & HUDDART (1975) e por HUDDART (1977), onde a exposição ao organofosforado (OP) paration diminuiu a capacidade de armazenamento intracelular de cálcio do músculo esquelético de baratas, por uma inibição na tomada de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (RS), aumentando a importância dos estoques extracelulares para a contração.

O presente estudo indicou que a concentração de cálcio na qual foi observado um aumento da força de contração corresponde à concentração limitante (7,5 mM e 9,5 mM para os grupos controle e MP, respectivamente), acima da qual o desenvolvimento de força passa a ser limitado pelas distâncias difusionais, tanto do meio extracelular e do RS, quanto dos filamentos, e não mais por quaisquer adições de cálcio ao meio. Tais resultados corroboram a observação de KEEN *et al.* (1992) de que as tiras atriais de atum (*Katsuwonus pelamis*) apresentaram um aumento da força de contração da ordem de 90% quando se

elevou a concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de 3 para 9 mM, sendo que o maior aumento de força ocorreu entre 1 e 5 mM. Resultados semelhantes foram encontrados por COSTA *et al.* (2000) para tiras ventriculares de *Oreochromis niloticus*.

BLASIAK (1995), estudando o fígado de porcos, propôs que um mecanismo indireto de interação entre inseticidas OPs e a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Segundo este autor, os OPs podem inibir a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase excluindo a parte protéica da enzima de seu meio lipídico normal. Se esta hipótese for válida para a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase cardíaca, uma menor quantidade de  $\text{Na}^+$  estaria disponível no sarcoplasma e, conseqüentemente, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) teria uma menor disponibilidade deste íon para a troca com  $\text{Ca}^{2+}$  quando trabalhando em seu modo reverso. Levando-se em conta a importância dos mecanismos transsarcolemais de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para o acoplamento excitação-contração em peixes, tal redução na concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  e, conseqüentemente, de  $\text{Ca}^{2+}$ , poderia resultar na menor força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares do grupo exposto ao MP.

Os incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular não causaram mudanças significativas no tempo para o desenvolvimento do pico de tensão (TPT) de nenhum dos grupos experimentais. Também não foram observadas diferenças significativas entre os valores de TPT do grupo controle e do grupo exposto ao MP. Tais resultados sugerem que a contração ventricular não é significativamente afetada nem pela sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  nem tampouco pela exposição ao MP.

Por outro lado, o THR do grupo exposto ao MP foi significativamente mais elevado que o do grupo controle em todas as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelulares, apesar dos incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  não terem afetado significativamente o THR de nenhum dos grupos. Esse aumento no tempo para o relaxamento sugere, mais uma vez, uma ação inibitória do MP nos mecanismos de remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  da célula, como a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e o NCX, trabalhando agora em seu modo normal. Também não pode ser descartado um possível efeito do MP sobre a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema e do RS. DIERKES-TIZEK *et al.* (1984) verificaram um efeito inibitório de inseticidas OPs sobre a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase cardíaca de ratos. Segundo SUN *et al.* (2000), o paraoxon, metabólito ativo do MP, pode diminuir a atividade da SERCA do RS das glândulas salivares de humanos, diminuindo a captação de cálcio por essa organela. Esses autores afirmam que além da SERCA, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana celular também pode ter sua atividade diminuída pelo paraoxon, contribuindo ainda mais para uma elevação do tempo de relaxamento.

### 5.3.3. Tensão Pós-Pausa e Relação Força x Frequência.

A força de contração desenvolvida pelo músculo cardíaco está diretamente relacionada com a frequência de estimulação e sua regularidade. O estudo do intervalo entre uma contração cardíaca e a contração precedente é de crucial importância para a determinação da tensão (BOWDITCH, 1871 apud HAJDU, 1969).

A primeira correlação entre frequência de estimulação e força de contração foi proposta por Bowditch, em 1871. Trabalhando com miocárdio de rã, ele verificou que após uma pausa diastólica prolongada, a força de contração desenvolvida após o músculo ser novamente estimulado na frequência anterior sofria uma redução e retornava lentamente aos valores anteriores, que eram então mantidos. Trabalhos posteriores com outros animais confirmaram essas observações também para o coração de alguns mamíferos, como coelhos e cobaias (YU *et al.*, 1994; BERS, 2001). A essa relação foi dado o nome de “efeito escada” (staircase).

Em contrapartida, um fenômeno oposto ao descrito anteriormente foi observado pela primeira vez no músculo cardíaco de cães por WOODWORTH (1902). Segundo esse autor, uma redução na frequência de estimulação causava um aumento na força de contração dos primeiros batimentos na nova frequência, ao invés de causar uma redução, como seria prevista pelo “efeito escada” de Bowditch. “Efeito escada reversa” é outro nome utilizado para descrever este efeito. A potenciação pós-pausa é também um exemplo de “efeito escada reverso”, já que uma pausa na estimulação pode ser considerada como uma redução na frequência de estimulação, o que causa um aumento na força de contração.

A partir destas observações fica clara a importância da análise de alterações na frequência de estimulação sobre as respostas do miocárdio, assim como a análise de pausas diastólicas prolongadas (repouso).

#### 5.3.3.1. Tensão pós-pausa.

Estudos utilizando microscopia eletrônica sugerem que existem 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). O RS é bem desenvolvido em miócitos de mamíferos e aves, onde é a principal fonte e reservatório do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador. Nos vertebrados ectotérmicos e em mamíferos neonatos, o RS cardíaco é relativamente esparsa e a contração e o relaxamento cardíacos são mais dependentes da entrada e saída transsarcolemais de  $\text{Ca}^{2+}$  (FABIATO, 1983; BOSSEN & SOMMER, 1984; VORNANEN, 1996).

Além disso, a exposição a inseticidas organofosforados afeta grandemente o balanço celular do cálcio, tanto diretamente quanto indiretamente, através de receptores nicotínicos, muscarínicos e adrenérgicos, proteína G, fosfolipase C, modificando a importância relativa de cada compartimento celular como fornecedor de cálcio para o aparato contrátil dependendo das condições (SUN *et al.*, 2000).

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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico (KEEN *et al.*, 1992; SHIELS *et al.*, 1999; SHIELS & FARRELL, 2000; ANELLI-JR, *et al.*, 2004).

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

HOVE-MADSEN & TORT (1998) e HOVE-MADSEN *et al.* (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 E-C na temperatura de aclimação.

No presente estudo, por meio da utilização da rianodina em condições fisiológicas, foi possível verificar uma importante diferença entre o coração de *B. cephalus* e da grande maioria das espécies de peixes de ambiente temperado estudadas até o momento. Os resultados obtidos demonstram que a contração ventricular dessa espécie é dependente dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  uma vez que foi observado o desaparecimento da potenciação pós-pausa da Fc ao utilizar-se este alcalóide. A evidência de um RS funcional na temperatura em que a espécie ocorre naturalmente só havia sido descrita para tiras atriais de atum (KEEN *et al.*, 1992), levando-se em consideração que em diversas espécies o átrio normalmente apresenta RS mais desenvolvido do que o tecido ventricular, tanto estrutural como funcionalmente (BERS, 2001), e para tiras ventriculares do pacu (ANELLI-JR *et al.*, 2004), do curimatá e do cascudo (RIVAROLI *et al.*, 2006), da traíra (OLLE, 2003) e do muçum (ROCHA *et al.*, 2007), espécies tipicamente neotropicais.

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

### 5.3.3.2. Relação força x frequência.

Embora a análise da tensão pós-reposo seja a maneira tradicional de se verificar a importância do RS na regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo cardíaco, é importante verificar a participação do RS em frequências relevantes fisiologicamente, através do estudo da relação entre a força de contração e a frequência de estimulação na presença da rianodina.

A relação entre a força isométrica máxima e a frequência de contração, ou relação força-frequência, é documentada para diversas espécies de peixes. Para a maioria das espécies 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-frequência negativa ou “efeito escada” negativo.

Em tiras atriais de *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 (ASK, 1983; DRIEDZIC &

CESSER, 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 (FARRELL & SHIELS, 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.

Atualmente sabe-se que estas diferenças entre os grupos de vertebrados parecem refletir, indiretamente, variações nos processos que envolvem a acumulação e liberação de cálcio, inclusive a participação do retículo sarcoplasmático (RS) como fornecedor deste íon para o aparato contrátil durante o ciclo cardíaco.

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 ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). Existe uma correlação direta entre o desenvolvimento do RS e a frequência de contração máxima que o músculo pode atingir, sendo que as maiores taxas de contração são encontradas nos tecidos que apresentam um RS mais desenvolvido ou mecanismos de transporte sarcolemais de cálcio mais eficientes.

Uma outra limitação à manutenção da tensão em frequências de contração elevadas (relação força-frequência positiva) é a distância de difusão intracelular que o cálcio deve atravessar para ativar os filamentos contráteis (KEEN *et al.*, 1992) e também a velocidade com que este íon deve ser removido do sarcoplasma para promover um relaxamento máximo.

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-frequência positiva, mesmo na ausência de um RS anatomicamente bem desenvolvido (CHAPMAN, 1983; TIBBITS *et al.*, 1992).

De acordo com VORNANEN (1989), a duração do potencial de ação miocárdico 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 em um tempo insuficiente para a difusão de  $\text{Ca}^{2+}$  da superfície do miócito ao aparato contrátil, ou vice-versa, ocasionado pela diminuição do tempo de contração a elevadas frequências.

Segundo DRIEDZIC & GESSER (1985), a razão da ocorrência de uma relação força-freqüência negativa apresentada pela maioria dos teleósteos está relacionada ao controle intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$ . Tal relação evidencia uma menor capacidade de obtenção do  $\text{Ca}^{2+}$  livre a partir de reservas intracelulares nestes animais, associada a mecanismos de transporte sarcolemais deste íon insuficientes para a manutenção do inotropismo a elevadas taxas de estimulação, o que determina indiretamente o grau de eficiência do acoplamento E-C no músculo cardíaco.

A variação da força de contração das tiras ventriculares de *B. cephalus* após incrementos na freqüência de estimulação foi obtida com o objetivo de indicar uma possível limitação dos mecanismos envolvidos com o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o ciclo cardíaco, bem como avaliar os efeitos da exposição ao metilparation neste ciclo.

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 freqüências fisiologicamente relevantes (DRIEDZIC & GESSER, 1988; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989). TIBBITS *et al.* (1990) sugerem que o fluxo transsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  é o maior mediador da regulação da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico quando o músculo está em "steady-state".

A relação força-freqüência na presença de 10  $\mu\text{M}$  de rianodina foi estudada com o intuito de verificar a importância do RS no manejo do cálcio ativador nas freqüências de contração em que a espécie é encontrada *in vivo*.

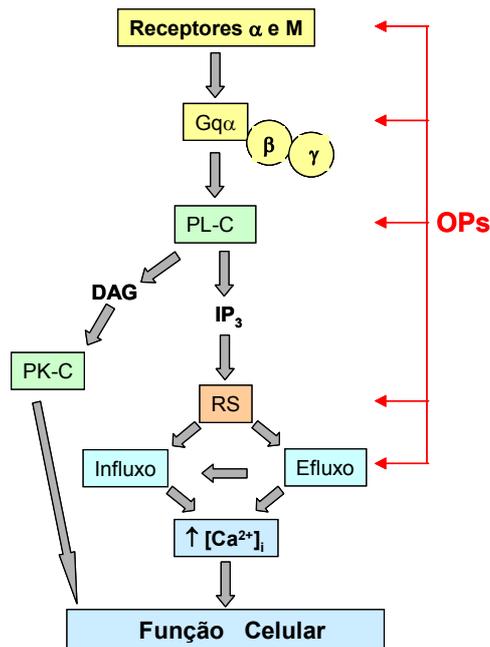
Os resultados mostram que a rianodina causou uma redução significativa na Fc, desde as freqüências mais baixas até as maiores freqüências alcançadas, tanto no grupo controle quanto no grupo exposto ao MP. HOVE-MADSEN (1992) relata que a rianodina não teve efeito significativo sobre o TPT de tiras ventriculares de *Oncorhynchus mykiss*, o que foi observado no presente trabalho, onde TPT não apresentou sensibilidade à rianodina em nenhuma freqüência utilizada. O mesmo não foi observado para os valores de THR, que sofreram aumentos significativos em resposta ao tratamento com rianodina, tanto no grupo controle quanto no grupo exposto ao MP, em freqüências abaixo de 60 bpm, embora esses aumentos tenham sido menores para o grupo exposto ao MP, pois a exposição ao metilparation já foi responsável por um aumento de THR, aumento que também foi observado nos protocolos de efeito do tempo de exposição e de adição de adrenalina.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que pelo menos dois mecanismos estão envolvidos na regulação da produção de força no coração de *B. cephalus*. Primeiro, um componente dependente da freqüência de estimulação. Esse componente parece depender do fluxo de íons através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L e dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema, ambos insensíveis à rianodina. O segundo, um componente dependente do RS,

cuja atividade não é afetada pelo aumento na frequência de estimulação e é sensível à rianodina, substância que reduz significativamente a produção de força nas tiras ventriculares de *B. cephalus*.

Vale ressaltar que a maior contribuição do RS no manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  para a geração de força de contração cardíaca, observada no miocárdio de peixes, foi descrita por SHIELS *et al.* (1999) no tecido atrial de atum, *T. albacares*, no qual a rianodina provocou uma redução de aproximadamente 60% na Fc, nas frequências observadas *in vivo*, resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho para o tecido ventricular de *B. cephalus*.

Embora a exposição ao MP tenha causado uma redução de aproximadamente 50% na Fc nas frequências observadas *in vivo*, redução esta semelhante àquela causada pela rianodina, não se pode afirmar que o MP tenha seu efeito principal no RS, pois o mesmo pode alterar a atividade de diversos mecanismos transportadores de cálcio, como as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases da membrana celular e do retículo sarcoplasmático, assim como alterar a sensibilidade dos canais ao  $\text{Ca}^{2+}$ , ou ainda alterar a atividade de proteínas G e da fosfolipase C (ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA, 1982, SUN *et al.*, 2000). Um esquema do efeito de organofosforados sobre a função celular é mostrado na figura 35.



**Figura 35** - Efeito dos organofosforados (OPs) sobre o sistema de transdução de sinais via fosfoinositol. O estímulo de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e muscarínicos ativa a proteína Gq que está acoplada com a isoforma  $\beta$  da fosfolipase C (PL-C). Essa enzima catalisa a formação de inositol-1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  se liga ao receptor de  $IP_3$  do RS e induz a liberação de  $Ca^{2+}$ . O DAG ativa a isoforma lipídio-dependente da proteína-quinase C (PKC). A depleção dos estoques de  $Ca^{2+}$   $IP_3$ -sensíveis envia um sinal à membrana plasmática induzindo o influxo de  $Ca^{2+}$ . Tanto a aumentada  $[Ca^{2+}]_i$  intracelular quanto a ativação da PKC podem ativar uma variedade de funções celulares. Os OPs modulam vários elementos dessa via por meio de fosforilação e alteram suas respostas aos estímulos. Adaptado de Sun *et al.* (2000).

#### 5.3.4. Adição de Adrenalina.

Segundo LAURENT *et al.* (1983) o coração de todos os teleósteos, com exceção dos pleuronectídeos (como o linguado, *Pleuronectes platessa*), apresenta inervação adrenérgica, além de estar sob a influência das catecolaminas circulantes produzidas no tecido cromafim. A estimulação destas fibras causa a cardioaceleração e/ou um aumento na força de contração (CAMERON & BROWN, 1981).

ASK (1983) aponta a adrenalina como a catecolamina dominante tanto nas terminações nervosas do coração de teleósteos como em sua circulação. Além disso, ao utilizar agonistas e antagonistas do sistema adrenoceptor de mamíferos, esse autor classificou o  $\beta$ -adrenoceptor existente no coração de vertebrados inferiores que apresentam inervação simpática como sendo predominantemente do tipo  $\beta_2$ , ou seja, um receptor sensível à adrenalina, apesar da existência de outros tipos de receptores adrenérgicos ainda não ter sido descartada (SHIELS & FARRELL, 1997).

A adrenalina estimula a contratilidade miocárdica por meio de diversos mecanismos. Os citados a seguir são de interesse especial no presente contexto. A tomada de cálcio pela sarcolema é aumentada em mamíferos (CARMELIET & VEREECKE, 1969) e diversos teleósteos (SHIELS & FARRELL, 1997; RANTIN *et al.*, 1998). No miócito, a estimulação dos  $\beta_2$ -adrenoceptores pela adrenalina provoca a fosforilação dos canais L da sarcolema pela ativação de uma proteína quinase A (TIBBITS *et al.*, 1992), aumentando a condutância destes canais de cálcio e, conseqüentemente, a entrada de cálcio na célula (KEEN *et al.*, 1992). LINDEN & BROOKER (1982) ainda comprovaram que a adrenalina tem a propriedade de aumentar a duração do potencial de ação das tiras ventriculares de anfíbios por meio do prolongamento da fase platô.

Além disso, também já foi constatado que a adrenalina estimula a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  da sarcolema em mamíferos (BERS, 2001; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989), impedindo a acumulação intracelular de  $\text{Na}^+$  e assim favorecendo o efluxo de cálcio através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX).

Estudos do tecido muscular cardíaco de mamíferos têm mostrado que o RS é também afetado pela adrenalina, aumentando a tomada de cálcio (TADA *et al.*, 1974) e sua liberação (BOLLER & POTT, 1989). Uma elevação da acumulação intracelular de cálcio é devida ao aumento da atividade da bomba de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase - SERCA), resultante da desinibição do fosfolambano, enquanto o aumento do efluxo de cálcio do RS é obtido por um aumento da liberação de cálcio cálcio-induzida (FABIATO, 1983), proporcionado pela elevação (mediada pela adrenalina) dos níveis de cálcio no citosol, ou ainda pela elevação dos níveis intracelulares de  $\text{IP}_3$  (inositol trifosfato) decorrente da ativação de uma fosfolipase C por uma possível estimulação  $\beta_1$ -adrenérgica (BERRIDGE, 1993; BERS, 2001; SHIELS &

FARRELL, 1997). Este último mecanismo ainda culminaria em um aumento do influxo de cálcio na célula via fosforilação dos canais L, resultante da ativação de uma proteína-quinase C por meio da elevação concomitante dos níveis citosólicos de diacilglicerol (DAG).

O aumento da atividade dos sistemas de transporte de cálcio após a estimulação adrenérgica resulta em um efeito cronotrópico positivo, particularmente numa taxa de relaxamento mais rápida, enquanto um possível efeito inotrópico positivo pode vir a ocorrer como consequência de uma maior disponibilidade de íons cálcio ao aparato contrátil. Efeitos inotrópicos positivos da estimulação  $\beta$ -adrenérgica foram demonstrados como resultantes de aumentos tanto na taxa quanto na duração da contração em carpa cruciana e truta arco-íris (VORNANEN, 1989).

BERS (2001) ainda aponta que a estimulação adrenérgica também produz seu efeito cronotrópico positivo diminuindo a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, por meio da fosforilação da troponina I (TnI) via AMPc, aumentando assim a taxa de desligamento entre este íon e a troponina C, sendo então observado um relaxamento mais rápido na presença de  $\beta$ -agonistas. Cabe aqui assinalar que essa dessensitização dos miofilamentos ao cálcio não é totalmente responsável pela maior taxa de relaxamento, uma vez que esta também depende dos mecanismos responsáveis pela diminuição dos níveis citosólicos de cálcio (NCX e SERCA). A figura 36 resume os principais efeitos da estimulação adrenérgica nos miócitos cardíacos.

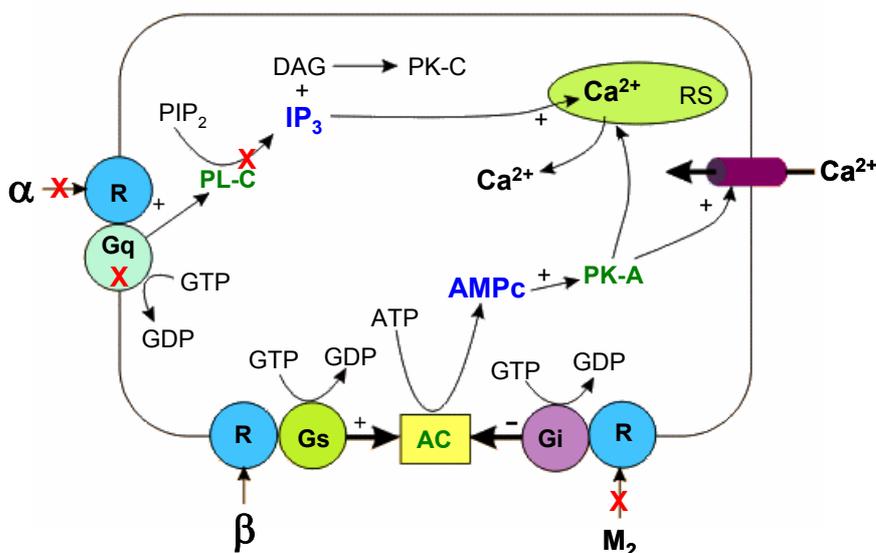
A concentração de adrenalina presente no plasma de uma variedade de peixes sob condições de estresse é da ordem de  $10^{-6}$  M (SHIELS *et al.*, 1998), enquanto um nível tônico de adrenalina em torno de  $10^{-9}$  M é observado quando estes animais estão em repouso. Tal efeito pôde ser simulado nas tiras ventriculares de *B.cephalus* pela adição de doses crescentes de adrenalina ao meio extracelular. A adrenalina não exerceu efeito inotrópico positivo em nenhuma das concentrações utilizadas, diferentemente do efeito inotrópico positivo observado por esta autora para tiras ventriculares de truta, *O. mykiss*. Além disso, a adrenalina falhou em acelerar os tempos de contração e relaxamento cardíaco nesta espécie.

O nível de catecolaminas circulantes em peixes aumenta durante uma variedade de distúrbios fisiológicos e ambientais (FRITSCHÉ & NILSSON, 1993). Dessa forma, uma liberação de catecolaminas em resposta ao estresse pode representar a estratégia adotada pela espécie em estudo para conseguir apresentar elevações acentuadas na sua frequência cardíaca.

Uma hipótese a ser levantada para justificar a falta de efeito inotrópico após estimulação adrenérgica é uma possível liberação de noradrenalina como a principal catecolamina. De acordo com FRITSCHÉ & NILSSON (1993), embora seja esperado que as quantidades relativas de adrenalina e noradrenalina no plasma possam refletir, pelo menos

parcialmente, os níveis estocados nos tecidos cromafins, isso não parece ser sempre o caso. A razão entre as duas catecolaminas liberadas, segundo esta autora, varia em relação à natureza e duração do estímulo. Isso pode ser verificado pela observação da tabela 26, onde são mostrados valores de concentração plasmática dessas duas catecolaminas para diferentes espécies em diferentes situações, mostrando quão variável pode ser a liberação de catecolaminas em virtude de diferentes tipos de estímulos. Dessa forma, estudos posteriores serão necessários para que se determine qual das duas catecolaminas predomina em *B. cephalus* durante o estresse.

Em resumo, o presente trabalho mostrou que a exposição de matrinxã, *Brycon cephalus*, ao inseticida organofosforado metilparation, mesmo em baixas concentrações (2 ppm, 1/3 CL<sub>50</sub>) comumente utilizadas no combate a larvas de insetos em tanques de piscicultura, é capaz de acentuar as respostas cardio-respiratórias à hipóxia como bradicardia e hiperventilação, além de diminuir o consumo de oxigênio e elevar a tensão crítica do O<sub>2</sub>, respostas comuns quando os peixes são expostos a uma série de xenobióticos. Além disso, o efeito deste OP diretamente nos mecanismos contráteis reduzindo a força de contração miocárdica, associado à pronunciada bradicardia, deve levar à diminuição do débito cardíaco da espécie, o que pode ser crítico durante condições hipóxicas, comumente enfrentadas por peixes em situações de cultivo e na natureza.



**Figura 36-** Esquema das vias de ativação adrenérgica em um miócito cardíaco e dos locais de ação de inseticidas organofosforados (OPs). Os sítios de inibição pelos OPs estão assinalados com um X vermelho. PL-C – fosfolipase C; PK-C – proteína-quinase C; AC – adenil-ciclase; M<sub>2</sub> – receptor muscarínico tipo 2; α - receptores α-adrenérgicos; β- receptores β-adrenérgicos.

**Tabela 26 -** Concentrações de adrenalina e noradrenalina no plasma de diferentes espécies de peixes antes e após estresse. Concentrações expressas em nM de plasma. (modificada de NILSSON, 1983).

Espécie	Repouso		Estresse			Referência
	Adr	Nor	Tipo	Adr	Nor	
<i>Scyliorhinus canicula</i>	44,2	53,7	hipóxia (30')	464	410	Mazeaud (1971)
<i>Scyliorhinus canicula</i>	25,6	32,1	exercício físico	284	446	Butler <i>et al.</i> (1978)
<i>Squalus acanthias</i>	49,1	14,8	hipóxia (10')	164	169	Abrahamsson <i>et al.</i> (1979)
<i>Cyprinus carpio</i>	8,19	47,4	hipóxia (30')	36,6	97,8	Mazeaud (1971)
<i>Cyprinus carpio</i>	8,19	47,4	distúrbio físico	10,9	225	Mazeaud (1971)
<i>Gadus morhua</i>	30,0	13,2	hipóxia (10')	292	32,1	Wahlqvist & Nilsson (1980)
<i>Gadus morhua</i>	30,0	13,2	exercício físico	212	85,0	Axelsson & Nilsson (1986)
<i>Hoplias malabaricus</i>	0,4	1,5	hipóxia (10')	24 (Adr+Nor)		Perry <i>et al.</i> (2004)
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	1,8	1,5	hipóxia (10')	64 (Adr+Nor)		Perry <i>et al.</i> (2004)

## 6. CONCLUSÕES.

No presente trabalho, o estudo do comportamento dos sistemas cardíaco e respiratório de *Brycon cephalus* (matrinxã) expostos por 96 h à concentração subletal de 2 ppm de FoliSuperl 600BR® (metil paration – MP - 600 g.L<sup>-1</sup>) permitiram as seguintes conclusões:

- a. *B. cephalus* mostrou-se uma espécie oxireguladora, com uma P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> média de ~35 mmHg;
- b. a exposição ao MP causou um aumento na P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> de aproximadamente 50 %, tornando a tomada de O<sub>2</sub> dependente da concentração de O<sub>2</sub> do meio em tensões mais elevadas, reduzindo sua capacidade de sobrevivência em ambientes hipóxicos;
- c. a exposição ao MP reduziu a capacidade de tomada de O<sub>2</sub> do meio ( $\dot{V}O_2$ ) em hipóxia severa;
- d. a manutenção da  $\dot{V}O_2$  constante até a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> foi possível mediante o aumento da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) em ambos os grupos experimentais;
- e. os incrementos da  $\dot{V}_G$  deveram-se aos aumentos tanto da frequência respiratória (f<sub>R</sub>) quanto do volume ventilatório (V<sub>T</sub>), sendo o aumento do V<sub>T</sub> o principal responsável por tais incrementos;
- f. a exposição ao MP fez com que o aumento da  $\dot{V}_G$  em resposta à hipóxia fosse mais pronunciado que aquele apresentado pelos peixes do grupo controle, sugerindo um prejuízo à superfície de troca gasosa causado pelo MP.
- g. a manutenção da EO<sub>2</sub> constante até 20 mmHg no grupo controle e 40 mmHg no grupo exposto ao MP indica que as respostas ventilatórias foram suficientes para responder à diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água;
- h. os maiores aumentos na necessidade ventilatória apresentados pelo grupo exposto ao MP indicam uma diminuição significativa da eficiência das brânquias na troca de O<sub>2</sub>, implicando em um maior gasto energético para a troca gasosa;
- i. a hipóxia causa a bradicardia antes mesmo da tensão crítica de O<sub>2</sub> (P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>) ser atingida;
- j. os valores força de contração (Fc) das tiras ventriculares foram significativamente inferiores no grupo exposto ao MP em todos os protocolos experimentais;
- k. a contração ventricular dessa espécie é dependente dos estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (do retículo sarcoplasmático - RS), assim como do fluxo de íons através de canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L e dos trocadores Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> da sarcolema;
- l. a redução da Fc nas frequências observadas *in vivo*, causada pela exposição ao MP pode ter sido causada por um efeito deste organofosforado no RS bem como na atividade de diversos mecanismos transportadores de cálcio, como as Ca<sup>2+</sup>-ATPases da sarcolema e do RS, assim como pela alteração da sensibilidade dos canais ao Ca<sup>2+</sup>, da atividade de proteínas G e da fosfolipase C;
- m. a falta de efeito inotrópico após estimulação adrenérgica em *B. cephalus* é uma possível indicação da liberação de noradrenalina como a principal catecolamina nesta espécie.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aguiar, L.H., Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A.E., Corrêa, C.F. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. *Environ. Res.*, v. 95, pp. 224-230, 2004.
- Alderson, B.H., Feher, J.J. The interaction of calcium and ryanodine with cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 900, pp. 221-229, 1987.
- Almeida-Val, V.M., Val, A.L. Adaptação Bioquímica em peixes na Amazônia. *Ciência Hoje*, v. 11, n. 64, pp. 62-67, 1990.
- Anelli Jr., L.C., Olle, C.D., Costa, M.J., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. Effect of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887- Teleostei, Serrasalminidae). *J. Therm. Biol.*, v. 29, pp. 103-113, 2004.
- Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. Interaction of insecticides with de  $Ca^{2+}$ -pump activity of sarcoplasmic reticulum. *Pesticide Biochem. Physiol.* v. 17, pp. 185-190, 1982.
- Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. Partition of parathion in synthetic and native membranes. *Biochim. biophys. Acta*, v. 901, pp. 61-66, 1984.
- Ask, J.A. Comparative aspects of adrenergic receptors in the hearts of lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 76A, n. 3, pp. 543-552, 1983.
- Bailey, J.R., Driedzic, W.R. Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimation. *J. Exp. Biol.*, v. 149, pp. 239-254, 1990.
- Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, v. 361, pp. 315-325, 1993.
- Bers, D.M. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am. J. Physiol.*, v. 248, pp. H366-H381, 1985.
- Bers, D.M. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers (2a Ed.)*, 258p, 2001.
- Bers, D.M., Christensen, D.M., Nguyen, T.X. Can Ca entry via Na/Ca exchange and directly activate cardiac muscle contraction?. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 20, pp. 405-414, 1987.
- Blasiak, J. Inhibition of erythrocyte membrane ( $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ )-ATPase by the organophosphorus insecticides parathion and methylparathion. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 110C, n. 2, pp. 119-125, 1995.
- Balzka, P. The anaerobic metabolism of fish. *Physiol. Zool.*, v. 31, pp. 117-128, 1958.
- Boller, M., Pott, L.  $\beta$ -adrenergic modulation of transient inward current in guinea-pig cardiac myocytes. *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)*, v. 415, pp. 276-288, 1989.
- Booth, J.H. The effect of oxygen supply, epinephrine and acetylcholine on the distribution of blood flow in trout gills. *J. Exp. Biol.*, v. 83, pp. 31-39, 1979.
- Bossen, E.H., Sommer, J.R. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. *Tissue & Cell*, v. 16, pp. 173-178, 1984.
- Britski, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: Poluição e Piscicultura. *Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca CPRN, São Paulo*, pp. 79-108, 1972.

- 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. B*, v. 162, n. 2, pp. 131-143, 1992.
- Byard, J.L. The impact of rice pesticides on the aquatic ecosystems of the Sacramento River and Delta (California). *Rev. Environ. Contam. Toxicol*, v. 159, pp. 95-110, 1999.
- Cameron, J.N. Chloride shift in fish blood. *J. Exp. Zool.*, v. 206, pp. 289-295, 1978.
- Cameron, J.S., Brown, S. Adrenergic and cholinergic responses of the isolated heart of the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 70C, pp. 109-115, 1981.
- Carmeliet, E., Vereecke, J. Adrenaline and the plateau phase of the cardiac action potential. *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)*, v. 313, pp. 300-315, 1969.
- Cech, J.J.Jr., Campagna, C.G., Mitchell, S.J. Respiratory responses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to environmental changes in temperature and dissolved oxygen. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v. 108, pp. 166-171, 1979.
- Chapman, R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am. J. Physiol.*, v. 245, n. 14, pp. H535-H552, 1983.
- Christiansen, B., Lomholt, P.J., Johansen, K. Oxygen uptake of carp, *Cyprinus carpio*, swimming in normoxic and hypoxic water. *Env. Biol. Fish.*, v. 7, n. 3, pp. 291-296, 1982.
- Corrêa, C.F. Efeitos das reduções graduais do oxigênio ambiental sobre a função cárdio-respiratória de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Teleostei, Serrasalminidae). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 109p, 1996.
- Costa, M.J., Rivaroli, L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. *J. Therm. Biol.*, v. 25, pp. 373-379, 2000.
- Costa, M.J., Olle, C.D., Ratto, J.A., Anelli-Jr, L.C., Kalinin, A.L., Rantin, F.T. Effect of acute temperature transitions on chronotropic and inotropic responses in the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *J. Therm. Biol.*, v. 27, pp. 39-45, 2002.
- Davis, J.C. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *J. Fish. Res. Board Can.*, v. 32, n. 12, pp. 2295-2332, 1975.
- Dejours, P. Principles of comparative respiratory physiology. New York: Elsevier, 265p, 1981.
- Deli, E., Kiss, Z. The effect of organophosphorous insecticide Wofatox 50 EC on the adenylate cyclase activity of chicken embryo muscle. *Biochem. Pharmacol.*, v. 35, n. 9, pp. 1603-1605, 1986.
- Deli, E., Kiss, Z. Effect of parathion and methylparathion on protein content of chicken embryo muscle *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, n. 17, pp. 3251-3256, 1988.
- Deshpande, A.A., Swamy, G.S. The kinetics of methylparathion and fenvalerate action and  $Ca^{2+}$  antagonism on the activity of  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Pesticide Biochem. Physiol.*, v. 34, pp. 118-125, 1989.
- Dial, N.A. Methylmercury: some effects on embryogenesis in the Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Teratology*, v. 17, pp. 83-92, 1978.
- Dierkes-Tizek, U., Glaser, U., Oldiges, H., Hettwer, H. Effect of organophosphates on rat heart ATPases. *Arzneim. Forsch.*, v. 34, n. 66, pp. 671-678, 1984.
- Driedzic, W.R., Gesser, H.  $Ca^{2+}$  protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. *J. Comp. Physiol. B*, v. 156, pp. 135-142, 1985.

- Driedzic, W.R., Gesser, H. Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. *J. Exp. Biol.*, v. 140, pp. 227-241, 1988.
- Driedzic, W.R., Gesser, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. *Physiol. Rev.*, v. 74, pp. 221-258, 1994.
- Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, v. 245, n. 14, pp. C1-C14, 1983.
- Fanta, E., Rios, F.S., Romao, S., Vianna, A.C., Freiburger, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 54(2), pp. 119-130, 2003.
- Farrell, A.P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation, *Can. J. Zool.*, v. 62, pp. 523-536, 1984.
- Farrell, A.P., Jones, D.R. The heart. In: Fish Physiology, v. XII (A): The Cardiovascular System, pp. 1-88, 1992.
- Farrell, A.P., Shiels, H.A. Comparative aspects of cardiac contractility in teleost fish: clues about E-C coupling from isometric studies. In: Proceedings of the "International Congress on the Biology of Fish: Fish Cardiorespiratory Physiology, Aberdeen, Scotland, pp. 45-51, 2000.
- 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, pp. 509-519, 1989.
- Fernandes, M.N., Rantin, F.T. Relationship between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*):aquacultural consequences. *Aquaculture*, v. 127, pp. 339-346, 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, pp. 123-133, 1995.
- Figueiredo, G.M., Senhorini, J.A. Influência de biocidas no desenvolvimento da carpa comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) e sobre o zooplâncton, durante o período de larvicultura. *Bol. Tec. CEPTA*, v. 31, pp. 5-21, 1990.
- Fritsche, R., Nilsson, S. Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. In: Rankin, J.C, Jensen, F.B. (eds). *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, 1993.
- Galis, F., Barel, C.D.N. Comparative functional morphology of the gills of african lacustrine cichlidae (Pisces, Teleostei). An ecomorphological approach. *Neth. J. Zool.*, v. 30, n. 2, pp. 392-430, 1980.
- Gallo, M.A., Lawryk, N.J. Organic phosphorus pesticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W.J.Jr. and Laws, E.R.Jr., Eds. Academic Press, New York, NY, 1991.
- Gehrke, P.C. Acute Cardio-respiratory Responses of Splanged Perch, *Lepiotherapon unicolor* (Günther 1859), to Sublethal Concentrations of Zinc, Temephos and 2,4-D. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, v. 39, pp. 767-774, 1988.
- Gerald, J.W., Cech, J.J. Respiratory responses of juvenile catfish (*Ictalurus punctatus*) to hypoxic conditions. *Physiol. Zool.*, v. 43, pp. 47-54, 1970.
- Gesser, H. Cardiac force-interval relationship, adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. *J. Comp. Biol. B*, v. 166, pp. 278-285, 1996.

- Glass, M.L. Ventilatory responses to hypoxia in ectothermic vertebrates. In: Lenfant, C. *Physiological Adaptations in Vertebrates*. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 97-108, 1992.
- Glass, M.L., Rantin, F.T., Verzola, R.M.M., Fernandes, M.N., Kalinin, A.L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish Biol.*, v. 39, pp. 143-149, 1991.
- Graham, M.S., Farrell, A.P. The effect of temperature acclimation and adrenaline on the performance of a perfused trout heart. *Physiol. Zool.*, v. 62, n. 1, pp. 38-61, 1989.
- Greenwood, M., Huddart H. The effect of an organochlorine and an organophosphorus insecticide on the fine structure of flight muscle and the implications for the maintenance of contractility. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v. 50, n. 2, pp. 475-478, 1975.
- Guerra, C.D.R. Respostas cardio-respiratórias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 114p. São Carlos, SP, 1992.
- Hajdu, S. Mechanism of the Woodworth staircase phenomenon in heart and skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v. 216, n. 1, pp. 206-214, 1969.
- Hall, F.G. The influence of varying oxygen tensions upon the rate of oxygen consumption in marine fishes. *Am. J. Physiol.*, v. 88, pp. 212-218, 1929.
- Heat, A.G. Water pollution and fish physiology. Second Edition. Lewis Publishers, CRC Press, 359p, 1995.
- Helfrich, L.A., Weigmann, D.L., Hipkins, P., Stinson, E.R. Pesticides and Aquatic Animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems. Virginia Cooperative Extension, n. 420-013, Virginia State University, 1996.
- Helle, K.B. Structures of functional interest in the myocardium of lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 76A, n. 3, pp. 447-452, 1983.
- Hochachka, P.W. *Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance*. Cambridge: Harvard University, 181p, 1980.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton Jr., G.A., Cairns Jr., J. Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers, CRC Press, 755p, 1995.
- 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, pp. 317-327, 1967.
- Hove-Madsen, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and force-frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, v. 167, pp. 47-60, 1992.
- Hove-Madsen, L., Llach, A., Tort, L. Quantification of  $Ca^{2+}$  uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 275, n. 44, pp. 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, pp. R1902-R1906, 2001.
- Hove-Madsen, L., Gesser, H. Force frequency relation in the myocardium of rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B*, v. 159, pp. 61-69, 1989.
- Hove-Madsen, L., Tort, L. L-type  $Ca^{2+}$  current and excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, v. 275, n. 44, pp. R2061-R2069, 1998.

- Howard, P.H. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals, Pesticides, vol. III, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1989.
- Huddart, H. The effect of some organophosphorus and organochlorine insecticides on contractility, membrane potential and calcium regulation on insect skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. C*, v. 58, n. 1, pp. 91-95, 1977.
- Hughes. G.M. Morphological measurements on the gills of fish in relation to their respiratory function. *Folia Morphol.*, v. 18, pp. 78-95, 1970.
- Hughes. G.M. Respiratory responses to hypoxia in fish. *Am. Zool.*, v. 13, pp. 475-189, 1973.
- Hughes, G. M., Albers, C., Münster, D., Götz, K.H. Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20 °C and the effects of hypoxia. *J. Fish Biol.*, v. 22, pp. 613-628, 1983.
- Hunn, J.B., Multer, E.P., DeFelice, M.S. Fish and Agricultural Chemicals: Safeguarding Your Pond. University of Missouri, MU Extension. Agricultural Engineering publications G1912, 1993. (<http://muextension.missouri.edu/xplor/agguides/agengin/q01912.htm>)
- Jones, L.R., Besch, H.R., Sutko, J.L., Willerson, J.T. Ryanodine-induced stimulation of net  $Ca^{++}$  uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 209, n. 1, pp. 48-55, 1979.
- 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. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 133p. São Carlos, SP, 1991.
- 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. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 101p. São Carlos, SP, 1996.
- Kalinin, A.L., Rantin, F.T., Fernandes, M.N., Glass, M.L. 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. (eds.). *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Manaus: INPA, 1996.
- Keen, J.E., Farrell, A.P., Tibbits, G.F., Brill, R.W. Cardiac physiology in tunas. II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force-frequency relationship in atrial strips from akipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Can. J. Zool.*, v. 70, pp. 1211-1217, 1992.
- Keen, J.E., Vianzon, D-M., Farrell, A.P., Tibbits, G.F. Effect of temperature and temperature acclimation on ryanodine sensitivity of the trout myocardium. *J. Comp. Physiol. B*, v. 164, pp. 438-443, 1994.
- Kidd, H. and James, D.R., Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.
- Korsmeyer, K.E., Lai, N.C., Knowler, T., Dewar, H., Shadwick, R.E., Graham, J.B. Cardiovascular function in swimming yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Am. Zool.*, v. 33, pp. 33-44, 1993.
- Kramer, D.L. The evolutionary ecology of respiratory mode in fishes: an analysis based on the costs of breathing. *Env. Biol. Fish*, v. 9, pp. 145-158, 1983.
- Laurent, P., Holmgren, S., Nilsson, S. Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v. 76, n. 3, pp. 525-542, 1983.
- Leknes, I.L. Morphometric analysis of myocardial cells in a teleost. *Anat. Anz.*, v. 155, pp. 169-172, 1984.

- Linden, J., Brooker, G. Evidence for persistent activation of cardiac slow channels in low-calcium solutions. *Am. J. Physiol.*, v. 242, n. 11, pp. H827-H833, 1982.
- Liu, P.S., Kao, L.S., Lin, M.K. Organophosphates inhibit catecholamine secretion and calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology*, v. 90(1-2), pp. 81-91, 1994.
- Lomholt, J.P., Johansen, K. Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. *Physiol. Zool.*, v. 52, pp. 38-49, 1979.
- Lowe-McConnell, R.H. Ecological studies in Tropical Fishes Communities. *Cambridge: Cambridge Academic Press*, 382p, 1987.
- Luo, M., Bodnaryk, R.P. The effect of insecticides on  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase and the ATP-dependent calcium pump in moth brain synaptosomes and synaptosome membrane vesicles from the bertha armyworm, *Mamestra configurata*. *Pesticide Biochem. Physiol.*, v. 30, pp. 155-165, 1988.
- Machado, M.R., Fanta, E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 46, n. 3, pp. 361-372, 2003.
- Marvin, D.E., Heat, A.G. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v. 27, pp. 349-355, 1968.
- Mattias, A.T. Estudo do comportamento de cascudo, *Hypostomus regani* (Ihering, 1905), frente à hipóxia ambiental: aspectos da fisiologia respiratória. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 76p. São Carlos, SP, 1996.
- 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, pp. 203-211, 1996.
- Meissner, G. Ryanodine activation and inhibition of the  $Ca^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, v. 261, n. 14, pp. 6300-6306, 1986.
- Menzer, R.E. Water and Soil Pollutants. In: Casarett and Doull's Toxicology, Fourth Edition. Amdur, M.O., Doull, J. and Klaassen, C.D., Eds. Pergamon Press, New York, NY, 1991.
- Møller-Nielsen, T., Gesser, H. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling at 20 and 10 °C in rainbow trout myocardium. *J. Comp. Physiol B*, v. 162, pp. 526-534, 1992.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C*, v. 143, pp. 141-149, 2006.
- Nilsson, S. Autonomic Nerve Function in the Vertebrates. Springer Verlag, Berlin, 248p, 1983.
- Nonnote, G., Maxime, V., Truchot, J.P., Williot, P., Peyraud, C. Respiratory responses to progressive ambient hypoxia in the sturgeon, *Ancipenser baeri*. *Respir. Physiol.*, v. 91, n. 1, pp. 71-82, 1993.
- Olle, C.D. Função cardíaca do teleósteo *Hoplias malabaricus* (teleostei, eruthrinidae) submetido a diferentes condições térmicas. . São Carlos, SP. 94 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2003.

- 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, pp. 349-355, 1980.
- Perry, S.F., Gilmour, K.M. Consequences of catecholamine release on ventilation and blood oxygen transport during hypoxia and hypercapnia in an elasmobranch (*Squalus acanthias*) and a teleost (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, v. 199, pp. 240-249, 1996.
- Perry, S.F., Wood, C.M. Control and coordination of gas transfer in fishes. *Can. J. Zool.*, v. 67, pp. 2961-2970, 1989.
- Portner, H.O., Grieshaber, M.K. Critical  $P_{cO_2}$  in oxyconforming animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: Bicudo, J.E.P.W. (ed). *The vertebrate gas transport cascade*. Adaptations to environment and mode of life. Boca Raton, CRC Press, pp. 330-357, 1993.
- Powers, D.A. Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. *Am. Zool.*, v. 20, pp. 139-162, 1980.
- Prasada Rao, K.S., Amad Salib, I.K., Ramana Rao, K.V. Methyl parathion (0-0-dimethyl 0-4-nitrophenyl thiophosphate) effects on whole-body and tissue respiration in the teleost, *Tilapia mossambica* (Peters). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 9, n. 3, pp. 339-345, 1985.
- Randall, D. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. *J. Exp. Biol.*, v. 100, pp. 275-288, 1982.
- 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., Randall, D.J., MacKinley, D. (eds.). *The Physiology Of Tropical Symposium Proceedings. International Congress On The Biology Of Fishes. Am. Fisheries Society – Physiology Section*. San Francisco State University, 141p, 1996.
- Rantin, F.T., Kalinin, A.L., Glass, M.L., Fernandes, M.N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life in two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J. Fish. Biol.*, v. 41, pp. 805-812, 1992.
- Rantin, F.T., Glass, M.L., Kalinin, A.L., Verzola, R.M.M. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. *Environ. Biol. Fish.*, v. 36, pp. 93-97, 1993.
- Rantin, F.T., Guerra, C.D.R., Kalinin, A.L., Glass, M.L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v. 119, pp. 991-997, 1998.
- Reddy, M.S., Rao, K.V. In vitro inhibition of  $Ca^{2+}$  ATPase by methylparathion in prawn: a kinetic approach. *Biochem. Int.*, v. 22(6), pp. 1053-1058, 1990.
- Rivaroli, L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimbata, *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae) and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Erythrinidae). *Comp. Biochem. Physiol. A*, v. 145, pp. 322-327, 2006.
- Rocha, M.L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., Effects of temperature and calcium availability on cardiac contractility in *Synbranchus marmoratus*, a neotropical teleost. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v. 146, pp. 544-550, 2007.
- Sahib, I.K.A., Rao, K.S.J., Rao, K.V.R. Effect of malathion exposure on some physical parameters of whole body and on tissue cations of teleost, *Tilapia mossambica* (Peters). *J. Biosci.*, v. 3(1), pp. 17-21, 1981.
- Santer, R.M. Morphology and innervation of the fish heart. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, v. 89, pp. 1-102, 1985.

- 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, pp. 817-862, 1962.
- Shiels, H.A., Farrell, A.P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing  $Ca^{2+}$  to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, v. 200, pp. 1607-1621, 1997.
- 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. A*, v. 125, pp. 331-341, 2000.
- Shiels, H.A., Freund, E.V., Farrell, A.P., Block, B.A. The sarcoplasmic reticulum plays major role in atrial muscle of yellowfin tuna. *J. Exp. Biol.*, v. 202, pp. 881-890, 1999.
- 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, pp. 2701-2710, 1998
- Solomon, H.M., Weis, J.S. Abnormal circulatory development in medaka caused by the insecticides carbaryl, malathion, and parathion. *Teratology.*, v. 19, pp. 51-62, 1979.
- Souza, R.H.S., Soncini, R., Glass, M., Sanches, J. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. *J. Comp. Physiol. B*, v. 171, n. 6, pp. 483-489, 2001.
- Stoss, F.W., Haines, T.A., The effects of toluene on embryos and fry of the Japanese medaka *Oryzias latipes* with a proposal for rapid determination of maximum acceptable toxicant concentration. *Environ. Pollut.*, v. 13, pp. 139-148, 1979.
- Sun, X., Liu, X., Martinez, R., Zhang, G. Effects of low concentrations of paraoxon on  $Ca^{2+}$  mobilization in a human parotid salivary cell-line HSY. *Arch. Oral Biol.*, v. 45, pp. 621-638, 2000.
- Sutko, J.L., Airey, J.A. Ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channels: does diversity in form equal diversity in function?. *Physiol. Rev.*, v. 76, n. 4, pp. 1027-1071, 1996.
- Tada, M., Kirchbergger, M.A., Repke, D.I., Katz, A.M. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, v. 249, n. 19, pp. 6174-6180, 1974.
- Takasusuki, J. Respostas respiratórias de cascudo preto, *Rhinelepis strigosa* (Agassiz, 1829) (Teleostei, Loricariidae), à hipóxia ambiental. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 78p. São Carlos, SP, 1994.
- Teuschler, L.K., Gennings, C., Hartley, W.R., Carter, H., Thiyagarajah, A., Schoeny, R., Cubbison, C. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, v. 58, pp. 1283-1291, 2005.
- Thillart, G. van den., Via, J.D., Vitali, G. Cortesi, P. 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, pp. 109-117, 1994.
- Tibbits, G.F., Hove-Madsen, L. Bers, D.M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. *Can. J. Zool.*, v. 69, pp. 2014-2019, 1991.
- Tibbits, G.F., Kashihara, H., Thomas, M.J., Keen, J.E., Farrell, A.P.  $Ca^{2+}$  transport in myocardial sarcolemma from rainbow trout. *Am. J. Physiol. R*, v. 259, n. 28, pp. R453-R460, 1990.

- 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.
- Val, A.L. Adaptations in fishes to extreme conditions in fresh waters. In: Bicudo, J.E.P.W. (ed). *The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life*. Boca Raton: CRC Press, pp. 43-53, 1993.
- Val, A.L., Honczarik, A. Criando Peixes na Amazônia. Manaus, AM, Editora do INPA, 160p, 1995.
- Varnagy, L., Deli, E. Comparative teratological study of insecticide Wofatox 50EC (methylparathion) on chicken and pheasant fetuses. *Anat. Anz. Jena*, v. 158(1-3), 1985.
- Villalobos, S.A. Hamm, J.T., Teh, S.J., Hinton, D.E. Thiobencarb-induced embryotoxicity in medaka (*Oryzias latipes*): stage-specific toxicity and the protective role of chorion. *Aquatic Toxicol.*, v. 48, pp. 309-326, 2000.
- Vornanen, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. *Comp. Biochem. Physiol. C*, v. 94, n. 2, pp. 477-483, 1989.
- Vornanen, M. Effect of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold-acclimated crucian carp heart. *J. Comp. Physiol. B*, v. 165, pp. 507-517, 1996.
- Vornanen, M. Sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channels in ventricular myocytes of a teleost fish. *Am. J. Physiol.*, v. 272, n. 41, pp. R1432-R1440, 1997.
- Vornanen, M. L-type Ca<sup>2+</sup> current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation. *J. Exp. Biol.*, v. 201, pp. 533-547, 1998.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M., Burt, J.P. SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 123, pp. 1-157, 1992.
- Weis, P., Weis, J.S. Cardiac malformations and other effects due to insecticides in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Teratology*, v. 10, pp. 263-268, 1974.
- Wier, W.G. Cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 52, pp. 467-485, 1990.
- Wood, S.C., Johansen, K. Adaptation to hypoxia in increased HbO<sub>2</sub> affinity and decreased red cell ATP concentration. *Nature new Biol.*, v. 237, pp. 278-279, 1972.
- Woodworth, R.S. Maximal contraction, "staircase" contraction, refractory period, and compensatory pause, of the heart. *Am. J. Physiol.*, v. 8, pp. 213-249, 1902.
- Yu, Z., Tibbits, G.F., McNeill, J.H. Cellular functions of diabetic cardiomyocytes: contractility, rapid-cooling contracture, and ryanodine binding. *Am. J. Physiol.*, v. 266, n. 35, pp. H2082-H2089, 1994.

