

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

**EFEITO DO ORGANOFOSFORADO TRICLORFON (NEGUVON®)  
SOBRE A FUNÇÃO CARDIO-RESPIRATÓRIA DA  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**JULIANA MONTOVANI THOMAZ**

**SÃO CARLOS**

**2008**

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

**EFEITO DO ORGANOFOSFORADO TRICLORFON (NEGUVON®)  
SOBRE A FUNÇÃO CARDIO-RESPIRATÓRIA DA  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**JULIANA MONTOVANI THOMAZ**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin**

**SÃO CARLOS**

**2008**

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

T465eo

Thomaz, Juliana Montovani.

Efeito do organofosforado triclorfon (Neguvon®) sobre a função cardio-respiratória da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Juliana Montovani Thomaz. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
97 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

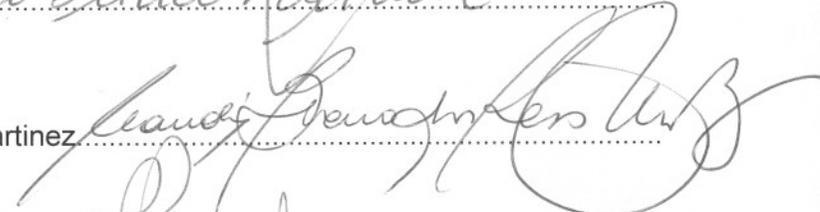
1. Inseticida organofosforado. 2. Triclorfon. 3. Função cardio-respiratória. 4. Tilápia do Nilo. I. Título.

CDD: 612.17 (20ª)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de Juliana Montovani Thomaz

Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin.....

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez.....

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

**ORIENTADORA:**

---

**Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin**

*Dedico este trabalho a meus pais, Ulysses Borelli Thomaz Junior e Lucelena Montovani Thomaz e a meu irmão, Marcelo Montovani Thomaz pelos ensinamentos, incentivo e amor, sempre.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin, pela oportunidade, confiança, amizade, exemplo profissional e apoio.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo amor, apoio, exemplo de força, persistência, competência, superação, sempre me motivando e mostrando que nada é impossível.

À minha avó, Santa Bosso Montovani, pela ajuda, apoio, incentivo e amor.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Piscicultura Águas Claras, pela doação dos peixes utilizados no presente estudo.

Ao corpo docente e funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas em especial ao Sr. Angelo e ao José Roberto Sanches.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pelo agradável convívio, pelos ensinamentos e contribuições ao presente trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas colaborações ao presente trabalho.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos, pelos momentos de lazer, incentivo, conselhos, enfim, por estarem presentes não importando quando, nem como. Em especial, aos amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, pela amizade, convívio e apoio, especialmente Kátia, Mônica, Fernanda, Anelli, André, Nathan, Rafael, Samuel, Thiago e Ste.

Aos queridos amigos Diana, Luciano, Daniella e Mariana, pela ótima amizade, exemplo, apoio, conselhos, risadas, ajuda e pelos inúmeros momentos divertidos.

À Profa. Dra. Ana Flávia de Carvalho, pela iniciação na vida científica.

Aos meus animais de estimação, responsáveis pelos agradáveis e extremamente necessários momentos de descontração e pelas lambidas amigas.

A todos que, apesar de não citados nominalmente, ajudaram direta ou indiretamente para meu crescimento pessoal e profissional e para a realização deste trabalho.

*"Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e, neste dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a humanidade"*

*Leonardo Da Vinci*

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 1  |
| 1.1 Contaminação ambiental .....                                      | 1  |
| 1.2 Triclorfon .....  | 4  |
| 1.2.1 Mecanismo de ação dos organofosforados .....                    | 6  |
| 1.2.2 Efeitos dos organofosforados em mamíferos .....                 | 7  |
| 1.2.3 Efeitos dos organofosforados em peixes .....                    | 7  |
| 1.3 Respostas cardio-respiratórias em peixes .....                    | 9  |
| 1.4 Acoplamento excitação-contração cardíaco em peixes .....          | 10 |
| 1.5 Considerações sobre a espécie estudada .....                      | 13 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 15 |
| 2.1 Objetivos Gerais .....  | 15 |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                       | 15 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                     | 16 |
| 3.1 Reagentes e Drogas .....  | 16 |
| 3.2 Animais .....   | 16 |
| 3.3 Determinação das características físico-químicas da água .....    | 17 |
| 3.3.1 pH e alcalinidade .....   | 17 |
| 3.3.2 Dureza total .....  | 17 |
| 3.3.3 Cloreto .....   | 18 |
| 3.3.4 Amônia total .....  | 18 |
| 3.3.5 Oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura ..... | 18 |
| 3.4 Experimentos <i>in vivo</i> .....                                 | 19 |
| 3.5 Massa ventricular relativa .....                                  | 23 |
| 3.6 Experimentos <i>in vitro</i> .....                                | 23 |
| 3.7 Protocolos experimentais .....                                    | 25 |
| 3.7.1 Experimentos <i>in vivo</i> .....                               | 25 |
| 3.7.1.1 Variáveis ventilatórias .....                                 | 25 |
| 3.7.1.2 Frequência cardíaca ( $f_H$ ) .....                           | 27 |
| 3.7.2 Experimentos <i>in vitro</i> .....                              | 27 |
| 3.7.2.1 Efeito do tempo experimental .....                            | 27 |
| 3.7.2.2 Aumento da concentração de cálcio extracelular .....          | 27 |
| 3.7.2.3 Aumento da frequência de estimulação .....                    | 28 |
| 3.7.2.4 Capacidade de bombeamento cardíaco .....                      | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 3.8 Forma de apresentação dos dados .....   | 29 |
| 3.8.1 Experimentos <i>in vivo</i> .....   | 29 |
| 3.8.2 Experimentos <i>in vitro</i> .....  | 29 |
| 3.9 Tratamento estatístico dos dados .....  | 30 |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | 32 |
| 4.1 Determinação das características físicas e químicas da água .....                 | 32 |
| 4.2 Experimentos <i>in vivo</i> .....   | 33 |
| 4.2.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e Tensão crítica de oxigênio ( $PcO_2$ ) ..... | 33 |
| 4.2.2 Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) .....                                      | 34 |
| 4.2.3 Frequência respiratória ( $f_R$ ) .....   | 38 |
| 4.2.4 Volume ventilatório ( $V_T$ ) .....   | 38 |
| 4.2.5 Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ) .....                     | 39 |
| 4.2.6 Extração de oxigênio ( $EO_2$ ) .....   | 43 |
| 4.2.7 Frequência cardíaca .....   | 45 |
| 4.2.8 Intervalo R-R .....   | 45 |
| 4.3 Massa ventricular relativa .....  | 48 |
| 4.4 Experimentos <i>in vitro</i> .....  | 49 |
| 4.4.1 Efeito do tempo experimental .....  | 49 |
| 4.4.2 Aumento da concentração de cálcio extracelular .....                            | 54 |
| 4.4.3 Aumento da frequência de estimulação .....                                      | 59 |
| 4.4.4 Capacidade de bombeamento cardíaco .....  | 67 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | 70 |
| 5.1 Experimentos <i>in vivo</i> .....   | 70 |
| 5.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e Tensão crítica de oxigênio ( $PcO_2$ ) ..... | 70 |
| 5.1.2 Parâmetros ventilatórios .....  | 72 |
| 5.1.3 Frequência cardíaca ( $f_H$ ) e intervalo R-R .....                             | 75 |
| 5.2 Massa ventricular relativa .....  | 77 |
| 5.3 Experimentos <i>in vitro</i> .....  | 78 |
| <b>6 CONCLUSÕES</b> .....   | 83 |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 85 |

## LISTA DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos e a aplicação direta de produtos químicos, como ocorre nos controles de vetores em campanhas de saúde pública, controle de plantas aquáticas e algas, entre outras práticas na aqüicultura (Modificado de TOMITA E BEYRUTH, 2002) .....   | 2  |
| <b>Figura 2:</b>  | Estrutura química do triclorfon (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007) .....  | 4  |
| <b>Figura 3:</b>  | Exemplares de <i>Argulus</i> (A) e <i>Lernaea</i> (B) (NOGA, 1996) .....  | 5  |
| <b>Figura 4:</b>  | Exemplar de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> .....   | 14 |
| <b>Figura 5:</b>  | Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias de <i>Oreochromis niloticus</i> . Em <b>A:</b> <b>a.</b> cubeta termostatzada com eletrodos de O <sub>2</sub> ; <b>b.</b> transdutor de pressão; <b>c.</b> analisadores de O <sub>2</sub> ; <b>d.</b> amplificador de pressão; <b>e.</b> amplificador de ECG; <b>f.</b> microcomputador com sistema de aquisição de dados; <b>g.</b> torneira de 3 vias. Em <b>B:</b> Detalhe de um eletrodo de ECG e do cateter para medidas de PO <sub>2</sub> : <b>a.</b> extremidade da agulha; <b>b.</b> pedaço de cateter com a extremidade flangeada; <b>c.</b> revestimento termo-retrátil; <b>d.</b> fixação do fio de cobre; <b>e.</b> fio de cobre encapado; <b>f.</b> cateter de polietileno com a extremidade flangeada para a tomada de água; <b>g.</b> peça de fixação (adaptado de MASSARI, 1993) .....   | 20 |
| <b>Figura 6:</b>  | Detalhe do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos <i>in vivo</i> . As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro .....  | 21 |
| <b>Figura 7:</b>  | Sistema de respirometria de fluxo constante e respostas cardíacas utilizado no presente estudo. <b>a.</b> respirômetro; <b>b.</b> , <b>c.</b> cateteres de polietileno para tomada da água que entra (P <sub>in</sub> O <sub>2</sub> ) e que sai (P <sub>out</sub> O <sub>2</sub> ) do respirômetro, respectivamente; <b>d.</b> , <b>e.</b> cateteres de polietileno para tomada da água inspirada (P <sub>i</sub> O <sub>2</sub> ) e expirada (P <sub>e</sub> O <sub>2</sub> ), respectivamente; <b>f.</b> eletrodo cardíaco; <b>g.</b> eletrodo de referência; <b>h.</b> torneiras de 3 vias; <b>i.</b> transdutor de pressão; <b>j.</b> cubetas termostatzadas com eletrodos de O <sub>2</sub> ; <b>k.</b> analisadores de O <sub>2</sub> ; <b>l.</b> monitor cardíaco; <b>m.</b> amplificador de ECG; <b>n.</b> amplificador de pressão; <b>o.</b> computador com sistema de aquisição de dados; <b>p.</b> frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; <b>q.</b> bomba para circulação de água; <b>r.</b> balde; <b>s.</b> controlador de temperatura; <b>t.</b> entrada de quantidades controladas de N <sub>2</sub> ou ar comprimido (adaptado de MASSARI, 1993) ..... | 22 |
| <b>Figura 8:</b>  | <i>Set</i> experimental utilizado para a obtenção das respostas inotrópicas <i>in vitro</i> das tiras ventriculares de tilápia-do-Nilo. <b>A:</b> banho com quatro cubetas; <b>B:</b> banho termostatzado; <b>C:</b> cilindro de mistura carbogênica; <b>D:</b> estimuladores elétricos; <b>E:</b> transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; <b>F:</b> amplificador de força; <b>G:</b> sistema informatizado de aquisição e tratamento dos dados .....   | 24 |
| <b>Figura 9:</b>  | <b>A:</b> Esquema da cubeta experimental: <b>a.</b> transdutor de força; <b>b.</b> fio de fixação e estiramento da preparação; <b>c.</b> argola metálica; <b>d.</b> tira ventricular; <b>e.</b> eletrodo de estimulação; <b>f.</b> entrada de mistura carbogênica; <b>g.</b> entrada de água para termostatizar a cubeta; <b>h.</b> saída de água da cubeta (cedido por Rivaroli, L.). <b>B:</b> Foto da cubeta descrita em A .....   | 25 |
| <b>Figura 10:</b> | Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo. Fc: Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50% do relaxamento .....  | 30 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 11:</b> | Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....      | 35 |
| <b>Figura 12:</b> | Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ - mmHg) sobre a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ - mL $O_2$ .kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) de <i>O. niloticus</i> do grupo controle (n = 7). A seta representa a $PcO_2$ .....   | 36 |
| <b>Figura 13:</b> | Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ - mmHg) sobre a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ - mL $O_2$ .kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) de <i>O. niloticus</i> do grupo exposto ao TRC (n = 7). A seta representa a $PcO_2$ .....   | 36 |
| <b>Figura 14:</b> | Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. .... | 37 |
| <b>Figura 15:</b> | Frequência respiratória ( $f_R$ ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....    | 40 |
| <b>Figura 16:</b> | Volume ventilatório ( $V_T$ ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....        | 41 |
| <b>Figura 17:</b> | Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Valores médios ± E.P.M. ....   | 42 |
| <b>Figura 18:</b> | Extração de oxigênio ( $EO_2$ ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg) (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....  | 44 |
| <b>Figura 19:</b> | Frequência cardíaca ( $f_H$ ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....        | 46 |
| <b>Figura 20:</b> | Intervalo R-R de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....                         | 47 |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 21:</b> | Massa ventricular relativa (%) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 10) e exposto ao TRC (n = 10). O asterisco indica diferença significativa entre os grupos experimentais (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....  | 48 |
| <b>Figura 22:</b> | Efeito do tempo experimental (40 minutos) no desenvolvimento de força de contração isométrica (Fc) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) .....  | 50 |
| <b>Figura 23:</b> | Efeito do tempo experimental (40 minutos) nos tempos para o pico de tensão (TPT - ms) e para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) .....  | 52 |
| <b>Figura 24:</b> | Efeito do tempo experimental (40 minutos) na relação TPT/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) e THR/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) .....  | 53 |
| <b>Figura 25:</b> | Efeito da elevação gradual na concentração extracelular de Ca <sup>2+</sup> no desenvolvimento de força (Fc) pelas tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) .....  | 55 |
| <b>Figura 26:</b> | Efeito da elevação gradual na concentração extracelular de Ca <sup>2+</sup> nos tempos para o pico de tensão (TPT - ms) e para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12) .....  | 57 |
| <b>Figura 27:</b> | Efeito da elevação gradual na concentração extracelular de Ca <sup>2+</sup> nas relações TPT/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) e THR/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) ..... | 58 |
| <b>Figura 28:</b> | Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração (Fc) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> , dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) .....   | 62 |
| <b>Figura 29:</b> | Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> , dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz) (P < 0,05) ...   | 64 |
| <b>Figura 30:</b> | Efeito do aumento da frequência de estimulação nas relações TPT/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) e THR/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) .....                              | 66 |
| <b>Figura 31:</b> | Capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mN.mm <sup>-2</sup> .min <sup>-1</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) ..  | 69 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> | Características físico-químicas da água do grupo controle e exposto a 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de TRC, medidas ao longo do período experimental. Os valores são médias ± E.P.M. ....  | 32 |
| <b>Tabela 2:</b> | Valores médios da taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ - mL O <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) de <i>O. niloticus</i> , dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O <sub>2</sub> da água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....                | 35 |
| <b>Tabela 3:</b> | Valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ - mL H <sub>2</sub> O.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) de <i>O. niloticus</i> , dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O <sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....         | 37 |
| <b>Tabela 4:</b> | Valores médios da frequência respiratória ( $f_R$ - ciclos respiratórios.min <sup>-1</sup> ) de <i>O. niloticus</i> , dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O <sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....                             | 40 |
| <b>Tabela 5:</b> | Valores médios do volume ventilatório ( $V_T$ - mL H <sub>2</sub> O.kg <sup>-1</sup> .ciclo respiratório <sup>-1</sup> ) de <i>O. niloticus</i> , dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O <sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. .... | 41 |
| <b>Tabela 6:</b> | Valores médios da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ - mL H <sub>2</sub> O.mL O <sub>2</sub> <sup>-1</sup> ) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O <sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg) (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....   | 42 |
| <b>Tabela 7:</b> | Valores médios da extração de O <sub>2</sub> (EO <sub>2</sub> - %) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O <sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg) (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....  | 44 |
| <b>Tabela 8:</b> | Valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$ - bpm) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O <sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ...  | 46 |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Tabela 9:</b>  | Valores médios do intervalo R-R (s) de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à diferentes tensões de O <sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....   | 47 |
| <b>Tabela 10:</b> | Valores da força de contração isométrica (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> nos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 0,2 Hz. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05) .....   | 50 |
| <b>Tabela 11:</b> | Valores do tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> , nos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 0,2 Hz. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....   | 51 |
| <b>Tabela 12:</b> | Valores da relação TPT/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) e THR/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 0,2 Hz. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....   | 51 |
| <b>Tabela 13:</b> | Valores da força de contração isométrica (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de Ca <sup>2+</sup> . Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....   | 55 |
| <b>Tabela 14:</b> | Valores do tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de Ca <sup>2+</sup> . (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....  | 56 |
| <b>Tabela 15:</b> | Valores da relação TPT/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) e THR/Fc (ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de Ca <sup>2+</sup> . Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. .... | 56 |
| <b>Tabela 16:</b> | Valores da força de contração (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ...   | 61 |
| <b>Tabela 17:</b> | Valores do tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de <i>O. niloticus</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos iniciais (0,2 Hz) (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M. ....  | 63 |

- Tabela 18:** Valores da na relação TPT/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) e THR/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, nos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M. .... 65
- Tabela 19:** Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $\text{mN.mm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M. .... 68

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| $\alpha_{O_2}$         | Coeficiente de solubilidade do oxigênio na água                       |
| $[Ca^{2+}]_e$          | Concentração de cálcio extracelular                                   |
| ACh                    | Acetilcolina  |
| AChE                   | Acetilcolinesterase   |
| CBC                    | Capacidade de bombeamento cardíaco                                    |
| ECG                    | Eletrocardiograma   |
| EO <sub>2</sub>        | Extração de O <sub>2</sub> da corrente ventilatória                   |
| F <sub>c</sub>         | Força de contração  |
| $f_H$                  | Frequência cardíaca   |
| $f_R$                  | Frequência respiratória   |
| MVR                    | Massa ventricular relativa  |
| NCX                    | Trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>                            |
| OP                     | Organofosforado   |
| PcO <sub>2</sub>       | Tensão crítica de oxigênio  |
| PeO <sub>2</sub>       | Tensão de oxigênio da água expirada pelo animal                       |
| PinO <sub>2</sub>      | Tensão de oxigênio da água de entrada do respirômetro                 |
| PiO <sub>2</sub>       | Tensão de oxigênio da água inspirada pelo animal                      |
| PoutO <sub>2</sub>     | Tensão de oxigênio da água de saída do respirômetro                   |
| RS                     | Reticulo sarcoplasmático  |
| SL                     | Sarcolema   |
| THR                    | Tempo para 50% de relaxamento   |
| THR/F <sub>c</sub>     | Razão entre tempo para 50% do relaxamento e 1/2 da força de contração |
| TPT                    | Tempos para o pico máximo de força                                    |
| TPT/F <sub>c</sub>     | Razão entre tempo para o pico de força e força de contração           |
| TRC                    | Triclorfon  |
| $\dot{V}_G$            | Ventilação branquial  |
| $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ | Necessidade ventilatória  |
| $\dot{V}O_2$           | Taxa metabólica   |
| $\dot{V}_R$            | Fluxo de água através do respirômetro (mL.min <sup>-1</sup> )         |

## RESUMO

O trichlorfon (TRC) é um composto organofosforado (OP) amplamente utilizado para o controle de uma variedade de artrópodes parasitas, tanto como inseticida na agricultura quanto como vermicida. Em pisciculturas brasileiras, o TRC é utilizado para controlar infestações por *Lernaea* sp e *Argulus* sp, dois ectoparasitas causadores de epizootias. Para esse fim, as doses recomendadas variam de 0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, embora doses excessivas sejam comumente aplicadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição a uma dose subletal de TRC (0,5 mg.L<sup>-1</sup> trichlorfon - NEGUVON<sup>®</sup>, durante 96 h) sobre a função cardio-respiratória *in vivo* e *in vitro* de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. A exposição ao TRC causou hipertrofia cardíaca possivelmente devido ao efeito hipertensivo dos OPs e/ou pelo estresse oxidativo induzido pelo TRC no tecido cardíaco. O TRC reduziu a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e aumentou marcadamente a tensão crítica de O<sub>2</sub> (PcO<sub>2</sub>), reduzindo a capacidade de manutenção da  $\dot{V}O_2$  constante. A ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) aumentou significativa e progressivamente em ambos os grupos experimentais para manter a  $\dot{V}O_2$  durante a hipóxia. Os aumentos na  $\dot{V}_G$  foram caracterizados por aumentos no volume ventilatório (V<sub>T</sub>), enquanto que a frequência respiratória (f<sub>R</sub>) alterou muito pouco. Uma possível explicação para os menores valores de f<sub>R</sub> registrados para o grupo TRC seria o rápido efeito dos OPs sobre os nervos respiratórios devido aos seus efeitos anticolinesterásicos. A menor f<sub>R</sub> induzida pelo TRC afetou a  $\dot{V}_G$  durante a hipóxia severa, uma vez que este grupo apresentou maiores valores de V<sub>T</sub> em relação ao grupo controle (C) apenas em normóxia e hipóxia moderada. A frequência cardíaca (f<sub>H</sub>) foi significativamente reduzida pelo TRC em todas as PO<sub>2</sub> experimentais. Ambos os grupos experimentais mantiveram a f<sub>H</sub> constante, desenvolvendo bradicardia apenas a 20 mmHg. A razão para a redução da  $\dot{V}O_2$  antes da ocorrência de bradicardia hipóxica poderia ser a inibição dos sensores de O<sub>2</sub> das brânquias pelos OPs, bloqueando, desta forma, o reflexo bradicárdico ou, alternativamente, indicando que o TRC estaria atuando diretamente nos nervos respiratórios e não via sistema nervoso central. O efeito mais marcante do TRC sobre o músculo cardíaco isolado foi a significativa redução na força de contração (Fc). Aumentos na concentração de Ca<sup>2+</sup> extracelular causaram inotropismo positivo em ambos os grupos experimentais, mas não foram capazes de restaurar os valores controle para o grupo TRC, indicando que a disponibilidade de Ca<sup>2+</sup> extracelular não é um fator predominante para reverter o inotropismo negativo causado pelo TRC. Em ambos os grupos experimentais, a Fc diminuiu durante os aumentos na frequência de estimulação, resultando em uma relação força-frequência negativa. Contudo, a exposição ao TRC deslocou a curva de frequência máxima para baixo, devido a seu efeito inotrópico negativo, mostrando que a capacidade de bombeamento cardíaco também é prejudicada por este OP. Em conjunto, os resultados mostram que o TRC prejudica significativamente a função cardio-respiratória da tilápia-do-Nilo, reduzindo suas chances de sobrevivência a prolongados períodos de exposição à hipóxia ambiental.

## ABSTRACT

Trichlorfon (TRC) is a selective organophosphate compound (OPC) widely used to control a variety of arthropod pests, both as an agricultural insecticide and zoo vermicide. In Brazilian fish cultures, TRC is largely used to control *Lernaea* sp and *Argulus* sp, two common ectoparasites causing epizooties. The recommended doses vary from 0.1 to 1.0 mg.L<sup>-1</sup>, but farmers often apply excessive amounts of TRC in fish and agriculture farm management. The goal of this work was to evaluate the sublethal effects of TRC (0.5 mg.L<sup>-1</sup> trichlorfon – NEGUVON<sup>®</sup>, during 96 h exposure) on *in vivo* and *in vitro* cardio-respiratory function of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The exposure to TRC caused cardiac hypertrophy which would be probably related to the hypertensive effect of the OPCs and/or to the oxidative stress induced by TRC in the heart. TRC not only decreased oxygen uptake ( $\dot{V}O_2$ ) values but also increased markedly the critical oxygen tension (PcO<sub>2</sub>), reducing the ability to maintain a constant O<sub>2</sub> uptake. Gill ventilation ( $\dot{V}_G$ ) increased significantly and progressively in both experimental groups to maintain  $\dot{V}O_2$  during hypoxia. These increases in  $\dot{V}_G$  were characterized by larger increases in the tidal volume (V<sub>T</sub>), whereas respiratory frequency (f<sub>R</sub>) changed little. A possible explanation for the reduced f<sub>R</sub> recorded for the TRC group would be a rapid effect of the OPCs in the respiratory nerves due to its anticholinesterasic effect. The lower f<sub>R</sub> induced by TRC exposure affected  $\dot{V}_G$  during severe hypoxia as this group presented higher V<sub>T</sub> values, when compared to the controls (C group), only in normoxia and moderate hypoxia. The exposure to TRC significantly reduced heart rate (f<sub>H</sub>) in all the experimental PO<sub>2</sub>, when compared to control values. Both C and TRC groups maintained a constant f<sub>H</sub> and bradycardia was developed at 20 mmHg. The reason for the early reduction in  $\dot{V}O_2$  without hypoxic bradycardia could be the inhibition of the oxygen sensors located in the gills by OPCs, which block the hypoxic bradycardia reflex or, alternatively, an indication that this OPC acts directly on the respiratory nerves and not *via* the central nervous system. The most remarkable effect of TRC exposure in heart muscle preparations was a significant decrease in force development, when compared to C group. Increases in extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration caused a positive inotropic effect in both experimental groups, but not sufficient to restore the values developed by the controls in TRC group, which indicates that extracellular Ca<sup>2+</sup> availability is not a predominant factor to counteract the negative inotropism caused by TRC. In both experimental groups, contractile force decreases as stimulation frequency increases, resulting in a negative force-frequency relationship. However, exposure to TRC changed the curve of maximum frequency downward due to its negative effect on force development, showing that the pumping capacity is also injured by this OPC. Taken together, the results show that TRC significantly impairs the Nile tilapia's cardio-respiratory function, reducing the species capacity to survive prolonged hypoxic conditions.

## 1 INTRODUÇÃO

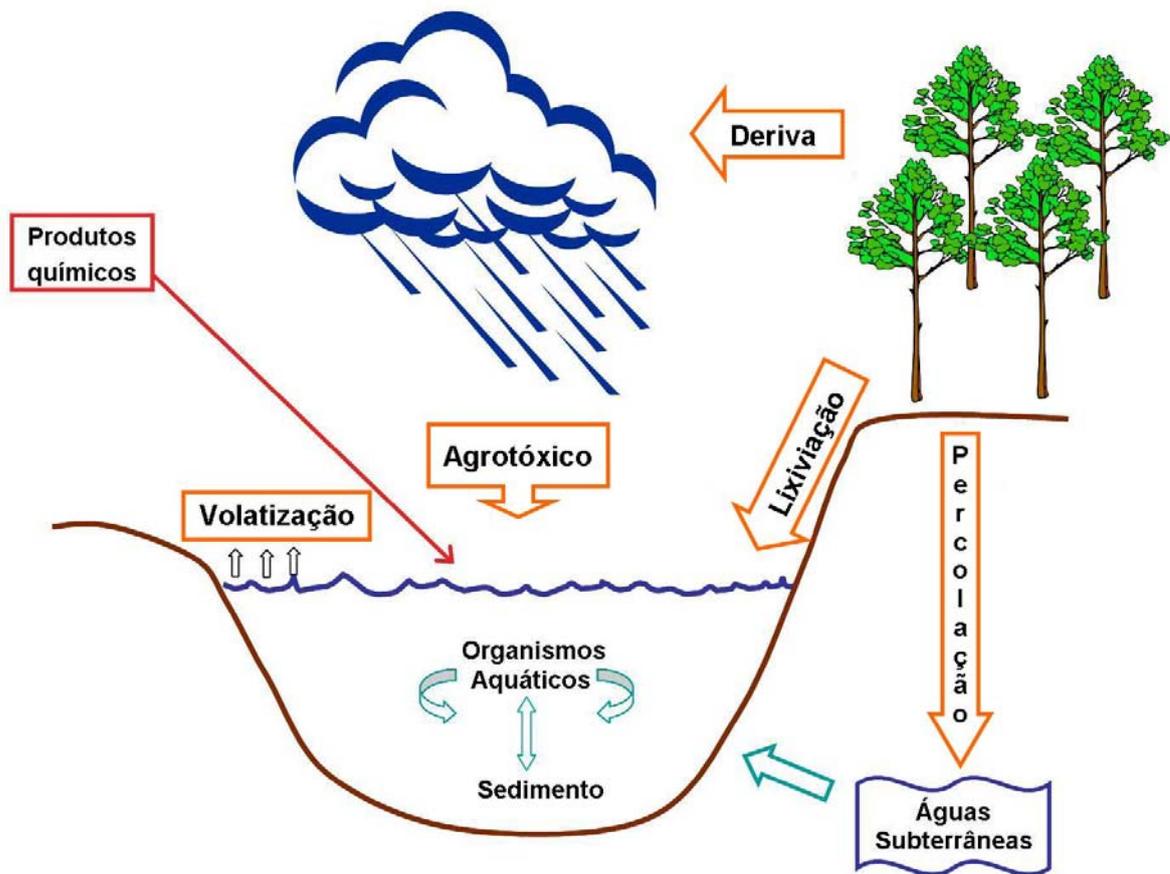
### 1.1 Contaminação ambiental

Atualmente a degradação dos recursos hídricos é alvo de grandes preocupações, principalmente em razão da intensa atividade antropogênica sobre o meio ambiente, a qual vem provocando grande impacto nos ecossistemas aquáticos, podendo causar danos diretos ou indiretos à biota associada e comprometer a saúde e a sobrevivência dos organismos expostos (CAJARAVILLE et al., 2000).

Compostos orgânicos de origem natural ou sintética, denominados xenobióticos, penetram e são difundidos nos ecossistemas aquáticos por várias rotas, incluindo a descarga proveniente de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de lixo químico e os esgotos domésticos. Assim, esses ecossistemas estão sujeitos à contaminação por uma ampla gama de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos e outros contaminantes, os quais podem ser incorporados pelos tecidos de invertebrados e vertebrados que habitam esses ambientes (COOPER, 1993; LIVINGSTONNE, 1998, 2001).

Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos a partir dos locais onde foram utilizados, através da aplicação intencional, deriva (movimento das gotas provenientes de pulverização fora da área alvo) e/ou lixiviação (processo superficial responsável pela lavagem do solo pela chuva, provocando o carreamento dos agrotóxicos). A percolação, que é o deslocamento da água através do perfil dos solos, pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos, local de difícil descontaminação (NETO & SIQUEIRA, 2005; TOMITA E BEYRUTH, 2002; ZILBERMAN, 1997) (Figura 1).

Adicionalmente, a aplicação direta de substâncias no ambiente hídrico, como os agrotóxicos, também têm interferência nesses ecossistemas. Esse procedimento é realizado com objetivo de controlar espécies nocivas ou proteger espécies úteis, de acordo com interesses e necessidades, assim como ocorre nos controles de vetores em campanhas de saúde pública, controle de plantas aquáticas e algas e em determinadas práticas de manejo na aquicultura (Figura 1) (MAXIMIANO et al., 2005; TAUILL, 2006).



**Figura 1:** Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos e a aplicação direta de produtos químicos, como ocorre nos controles de vetores em campanhas de saúde pública, controle de plantas aquáticas e algas, entre outras práticas na aqüicultura (Modificado de TOMITA E BEYRUTH, 2002).

Uma vez presentes nos ambientes aquáticos, estes compostos afetam a fauna íctica e, 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 (KLEIN et al., 2004).

A aqüicultura é uma importante fonte de proteína animal, apresentando-se em constante expansão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2008). O Brasil apresenta um enorme potencial para este crescimento devido a características como condições climáticas adequadas, grande rede hídrica e grande área coberta por reservatórios (ZANIBONI FILHO, 1997).

Em sistemas de cultivo de peixes, a penetração de parasitas e agentes patogênicos torna-se facilitada pelo confinamento em tanques, pela alta densidade populacional e pela introdução de espécies exóticas, sem os cuidados sanitários necessários. Para prevenir e controlar os danos decorrentes, torna-se necessária a intervenção humana, por meio do uso de

produtos químicos os quais são utilizados, comumente, de forma indiscriminada (KLEIN et al., 2004; MAXIMIANO et al., 2005), principalmente devido a escassez de informações a respeito das dosagens, da estabilidade dos produtos na água e nos alimentos e das taxas de bioacumulação (MUNDAY et al., 1992; SCHALCH et al., 2005). Além disso, a falta de controle sobre a utilização destas substâncias dificulta ou mesmo impede a implementação de uma legislação eficiente, principalmente nos países em desenvolvimento (MAXIMIANO et al., 2005).

Desta forma, os organismos aquáticos estão freqüentemente expostos a produtos tóxicos e podem acumulá-los em concentrações excessivas (DORES & De-LAMONICA-FREIRE, 2001; RAND & PETROCELLI, 1984). Os peixes são particularmente sensíveis à contaminação ambiental e a presença de poluentes pode interferir significativamente em determinados processos fisiológicos e bioquímicos (LANG et al., 1997).

Além da toxicidade aguda direta, a presença de produtos químicos nos ecossistemas aquáticos pode resultar na morte de peixes devido a efeitos secundários, como a depleção de O<sub>2</sub> nos corpos d'água, já que o nível de oxigênio dissolvido geralmente é reduzido em águas poluídas. Adicionalmente, muitas respostas fisiológicas de peixes a xenobióticos em concentração aguda, são similares àquelas produzidas em resposta a hipóxia ambiental (HEATH, 1995).

As alterações observadas em peixes devido à presença de xenobióticos no ambiente aquático também podem estar relacionadas ao estresse desencadeado pela própria exposição, levando a um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas com uma ação compensatória e/ou adaptativa. No caso de um estresse intenso e constante, a resposta fisiológica pode perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, acarretando danos permanentes à sua saúde e bem-estar (CARMICHAEL, 1984).

Embora a concentração da maioria dos pesticidas seja baixa por serem, comumente, pouco solúveis em água e também devido ao efeito de diluição, não se pode excluir a possibilidade de serem encontradas concentrações elevadas após pesadas chuvas, especialmente quando as áreas ao redor tenham sido recentemente expostas a altas doses destes pesticidas (DORES & De-LAMONICA-FREIRE, 2001).

Entre os pesticidas, merecem destaque os organofosforados (OPs), os quais constituem uma classe importante de inseticidas, acaricidas, nematicidas e fungicidas utilizados no combate a diversos tipos de pragas na agricultura e, em geral, no tratamento de ectoparasitas em animais (RODRIGUES et al., 2001). No Brasil, até o ano de 2000, esta classe de pesticidas representava aproximadamente 40% do consumo total de inseticidas

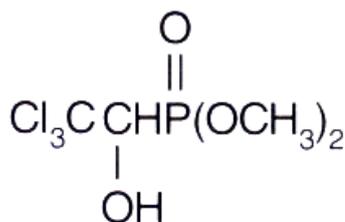
(KUBOTA, 2000) e de acordo com Vitozzi & De Angelis (1991), aproximadamente um terço dos OPs são seletivamente tóxicos aos peixes.

Os efeitos tóxicos dos OPs têm sido atribuídos basicamente à sua ação em inibir a acetilcolinesterase (AChE), levando a uma hiperatividade do sistema colinérgico, uma vez que a acetilcolina não é rapidamente hidrolisada, resultando em estimulação colinérgica contínua (JOKANOVIC, 2001). Entretanto, os efeitos dos OPs não se restringem à inibição da AChE. Eles são capazes de induzir apoptose (CARLSON et al., 2000), provocar ataxia e paralisia (JOHNSON, 1982), danos em membranas celulares (TONKOPII, 2003) e induzir geração de espécies reativas de oxigênio *in vitro* e *in vivo* (BAGCHI et al., 1995).

Um composto constantemente utilizado no tratamento de ectoparasitas em peixes é o triclorfon, um inseticida organofosforado comumente comercializado como NEGUVON®.

## 1.2 Triclorfon

O triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroxi metil fosfonato) (Figura 2) é um inseticida e acaricida organofosforado, solúvel em água, amplamente utilizado no controle de várias pragas em campos, lares, plantas ornamentais e contra parasitas em animais domésticos e peixes (LOPES et al., 2006).



**Figura 2:** Estrutura química do triclorfon (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

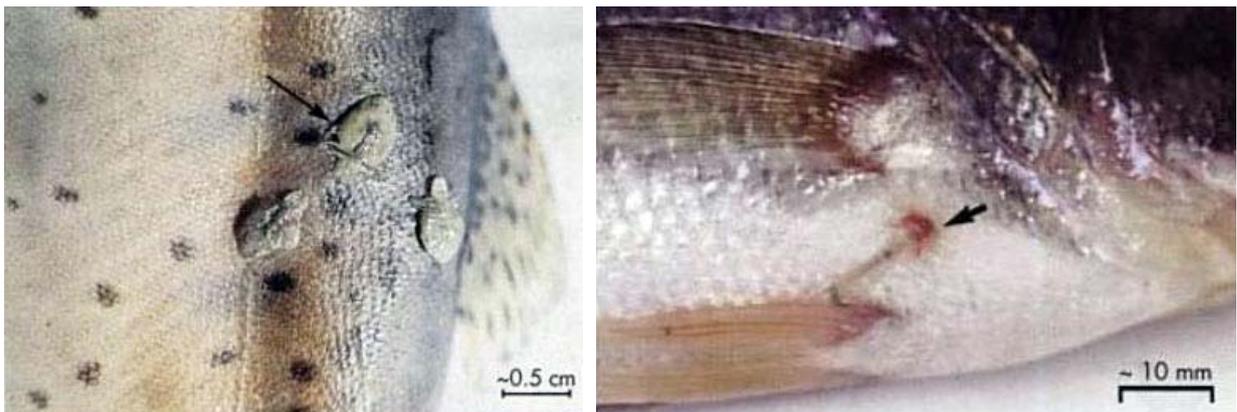
No ambiente, o triclorfon (TRC) possui curta duração e é degradado rapidamente em solos aeróbios, com meia-vida estimada entre três e 27 dias. Apresenta baixa persistência no solo, não sendo adsorvido e, desta forma, tende a ir para águas subterrâneas. É solúvel em água e estável em condições ácidas, apresentando meia-vida de 31 minutos em pH 9, de 34 horas em pH 7 e de 104 dias em pH 5 (EXTOXNET, 1996; EPA, 1997). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é classificado como de classe toxicológica II – altamente tóxico.

A hidrólise do TRC ocorre rapidamente, gerando o metabólito diclorvós, que é um organofosforado extremamente tóxico, devido a sua alta atividade anticolinesterásica (HIRATA et al., 2003).

A Resolução nº 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) classifica os corpos d'água naturais e fixa parâmetros para lançamento de efluentes e estabelece que as águas de classe I, destinadas à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral, devem apresentar níveis máximos de concentração de pesticidas organofosforados de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Embora o TRC seja amplamente utilizado no Brasil, existem poucos dados sobre a presença deste OP em ambientes aquáticos brasileiros. Marques et al. (2002) detectaram a presença de TRC em amostras de águas de superfície e de fundo, oriundas da barragem de Boa Esperança (PI/MA), nas concentrações de  $34,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $15,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente.

Em pisciculturas brasileiras, o TRC é utilizado no controle de infestações por *Argulus* sp e *Lernaea* sp (Figura 3), dois tipos comuns de crustáceos ectoparasitas encontrados em uma grande variedade de peixes (LOPES et al., 2006; PAVANELLI et al., 2002). Em casos de infestação por parasitas monogenéticos (girodactíleos e dactilogirídeos), o TRC também é indicado (GOVEN et al, 1980; PAVANELLI et al., 2002).

**A****B**

**Figura 3:** Exemplos de *Argulus* (A) e *Lernaea* (B) (NOGA, 1996).

Ao se alimentarem, o *Argulus* sp (subclasse Branchiura) e a *Lernaea* sp (subclasse Copepoda) provocam lesões ulcerosas nos peixes e, em casos mais graves, chegam a comprometer a musculatura. Estas lesões podem causar hemorragias intensas e propiciar a penetração e instalação de fungos e bactérias (PAVANELLI et al., 2002; SHIMURA et al., 1983). Assim, o uso do TRC é visto pelos piscicultores como uma alternativa para diminuir as perdas econômicas ocasionadas por esses parasitas em suas criações.

Segundo Pavanelli et al. (2002), banhos de longa duração, na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TRC, durante 3 dias consecutivos, são muito eficazes contra infestação parasitária.

Embora as doses de TRC para erradicar ectoparasitas varie de 0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, geralmente os produtores aplicam quantidades excessivas desse composto (CHANG et al., 2006). Assim, o uso indiscriminado do TRC na piscicultura e, em altas concentrações, pode levar à intoxicação, sobretudo por ser utilizado na forma de banhos, onde é absorvido, principalmente, pelas brânquias e superfície corporal, podendo ocasionar efeitos subletais ou letais (VARÓ et al., 2003; VEIGA et al., 2002).

### 1.2.1 Mecanismo de ação dos organofosforados

Os OPs são potentes inibidores da acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pela rápida degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em produtos inativos (colina e ácido acético). Uma vez liberada, a ACh se liga a receptores nicotínicos (ionotrópicos) e muscarínicos (metabotrópicos), causando efeitos variados nos diferentes tecidos (FUKUTO, 1990).

O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos serina, histidina e glutamato. O mecanismo de hidrólise envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água, recupera o sítio catalítico da enzima (VIEGAS JUNIOR et al., 2004).

Os OPs inibem a AChE através da interação do sítio ativo da serina para formar um derivado enzimático fosforilado. A reação é análoga àquela com o substrato acetilcolina, exceto que o derivado é muito mais resistente às hidrólises subseqüentes que o derivado acetilado e a inibição é, basicamente, irreversível. A frequência de reativação varia de acordo com a estrutura química do OP, localização celular e forma da enzima. Existem diferentes

formas polimórficas de AChE mesmo em uma mesma espécie, cada qual com seu padrão de inibição e reativação (INESTROSA & PERELMAN, 1989)

A intoxicação aguda leva a uma combinação de sintomas muscarínicos e nicotínicos em diferentes espécies e a severidade varia de acordo com a dose, rota e extensão da exposição. Em muitos casos, a insuficiência respiratória é a principal causa de morte (MARRS, 1996).

Devido às características lipofílicas, os inseticidas também podem acumular-se nas regiões lipídicas das membranas, induzindo alterações físicas e químicas (VIDEIRA et al., 1996).

### 1.2.2 Efeitos dos organofosforados em mamíferos

Em mamíferos, os principais sinais de intoxicação por OPs observados são salivação, sudorese, diarreia, tremores, distúrbios cardio-respiratórios (decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia), sendo estas as principais causas de mortalidade por tais produtos (ECOBICHON & JOY, 1991).

Uma vez que a insuficiência respiratória é uma das conseqüências mais graves das intoxicações por organofosforados, é possível que comprometimento da musculatura esquelética, sobretudo da musculatura respiratória contribua para tal efeito, o qual ocorre devido à disfunção do sistema nervoso autônomo (CAVALIERE et al., 1996).

### 1.2.3 Efeitos dos organofosforados em peixes

Os efeitos dos OPs no sistema cardio-respiratório de peixes incluem bradicardia e inibição da ventilação (GEHRKE, 1988). Olle (2007) verificou em matrinxã (*Brycon cephalus*), que o OP metil paration em concentração subletal ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ , 1/3 da  $CL_{50}$  - 96 h) reduziu significativamente a frequência cardíaca *in vivo*, bem como a força de contração *in vitro* e aumentou o tempo para 50% de relaxamento (THR), fornecendo evidências do efeito deste OP no manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  ventricular dessa espécie.

Dados específicos sobre o TRC mostraram que, embora apresente baixo potencial para bioconcentração em peixes e curta meia-vida na água (LOPES et al., 2006), este OP apresentou efeitos imunossupressivos *in vitro* e *in vivo* em peixes, envolvendo efeitos tóxicos

direto nas células e/ou órgãos imunes ou efeito indireto já que o sistema neuroendócrino é o alvo principal dos poluentes (DUNIER et al. 1991, DUNIER & SIWIKI, 1993).

Embora Chandrasekara & Pathiratne (2005), não tenham observado mortalidade em espécimes de carpa comum (*Cyprinus carpio*) expostas a 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TRC durante 1 e 24 h, estes animais apresentaram leucopenia (redução da taxa sanguínea de leucócitos, abaixo do limite da normalidade) e linfocitopenia (redução da taxa sanguínea de linfócitos, abaixo do limite da normalidade), as quais não retornaram aos valores normais, mesmo quando os peixes foram transferidos para água limpa por sete dias, indicando um comprometimento na resposta imune.

Em altas concentrações, o TRC inibe a AChE cerebral em peixes (DUNIER et al. 1991). Segundo Finlayson & Rudnicki (1985), embora resíduos de OPs na água e nos peixes freqüentemente desapareçam após alguns dias, a atividade da AChE cerebral permanece inibida por algumas semanas.

Em curimatá (*Prochilodus lineatus*), o TRC induziu alterações comportamentais como agitação, incoordenação dos movimentos, respiração superficial e aumento da amplitude opercular. Além disso, foram observadas alterações histopatológicas em tecido renal, como hipertrofia celular, extravasamento sanguíneo e áreas de necrose (VEIGA et al., 2002). Resultados semelhantes foram encontrados em fígado de *P. lineatus* após 24 e 48h de exposição à mesma concentração de TRC, incluindo migração lateral do núcleo, alteração no diâmetro e densidade do núcleo e necrose (RODRIGUES et al. 2001). Também foram observadas alterações hematológicas compatíveis com um quadro de intoxicação (RANZANI-PAIVA et al., 1997).

A exposição de tilápias-do-Nilo (*O. niloticus*) a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TRC durante 96 h induziu respostas tecido-específicas relacionadas às defesas antioxidantes e aos danos oxidativos, sendo o coração o tecido mais sensível ao estresse oxidativo induzido por este organofosforado (MARTINS, 2007).

Guimarães et al. (2007), também estudando a exposição de tilápias-do Nilo (*O. niloticus*) ao TRC, porém na concentração de 0,25 mg.L<sup>-1</sup> por 8, 24, 48, 72 e 96 h, observaram redução significativa na atividade da AChE no tecido muscular destes peixes. Adicionalmente também foram encontradas alterações histopatológicas em brânquias como edema, proliferação celular, fusão lamelar, congestão e hipertrofia.

## 1.2 Respostas cardio-respiratórias em peixes

Os ambientes aquáticos apresentam amplas variações em suas propriedades físico-químicas tais como  $O_2$  dissolvido,  $CO_2/pH$ , íons dissolvidos, temperatura, entre outros fatores que, individualmente ou em conjunto, alteram os sistemas fisiológicos dos animais que habitam estas áreas (PERRY & LAURENT, 1993).

A poluição é responsável pela redução da concentração de  $O_2$  no ambiente aquático em larga escala no mundo inteiro (ALEXANDER et al., 2000; WETZEL, 1975; WU et al., 2003). As alterações no metabolismo, decorrentes de alterações ambientais são acompanhadas de ajustes ventilatórios, cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos, os quais têm o objetivo de suprir as necessidades teciduais de oxigênio (MASSARI et al., 1998; RANDALL & CAMERON, 1973).

As alterações periódicas do oxigênio na água têm grande impacto no grau de atividade dos peixes e, portanto, na demanda da função cardíaca (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Dependendo da prevalência dos fatores ambientais e suas flutuações nos diferentes habitats, os peixes apresentam ampla diversidade de estilos de vida e níveis de atividade, os quais se refletem na função e estrutura do sistema cardiovascular (FARREL & JONES, 1992).

O consumo de  $O_2$  é extensamente utilizado na fisiologia como um indicador biológico que integra a atividade metabólica global de um animal em resposta a fatores ambientais específicos, refletindo o gasto energético (MEHRLE & MAYER 1984). A taxa metabólica de peixes é, normalmente, mensurada pelo consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ), um critério sugerido como índice de toxicidade subletal que, ao apresentar alteração, pode limitar o desempenho aeróbico do animal (MACKINNON & FARRELL 1992).

Os peixes expostos à hipóxia ambiental apresentam respostas que visam a economia energética e a tentativa de aumentar a capacidade de extração de  $O_2$ . Essas estratégias implicam em alterações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas (MUUSZE et al., 1998) e essas respostas à hipóxia variam de acordo com a tensão de  $O_2$  na qual o animal se encontra e a tolerância da espécie ao grau de hipóxia (HERBERT & STEFFENSEN, 2005; ISHIBASHI et al., 2002). Os peixes são capazes de manter a tomada de  $O_2$  constante durante a hipóxia aquática através do aumento da ventilação branquial, causado pelo aumento na frequência e/ou no volume respiratório (KALININ et al., 2000; SMITH & JONES, 1982).

O controle da  $f_H$  também é evidente durante a hipóxia, onde a resposta usual a esta alteração ambiental corresponde a uma bradicardia, acompanhada de um aumento do volume

sistólico. Como o débito cardíaco é mantido, a importância da bradicardia hipóxica é interpretada como uma forma de aumentar o tempo de residência do sangue no miocárdio, possibilitando um maior tempo para tomada de O<sub>2</sub> pelo mesmo (ALTIMIRAS et al., 1995).

#### **1.4 Acoplamento excitação-contração cardíaco em peixes**

A capacidade do músculo cardíaco em manter seu desempenho frente a diferentes condições fisiológicas é uma das mais importantes características que permitem os vertebrados sobreviverem em condições extremas (DRIEDZIC & GESSER, 1994).

Ajustes no débito cardíaco em resposta a xenobióticos, executados por alterações no volume sanguíneo e/ou na frequência cardíaca, são extremamente importantes, onde o volume cardíaco é determinado pela regulação da contratilidade miocárdica, a qual depende da regulação intracelular de cálcio em cada batimento (BERS, 2001; LEWATOWSKI & PYTKOWSKI, 1987).

A seqüência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração muscular é denominada acoplamento excitação-contração (E-C) e a principal diferença entre ectotérmicos e endotérmicos está relacionada com a origem do cálcio a ser utilizado pelas miofibrilas (TIBBITS et al., 1992).

O formato e a organização intracelular dos miócitos cardíacos podem interferir no acoplamento E-C. Os miócitos de peixes apresentam algumas diferenças com relação aos miócitos de mamíferos, como o tamanho reduzido (1 a 12,5 µm em peixes e 10 a 25 µm em mamíferos); retículo sarcoplasmático (RS) pouco desenvolvido e esparso; miofibrilas dispostas periféricamente e ausência de invaginações da sarcolema (SL), conhecidas como túbulos transversos ou túbulos T (FARREL & JONES, 1992).

A ativação do acoplamento E-C ocorre em resposta a um aumento na concentração de cálcio no citosol da célula muscular cardíaca (TIBBITS et al., 1992). Esse aumento depende da mobilização deste íon que pode ser proveniente do influxo através da sarcolema, por meio de canais de Ca<sup>2+</sup> e do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX), atuando em seu modo reverso e também de reservas intracelulares (RS) (HOVE-MADSEN et al., 2001).

O influxo de cálcio nos miócitos através dos canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem-dependentes do tipo-L (lentos), presentes na sarcolema, constituem o componente essencial para o acoplamento E-C nos miócitos de vertebrados. Esses canais são caracterizados pelo tempo relativamente longo que levam para se abrir e que permanecem abertos, sendo responsáveis

pelo platô característico dos potenciais de ação da musculatura cardíaca. (BERS, 2001; TIBBITS et al., 1992).

Nos miócitos de mamíferos, o influxo de cálcio pelos canais do tipo-L ocorre em quantidade insuficiente para desencadear a contração muscular por si só (BERS, 2001; CHAPMAN, 1983; DRIEDZIC & GESSER, 1994). Desta forma, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  tem a principal função de disparar a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon através de canais presentes no RS (canais de rianodina). Este fenômeno é conhecido como liberação de cálcio-cálcio induzida (CALLEWAERT, 1992; FABIATO, 1983).

Embora a magnitude do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais lentos da sarcolema possa ser variável entre as espécies de mamíferos, a maioria dos estudos indica que este é insuficiente para ativar a contração (BERS, 2001; CHAPMAN, 1983). Assim, a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  envolvida na ativação da contração muscular cardíaca em mamíferos é a liberação deste íon do RS, através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$ -induzida (BERS, 2001; WIER, 1990).

Nos vertebrados ectotérmicos, o desenvolvimento do RS varia amplamente entre as espécies. Em peixes, o RS é, relativamente, pouco desenvolvido e apresenta um papel questionável na ativação contrátil na maioria das espécies (AHO & VORNANEN, 1998; DRIEDZIC & GESSER, 1988; SHIELS & FARRELL, 1997).

A rianodina é um alcalóide neutro que, quando aplicado em altas concentrações (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), liga-se especifica e irreversivelmente ao canal de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (canal de rianodina), mantendo-o fechado, impedindo a liberação do cálcio do RS (ROUSSEAU et al. 1987). Assim, a rianodina tem sido utilizada para o teste da importância funcional do RS no acoplamento E-C de diversos vertebrados, inclusive peixes, onde várias espécies de teleósteos parecem ser insensíveis a este alcalóide (COSTA et al., 2002; DRIEDZIC & GESSER, 1988; HOVE-MADSEN, 1992; RIVAROLI et al., 2006; ROCHA et al., 2007).

Desta forma, na maioria das espécies de peixes, a corrente de cálcio dos canais  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L é a responsável pelo principal influxo do cálcio que ativa a contração (TIBBITS et al., 1992; VORNANEN, 1997, 1998), como ocorre na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (COSTA et al., 2000). Entretanto, em alguns teleósteos, parte do  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado pelo aparato contrátil nos miócitos cardíacos é liberada por depósitos intracelulares (RS) como no curimatá, *Prochilodus lineatus* e na traíra, *Hoplias malabaricus* (RIVAROLI et al., 2006).

O relaxamento muscular ocorre com a redução da concentração de cálcio do citosol, através do efluxo pela SL, pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e por meio do NCX e pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

presente no RS, conhecida como cálcio-ATPase-sarco(endo)plasmática, ou SERCA (TIBBITS et al., 1992).

No coração de mamíferos, a SERCA e o NCX são os principais mecanismos para reduzir a concentração citosólica de cálcio a fim de induzir o relaxamento máximo. Já os peixes, por apresentarem um RS relativamente menos desenvolvido e uma maior razão superfície/volume, diferem dos mamíferos em termos da contribuição relativa dos mecanismos para a movimentação de cálcio também no relaxamento cardíaco. Nos vertebrados inferiores, o influxo transarcolemal relativamente grande de cálcio é removido do citosol durante o relaxamento cardíaco, basicamente através do NCX e da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal (THOMAS et al., 1996), o primeiro constituindo-se no principal mecanismo em teleósteos (DRIEDZIC & GESSER, 1994; TIBBITS et al., 1991).

A lipofilicidade dos OPs favorece sua incorporação pelas membranas biológicas, levando a perturbações físicas e químicas e, conseqüentemente, nas propriedades funcionais destas membranas (ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA, 1979; 1989; VIDEIRA et al., 1996, 1999).

Em nível celular, as proteínas de membrana, incluindo canais iônicos, receptores e enzimas, são os principais alvos de determinados inseticidas (DIERKES-TIZEK et al., 1984; NARAHASHI, 1987; RAHEJA & GILL, 2002; RAYMOND-DELPECH et al., 2005). Assim, torna-se importante o conhecimento dos efeitos do TRC sobre o acoplamento E-C no miocárdio de peixes.

Considerando-se o impacto dos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos, muitas vezes responsáveis pela deterioração da qualidade da água e também por suas ações diretas nos organismos aquáticos, levando a alterações ventilatórias e cardiovasculares, o presente trabalho se propôs a estudar a ação do organofosforado triclorfon, devido o seu amplo uso, na fisiologia cardio-respiratória do teleósteo *Oreochromis niloticus*.

## 1.5 Considerações sobre a espécie estudada

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 4) é originária da África e da Ásia e foi introduzida no Brasil na década de 70 (PINHEIRO et al., 2006). A tilapicultura vem se mostrando uma ótima alternativa para a piscicultura de água doce e estuarina. A expansão do cultivo da tilápia-do-Nilo deve-se ao ótimo desempenho, alta rusticidade, facilidade de obtenção de alevinos, adaptabilidade aos mais diversos sistemas de criação, grande aceitação no mercado de lazer (pesque-pague) e alimentício (frigoríficos) e pelas qualidades nutritivas e organolépticas do seu filé (MEURER, et al., 2003).

Além disso, a tilápia é, entre as espécies de peixes mais cultivadas, a que melhor resiste à alta temperatura, à baixa concentração de oxigênio dissolvido e à alta concentração de amônia na água. Possui hábito alimentar onívoro e aceita rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação (BOSCOLO et al., 2001).

Lahav e Ra'nam (1997) citam que a principal vantagem da tilápia-do-Nilo é o seu baixo custo relativo, principalmente quanto ao alevino, à alimentação e à qualidade da sua carne.

Dados referentes à produção brasileira da aquicultura continental do ano de 2005 mostram que a produção de tilápia teve um aumento, sendo a espécie mais produtiva, alcançando aproximadamente 68.000 toneladas, seguida da carpa (*Cyprinus carpio*) com aproximadamente 42.000 t e do tambaqui (*Colossoma macropomum*), com aproximadamente 25.000 t (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2007).

Segundo Popma & Masser (1999), a tilápia-do-Nilo é lateralmente comprimida, com uma longa nadadeira dorsal, onde a parte anterior é profundamente espinhada. Espinhas também são encontradas na pélvis e na nadadeira anal. Peixes dessa espécie constroem ninhos e os ovos fertilizados são incubados na boca.

Segundo Trewavas (1982), a tilápia-do-Nilo ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Superordem: TELEOSTEI

Ordem: PERCIFORMES

Família: CICHLIDAE

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758)



**Figura 4:** Exemplar de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do organofosforado triclorfon (Neguvon<sup>®</sup>) sobre a função cardio-respiratória do teleósteo de água doce tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

### 2.2 Objetivos específicos

Para avaliar o efeito da exposição ao organofosforado sobre a função cardio-respiratória de tilápia-do-Nilo, exemplares controle e expostos a uma concentração subletal de triclorfon (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), foram utilizados para a determinar os seguintes parâmetros:

- a) Efeito da redução gradual na concentração de oxigênio do meio sobre a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ );
- b) Efeito da redução gradual na concentração de oxigênio do meio sobre a função respiratória (frequência respiratória -  $f_R$ ; volume ventilatório -  $V_T$ ; ventilação branquial -  $\dot{V}_G$ ; necessidade ventilatória -  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ; e extração de  $O_2$  da corrente ventilatória -  $EO_2$ );
- c) A tensão crítica de  $O_2$  ( $PcO_2$ );
- d) A frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$ );
- e) A massa ventricular relativa (MVR);
- f) As respostas inotrópicas e cronotrópicas de tiras ventriculares eletricamente estimuladas, incluindo:
  - Análise do efeito do tempo experimental sobre o desenvolvimento de força isométrica;
  - Análise da importância do cálcio extracelular para o desenvolvimento de força das tiras ventriculares da espécie;
  - Análise dos efeitos do aumento da taxa de estimulação sobre a força de contração;
  - Análise da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes e Drogas

No presente trabalho foi utilizada a formulação comercial do pesticida organofosforado triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroxi metil fosfonato,  $C_4H_8Cl_3O_4P$ ), Neguvon<sup>®</sup> - Bayer. Todos os reagentes foram de procedência Sigma (St.Louis, MO, USA) ou Merck (Darmsdat, Alemanha).

#### 3.2 Animais

Os exemplares de *O. niloticus*, de ambos os sexos, foram gentilmente cedidos pelo Centro de Piscicultura Águas Claras, Município de Mococa, SP. Os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, do Departamento de Ciências Fisiológicas/UFSCar, onde os experimentos foram realizados.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques com capacidade de 500 e 1000 litros, dotados de recirculação contínua de água de água termostatizada ( $25 \pm 1$  °C) e aeração constante, por um período mínimo de 30 dias para a recuperação do estresse decorrente da coleta e aclimação. Durante este período os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada (Fri-Acqua 32, Fri-Ribe Rações, SP - 32 % de proteína).

Após a aclimação, os peixes ( $150,6 \pm 4,9$  g e  $21,6 \pm 0,3$  cm) foram divididos em dois grupos experimentais: controle (n = 19) e expostos ao triclorfon (n = 19, TRC - Neguvon<sup>®</sup> - 97%) na concentração subletal de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  do princípio ativo triclorfon, durante 96 horas. O valor da  $CL_{50}$  do triclorfon para *O. niloticus* foi previamente estabelecido por Alkahem et al. (1998), sendo de  $21,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , durante 96 horas de exposição.

As caixas plásticas experimentais (250 L), utilizadas para a exposição dos peixes foram mantidas com aeração constante e temperatura controlada por termostato ( $25 \pm 1$  °C). A relação de, aproximadamente, 1 g de peixe por litro de água foi mantida, sendo exposto um peixe por vez. Os peixes do grupo exposto ao TRC permaneceram em sistema semi-estático por 96 horas, no qual metade da solução experimental foi renovada a cada 24 horas para

manter a qualidade da água e ajustar a concentração deste organofosforado. O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo experimental, porém sem a adição do TRC.

Durante este período, os peixes não foram alimentados e os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados em ambos os grupos e mantiveram-se aproximadamente constantes: pH 7,0 a 7,5; oxigênio dissolvido 6,5 a 7,3 mg.L<sup>-1</sup> (117 a 127 mmHg), dureza 48 a 56 mg.L<sup>-1</sup> (como CaCO<sub>3</sub>); alcalinidade 40 a 43 mg.L<sup>-1</sup> (como CaCO<sub>3</sub>); amônia 0,1 mg.L<sup>-1</sup>; cloreto 42 mg.L<sup>-1</sup>; condutividade 110 µS.cm<sup>-1</sup>.

### 3.3 Determinação das características físico-químicas da água

#### 3.3.1 pH e alcalinidade

Amostras de 100 ml de água foram coletadas das caixas experimentais, transferidas para um Becker e mantidas sob agitação para determinação do valor do pH da água. A determinação da alcalinidade foi efetuada de acordo com as técnicas descritas por Golterman & Climo (1969) utilizando-se ácido sulfúrico 0,01 N como indicador da alcalinidade, para titular até o pH 4,0.

Para o cálculo da alcalidade (expressa em mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>) das amostras, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{ALCALINIDADE} = (\text{mL de H}_2\text{SO}_4) \times \text{N} \times \text{Eq} / \text{volume da amostra (mL)}, \quad \text{onde:}$$

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

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

#### 3.3.2 Dureza total

A análise de dureza foi feita por titulação das amostras de água, previamente tamponadas com EDTA, até o ponto de viragem de lilás para azul, usando-se como indicador o Eriocromo Negro (ADAD, 1982). Para o cálculo da dureza (em mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{DUREZA} = \text{EDTA (mL)} \times 1000 / \text{volume da amostra (mL)}$$

### 3.3.3 Cloreto

A concentração de cloreto foi determinada pelo método de Mohr descrito em Ohweiler (1968), onde os íons cloreto são titulados com solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), na presença de cromato de potássio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) como indicador. O ponto final da titulação é identificado quando todos os íons  $\text{Ag}^+$  tiverem se depositado sob a forma de  $\text{AgCl}$ . Logo em seguida, haverá a precipitação de cromato de prata ( $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ ) de coloração marrom-avermelhada. Adicionou-se 1 mL de cromato de potássio 5% nas amostras de água coletadas das caixas experimentais e diluídas 1:10 com água destilada. Essas amostras de água foram mantidas sob agitação e tituladas com nitrato de prata 0,01 N até a viragem de amarela para o vermelho tijolo. Para o cálculo da concentração de íons cloretos das amostras, em  $\text{mg.L}^{-1}$ , foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{CLORETO} = (\text{mL de AgNO}_3) \times \text{N} \times \text{Eq} / \text{volume da amostra (mL)}, \text{ onde:}$$

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

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

### 3.3.4 Amônia total

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

### 3.3.5 Oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura

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

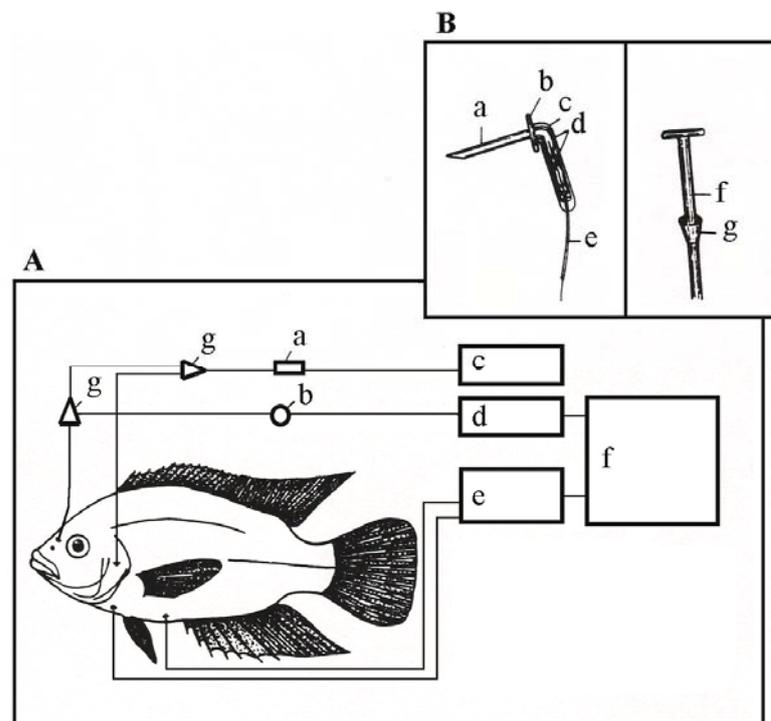
### 3.4 Experimentos *in vivo*

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 anestesia, na qual os peixes foram submetidos a um banho em benzocaína 0,01% por aproximadamente 5 minutos (ou até a cessação da atividade espontânea). Imediatamente após a anestesia, os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica onde foi realizada a inserção 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.

As tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$  - mmHg) e expirada ( $P_eO_2$  - mmHg) e a frequência respiratória ( $f_R$ ) foram monitoradas por meio de cateteres de polietileno (PE 100) inseridos no interior da cavidade bucal (através de orifício acessado dorsalmente, próximo a boca, com o auxílio de uma broca) e nas partes distais de ambos os cleitros operculares (PE 60). Os cateteres foram fixados com a ajuda de um flange e cola de secagem rápida (Figura 5).

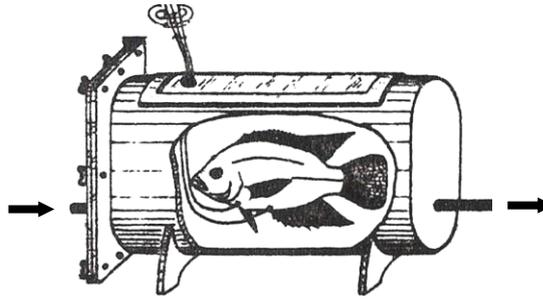
Para a realização do eletrocardiograma (ECG), foram inseridos dois eletrodos de aço inoxidável. O positivo foi posicionado ventralmente entre as brânquias e o coração e o negativo, em posição ventro-caudal, próximo às nadadeiras pélvicas, ambos suturados com pontos cirúrgicos à musculatura corpórea para evitar seu deslocamento (Figura 5). 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), o qual foi conectado a um canal de uma placa de aquisição DATAQ DI 154RS de um computador, para os registros da eletrocardiografia. Esta preparação permite que sejam obtidos registros similares àqueles observados na derivação  $D_I$  da eletrocardiografia padrão, e foram utilizados para a determinação da frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm).



**Figura 5:** Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias de *Oreochromis niloticus*. Em **A**: **a.** cubeta termostatizada com eletrodos de O<sub>2</sub>; **b.** transdutor de pressão; **c.** analisadores de O<sub>2</sub>; **d.** amplificador de pressão; **e.** amplificador de ECG; **f.** microcomputador com sistema de aquisição de dados; **g.** torneira de 3 vias. Em **B**: Detalhe de um eletrodo de ECG e do cateter para medidas de PO<sub>2</sub>: **a.** extremidade da agulha; **b.** pedaço de cateter com a extremidade flangeada; **c.** revestimento termo-retrátil; **d.** fixação do fio de cobre; **e.** fio de cobre encapado; **f.** cateter de polietileno com a extremidade flangeada para a tomada de água; **g.** peça de fixação. (adaptado de MASSARI, 1993).

Com o registro da  $f_H$  por eletrocardiografia foi possível determinar pequenas variações no intervalo entre batimentos cardíacos por meio da análise dos intervalos de tempo entre duas ondas R consecutivas, os intervalos R-R, os quais determinam os sinais de variabilidade da frequência cardíaca.

Após a preparação descrita acima, os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante (Figura 6) e imediatamente transferidos para a câmara experimental, mantida em sistema de recirculação contínua de água termostatizada a  $25 \pm 1$  °C e aerada, onde permaneceram por um período de, aproximadamente, 24 horas, para a recuperação da anestesia e restabelecimento das condições metabólicas basais (Figura 7). Assim, o esquema de preparação experimental realizado para o estudo da  $f_H$  e das respostas ventilatórias em *O. niloticus* do grupo controle e exposto a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de triclofon, durante normóxia e hipóxia gradual pode ser observado nas figuras 5, 6 e 7.



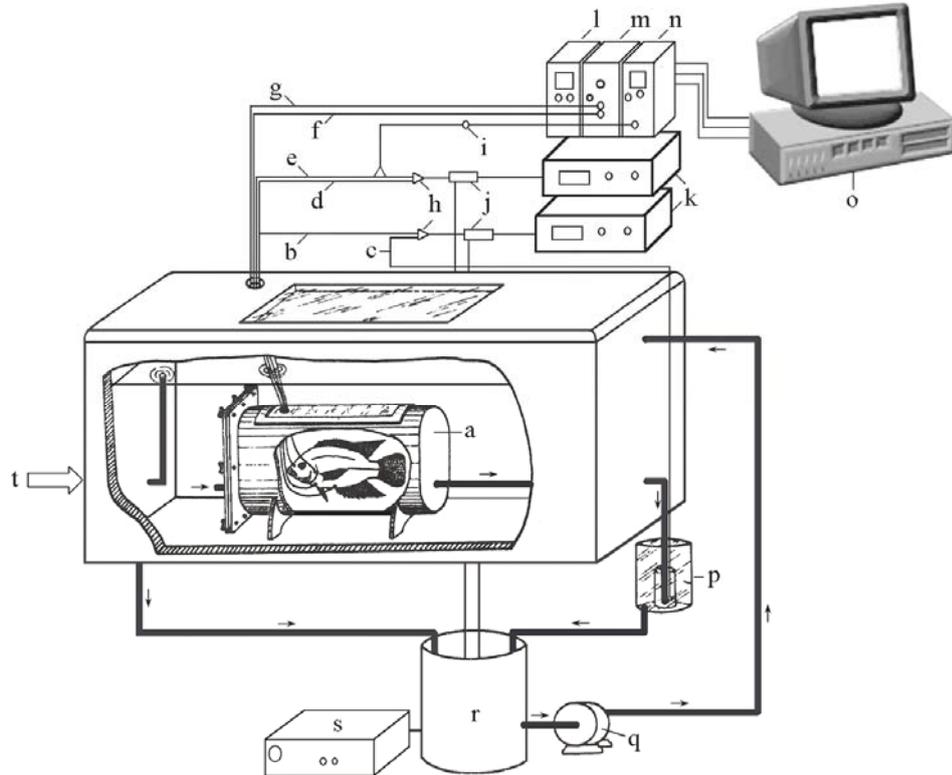
**Figura 6:** Detalhe do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos *in vivo*. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro (MASSARI, 1993).

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se um animal de cada vez, em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg) e hipóxia gradual (100, 80, 60, 40 e 20 mmHg), em temperatura constante de  $25 \pm 1$  °C.

As tensões de  $O_2$  hipóxicas foram 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 por meio de um termostato LifeTech 2010 (A & W Pet Ltda., China) 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 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) (Figura 7).



**Figura 7:** Sistema de respirometria de fluxo constante e respostas cardíacas utilizado no presente estudo. **a.** respirômetro; **b, c.** cateteres de polietileno para tomada da água que entra ( $P_{in}O_2$ ) e que sai ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, respectivamente; **d, e.** cateteres de polietileno para tomada da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ), respectivamente; **f.** eletrodo cardíaco; **g.** eletrodo de referência; **h.** torneiras de 3 vias; **i.** transdutor de pressão; **j.** cuvetas termostatzadas com eletrodos de  $O_2$ ; **k.** analisadores de  $O_2$ ; **l.** monitor cardíaco; **m.** amplificador de ECG; **n.** amplificador de pressão; **o.** computador com sistema de aquisição de dados; **p.** frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; **q.** bomba para circulação de água; **r.** balde; **s.** controlador de temperatura; **t.** entrada de quantidades controladas de  $N_2$  ou ar comprimido. (adaptado de MASSARI, 1993).

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, acoplada a um transdutor de pressão (Utah Medical Products) conectado a um amplificador de pressão (AECAD 0804 – AVS, São Paulo) e, este, a um canal de uma placa de aquisição DATAQ DI 154RS de um computador (Figura 7).

### 3.5 Massa ventricular relativa

Os animais do grupo controle e exposto ao TRC foram sacrificados por secção medular e a massa corpórea foi mensurada (Wt - g). Posteriormente à dissecação do coração, o ventrículo foi pesado (Wv - g) para determinação da massa ventricular relativa, a qual foi expressa em porcentagem ( $Wv/Wt \times 100$ ).

### 3.6 Experimentos *in vitro*

As preparações para os experimentos *in vitro* foram realizadas de acordo com os procedimentos adotados por Rivaroli et al. (2006) e Rocha et al. (2007), os quais estão descritos a seguir.

O ventrículo foi mantido em uma solução gelada própria para teleósteos e tiras ventriculares com diâmetro entre 1 e 2 mm foram obtidas do coração de um único peixe e transferidas para um banho contendo solução fisiológica com a seguinte composição (mM): 100,0 NaCl, 5,0 KCl, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,0 NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 10,0 glicose, borbulhada com mistura carbogênica (2% CO<sub>2</sub> e 98% O<sub>2</sub>) e mantida a  $25 \pm 1$  °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 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.

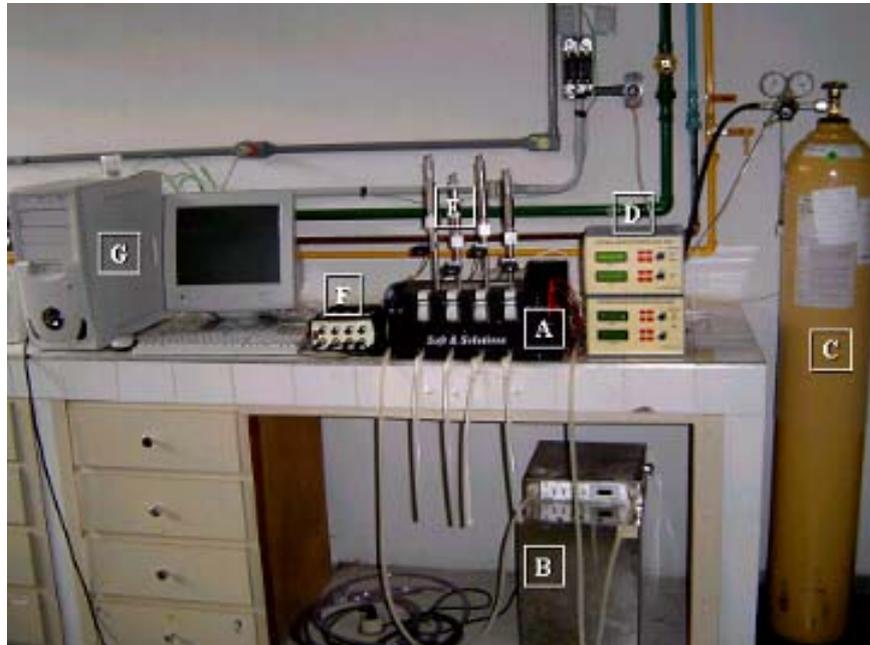
Cada uma das tiras ventriculares foi transferida para um banho contendo 30 ml de solução fisiológica termostaticada a 25 °C, dotado de borbulhamento constante com a mistura carbogênica descrita acima. Uma extremidade da tira foi fixada por uma espiral metálica, em um gancho construído na extremidade 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 (Figuras 8 e 9). 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 8 mostra o set experimental utilizado no presente estudo.

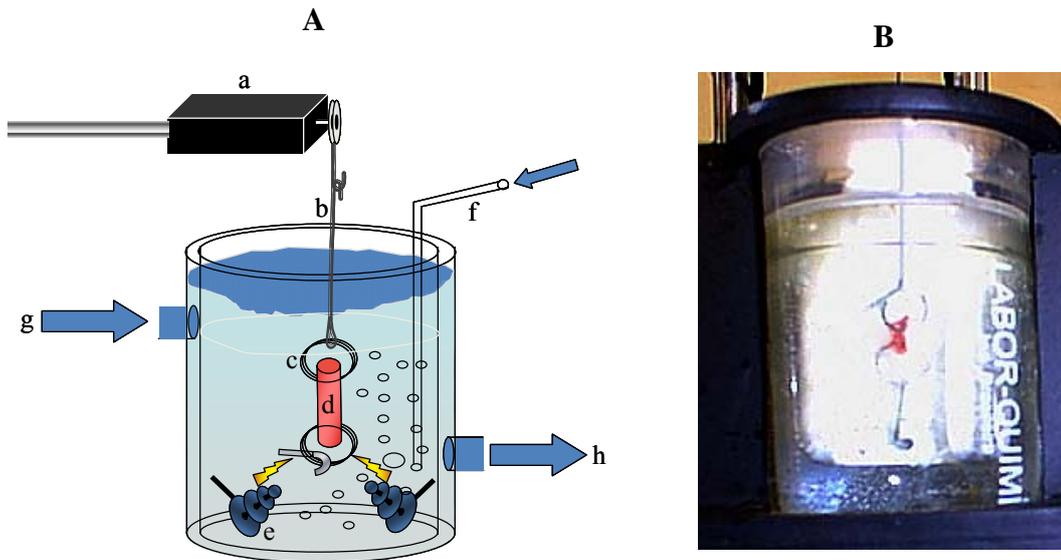
Inicialmente, as fibras foram estimuladas a uma taxa de 0,2 Hz (12 bpm) e estiradas para aumentar a distância entre o transdutor e o gancho de fixação, até que uma relação constante entre o comprimento da preparação e o pico da força de contração fosse obtida.

Após estabilização, os diferentes protocolos experimentais foram aplicados nas preparações controle e naquelas retiradas dos animais expostos ao triclorfon (Neguvon<sup>®</sup>), para as medidas da força de contração ( $F_c$ ) e dos parâmetros tempo-dependentes (tempos para o pico máximo de força - TPT e para 50% do relaxamento - THR). As relações de tempo com a força de contração (TPT/ $F_c$  e THR/ $F_c$ ) foram calculadas em razão do tempo para o pico de força com a força de contração e em razão do tempo para 50% do relaxamento com  $\frac{1}{2}$  da força de contração, respectivamente (CELICHOWSKI & BICHLER, 2002).

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.



**Figura 8:** Set experimental utilizado para a obtenção das respostas inotrópicas *in vitro* das tiras ventriculares de tilápia-do-Nilo. **A:** banho com quatro cubetas; **B:** banho termostatizado; **C:** cilindro de mistura carbogênica; **D:** estimuladores elétricos; **E:** transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; **F:** amplificador de força; **G:** sistema informatizado de aquisição e tratamento dos dados.



**Figura 9:** **A:** Esquema da cubeta experimental: **a.** transdutor de força; **b.** fio de fixação e estiramento da preparação; **c.** argola metálica; **d.** tira ventricular; **e.** eletrodo de estimulação; **f.** entrada de mistura carbogênica; **g.** entrada de água para termostatar a cubeta; **h.** saída de água da cubeta (cedido por Rivaroli, L.). **B:** Foto da cubeta descrita em A.

### 3.7 Protocolos experimentais

#### 3.7.1 Experimentos *in vivo*

##### 3.7.1.1 Variáveis ventilatórias

A taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi determinado 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  $\dot{V}O_2$  ( $mLO_2 \cdot Kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ) foi calculada por meio da equação proposta por Hughes et al. (1983):

$$\dot{V}O_2 = \frac{(P_{in}O_2 - P_{out}O_2) \cdot \alpha_{O_2} \cdot \dot{V}_R}{W_t}, \text{ onde:}$$

$\alpha_{O_2}$  = coeficiente de solubilidade do  $O_2$  na água ( $mLO_2 \cdot L^{-1} \cdot mmHg^{-1}$ );

$\dot{V}_R$  = fluxo de água através do respirômetro ( $L \cdot h^{-1}$ );

$W_t$  = peso fresco do animal (Kg).

A ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) foi determinada pelo 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.

A  $\dot{V}_G$  ( $\text{mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) foi calculada segundo Hughes & Saunders (1970), por meio da expressão:

$$\dot{V}_G = \frac{(\text{PinO}_2 - \text{PoutO}_2/\text{PiO}_2 - \text{PeO}_2) \cdot \dot{V}_R}{\text{Wt}}, \text{ onde:}$$

$\text{PinO}_2$  = tensão de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro (mmHg);

$\text{PoutO}_2$  = tensão de  $O_2$  da água de saída do respirômetro (mmHg);

$\text{PiO}_2$  = tensão de  $O_2$  da água inspirada pelo animal (mmHg);

$\text{PeO}_2$  = tensão de  $O_2$  da água expirada pelo animal (mmHg);

$\dot{V}_R$  = fluxo de água através do respirômetro ( $\text{mL.min}^{-1}$ ),

$\text{Wt}$  = peso fresco do animal (kg).

A frequência respiratória ( $f_R$ ) foi mensurada pelo cateter de polietileno inserido na boca do peixe, conectado a um transdutor de pressão (Utah Medical Products), acoplado a um amplificador (AECAD 0804 – AVS, SP, Brazil), e conectado a uma placa de aquisição de dados DATAQ DI 154RS (Dataq Instruments, Akron, OH, USA).

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. $\text{min}^{-1}$ .

O volume ventilatório ( $V_T$ ), em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais, foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e a respectiva frequência respiratória ( $f_R$ ). O  $V_T$  foi expresso em  $\text{mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{ciclo respiratório}^{-1}$ .

A necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ), 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  $\text{mLH}_2\text{O.mLO}_2^{-1}$ .

A extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) pelas brânquias, em normóxia e durante hipóxia gradual, foi calculada a partir da equação (Dejours, 1981):

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

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

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

### 3.7.1.2 Frequência 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). A análise dos intervalos de tempo entre duas ondas R consecutivas do registro de ECG, os intervalos R-R, determinou-se possíveis sinais de variabilidade da frequência cardíaca.

## 3.7.2 Experimentos *in vitro*

### 3.7.2.1 Efeito do tempo experimental

As tiras ventriculares foram mantidas a 0,2 Hz (12 bpm) na temperatura de  $25 \pm 1$  °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 mesma 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.

### 3.7.2.2 Aumento da concentração de cálcio extracelular

Para avaliar a dependência da contração em relação ao cálcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_e$ ), as tiras ventriculares foram inicialmente estabilizadas a 0,2 Hz e  $25 \pm 1$  °C, em um banho contendo 2,5 mM de  $Ca^{2+}$ , por um período de aproximadamente 30 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 2 min. Depois deste período, as  $[Ca^{2+}]_e$  foram elevadas em 2 mM a cada 5 min ou até que o cálcio tivesse produzido seu efeito completo.

### **3.7.2.3 Aumento da frequência de estimulação**

Após a estabilização das tiras musculares a 0,2 Hz, na temperatura de  $25 \pm 1$  °C, foram efetuados os registros do desenvolvimento de força isométrica (Fc) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) de ambas as tiras por 2 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, 80 % 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.

### **3.7.2.4 Capacidade de bombeamento cardíaco**

Com os valores de Fc durante os incrementos na frequência de estimulação foi possível o cálculo da capacidade de bombeamento cardíaco, a qual, segundo Matikainen & Vornanen (1992), é determinada pelo produto da frequência de estimulação pela força de contração da tira ventricular.

### 3.8 Forma de apresentação dos dados

#### 3.8.1 Experimentos *in vivo*

Os parâmetros ventilatórios de *O. niloticus* foram comparados aos valores obtidos inicialmente em cada protocolo (normóxia - 140 mmHg) e expressos da seguinte forma:

- a) Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) - expressa em  $\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ;
- b) Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) - expressa em  $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;
- c) Freqüência respiratória ( $f_R$ ) - expressa em ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ ;
- d) Volume ventilatório ( $V_T$ ) - expresso em  $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$ ;
- e) Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ) - expressa em  $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{mLO}_2^{-1}$ ;
- f) Extração de  $O_2$  ( $EO_2$ ) - expressa em porcentagem (%);
- g) Freqüência cardíaca ( $f_H$ ) - expressa em batimentos cardíacos por minuto (bpm).

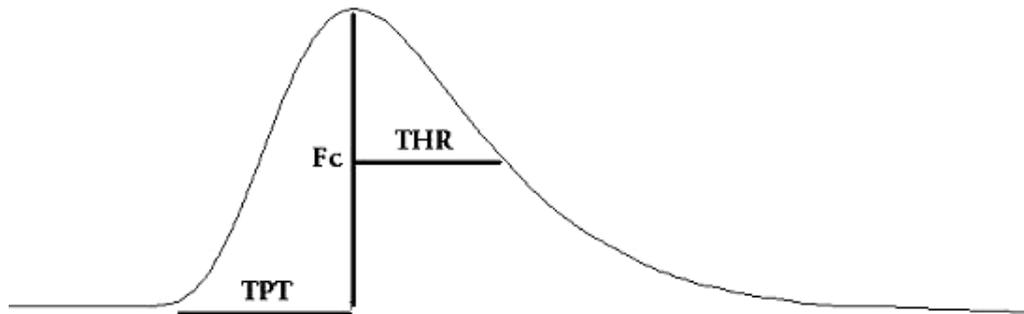
#### 3.8.2 Experimentos *in vitro*

A força de contração ( $F_c$ ) está representada em valores absolutos ( $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) e os parâmetros tempo-dependentes foram apresentados em ms.

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

- a) Tempo para o pico de força (TPT - time to peak tension): representado em valores absolutos (ms);
- b) Tempo para 50% do Relaxamento (THR - time to half relaxation): expresso em valores absolutos (ms);
- c) A relação entre os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) e sua respectiva força de contração ( $F_c$ ) foram analisados e expressos da seguinte maneira:
  - Razão entre tempo para o pico de força e força de contração (TPT/ $F_c$ ): expressa em  $\text{ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2$ ;
  - Razão entre tempo para 50% do Relaxamento e  $\frac{1}{2}$  da força de contração (THR/ $F_c$ ): expressa em  $\text{ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2$ ;

A representação de um registro de força de contração com as medidas dos parâmetros descritos acima é mostrada na figura 10.



**Figura 10:** 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.

### 3.9 Tratamento estatístico dos dados

Os valores estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Foram consideradas diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância. Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados no presente estudo:

- O teste-t ou de Mann-Whitney (dependendo dos critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade) foi realizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas nas mesmas condições experimentais nos diferentes grupos experimentais (controle e exposto ao TRC) (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- A Análise de variância (ANOVA) one-way complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, foi realizada para a identificação de diferenças significativas durante os protocolos experimentais em cada grupo experimental, de forma isolada (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

- A Análise de variância (ANOVA) two-way complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, foi realizada para a identificação de possíveis interações entre a exposição ao TRC e a hipóxia gradual nos diferentes protocolos experimentais realizados *in vivo* (SigmaStat v.3.5, Systat Software, CA, USA).

## 4 RESULTADOS

Todos os peixes de ambos os grupos experimentais sobreviveram ao delineamento experimental realizado. Quando comparados com o grupo controle, os peixes expostos ao triclorfon (TRC) permaneceram agrupados dentro dos tanques, mostrando-se agressivos e fotofóbicos.

### 4.1 Determinação das características físicas e químicas da água

Os parâmetros físico-químicos da água, apresentados na Tabela 1, foram monitorados em ambos os grupos e mantiveram-se aproximadamente constantes.

**Tabela 1:** Características físico-químicas da água do grupo controle e exposto a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TRC, medidas ao longo do período experimental. Os valores são médias ± E.P.M.

|  | Controle    | Triclorfon   |
|--|-------------|--------------|
| pH   | 7,5 ± 0,5   | 7,5 ± 0,9    |
| Temperatura (°C)                                     | 23,8 ± 0,5  | 25,0 ± 0,4   |
| Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )            | 7,3 ± 0,5   | 6,7 ± 0,8    |
| Cloreto (mg.L <sup>-1</sup> )                        | 42,0 ± 3,1  | 47,9 ± 5,5   |
| Amônia (mg L <sup>-1</sup> )                         | 0,2 ± 0,03  | 0,1 ± 0,01   |
| Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ) | 43,0 ± 3,1  | 42,5 ± 4,9   |
| Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )       | 56,0 ± 4,2  | 57,0 ± 6,6   |
| Condutividade elétrica (uS cm <sup>-1</sup> )        | 112,0 ± 8,1 | 107,6 ± 12,4 |

## 4.2 Experimentos *in vivo*

### 4.2.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e Tensão crítica de oxigênio ( $P_{cO_2}$ )

Os valores médios da taxa metabólica do grupo controle e exposto ao TRC, frente às diferentes tensões de oxigênio da água de entrada no respirômetro ( $P_{in}O_2$ ) estão apresentados na tabela 2 e representados graficamente na figura 11.

No grupo controle, os valores de  $\dot{V}O_2$  permaneceram constantes desde a tensão normóxica ( $99,4 \pm 7,4 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) até a tensão de 40 mmHg ( $89,2 \pm 4,7 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Apenas na menor tensão de  $O_2$  experimental utilizada (20 mmHg) observou-se uma redução significativa dos valores de  $\dot{V}O_2$  (redução de ~ 42 %)

No grupo exposto ao TRC os valores de  $\dot{V}O_2$  não apresentaram diferença significativa até a tensão de 80 mmHg, quando comparados aos valores de normóxia ( $93,1 \pm 5,0 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). A partir da tensão de 60 mmHg ( $70,8 \pm 4,1 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), os valores de  $\dot{V}O_2$  apresentaram uma redução significativa, onde os menores valores foram observados na tensão de 20 mmHg (redução de ~49%)

Quando comparados ambos os grupos, os valores de  $\dot{V}O_2$  do grupo exposto ao TRC apresentaram-se significativamente inferiores (aproximadamente 20%) nas tensões de 80, 60 e 40 mmHg.

A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

As tensões críticas de  $O_2$  ( $P_{cO_2}$ ) de ambos os grupos foram obtidas como descrito por RANTIN et al. (1992). Uma reta é ajustada com a abscissa,  $P_{in}O_2$  versus  $\dot{V}O_2$ , obtida a partir da expressão  $Y = a + bX$ , onde a e b são calculados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A outra reta, paralela à abscissa, é plotada pela média dos valores da  $\dot{V}O_2$  que não apresentaram diferença significativa em relação aos valores normóxicos. A interseção dessas retas ajustadas determinou o ponto que, projetado sobre o eixo x, fornece a  $P_{cO_2}$  da espécie. Este ponto é definido como sendo a tensão parcial de  $O_2$  abaixo da qual a espécie perde sua capacidade de manter uma  $\dot{V}O_2$  constante, independente da disponibilidade de  $O_2$  do ambiente. Portanto, a  $P_{cO_2}$  determina a tensão de  $O_2$  abaixo da qual o peixe não

consegue mais acionar eficientemente seus mecanismos de compensação à hipóxia e, assim, manter seu consumo de O<sub>2</sub> constante.

A P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> calculada para o grupo controle foi de 35,3 mmHg (Figura 12) e para o grupo exposto ao TRC foi de 60,1 mmHg (Figura 13), cujo aumento foi de aproximadamente 70%.

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

Os valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) do grupo controle e exposto ao TRC, frente às diferentes tensões de oxigênio da água de entrada no respirômetro (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>) estão apresentados na tabela 3 e representados graficamente na figura 14.

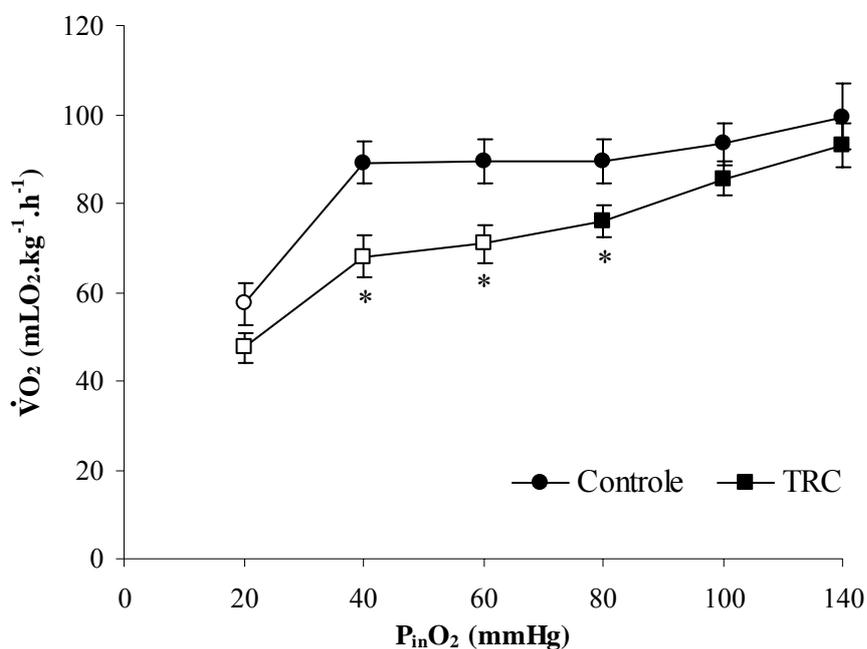
A ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) no grupo controle não apresentou diferença significativa entre os valores obtidos em normóxia ( $369,6 \pm 24,9$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) até a tensão de 80 mmHg ( $587,6 \pm 36,7$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), abaixo da qual, os valores de  $\dot{V}_G$  foram significativamente maiores quando comparados com os valores obtidos em normóxia, sendo o maior valor observado em 20 mmHg ( $2367,5 \pm 230,0$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), correspondendo a um aumento de aproximadamente 6,4 vezes neste parâmetro.

No grupo exposto ao TRC, com relação aos valores de  $\dot{V}_G$  obtidos em normóxia ( $414,2 \pm 29,8$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), a  $\dot{V}_G$  apresentou-se constante até a tensão de 60 mmHg, abaixo da qual, os valores deste parâmetro foram significativamente maiores que aqueles obtidos em normóxia. Assim como observado nos peixes do grupo controle, os peixes expostos ao TRC também apresentaram os maiores valores de  $\dot{V}_G$  na tensão de 20 mmHg ( $1800,6 \pm 213,3$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), correspondendo a um aumento de aproximadamente 4,3 vezes neste parâmetro.

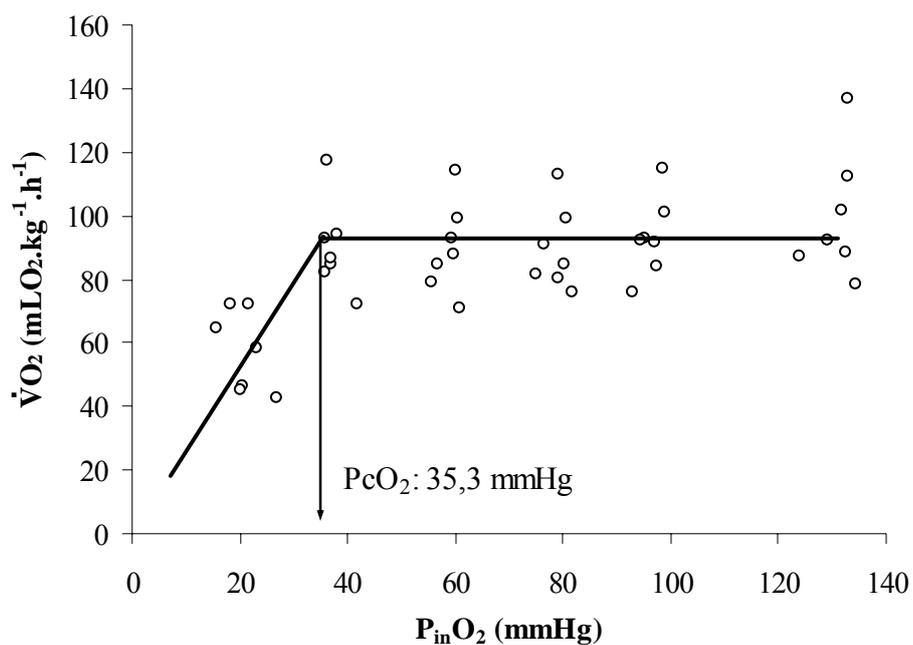
Quando comparados, os grupos experimentais diferiram entre si nas tensões de 60 a 20 mmHg, sofrendo uma redução de aproximadamente 27%. A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

**Tabela 2:** Valores médios da taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$  -  $\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  da água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia ( $139,6 \pm 0,1$  mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

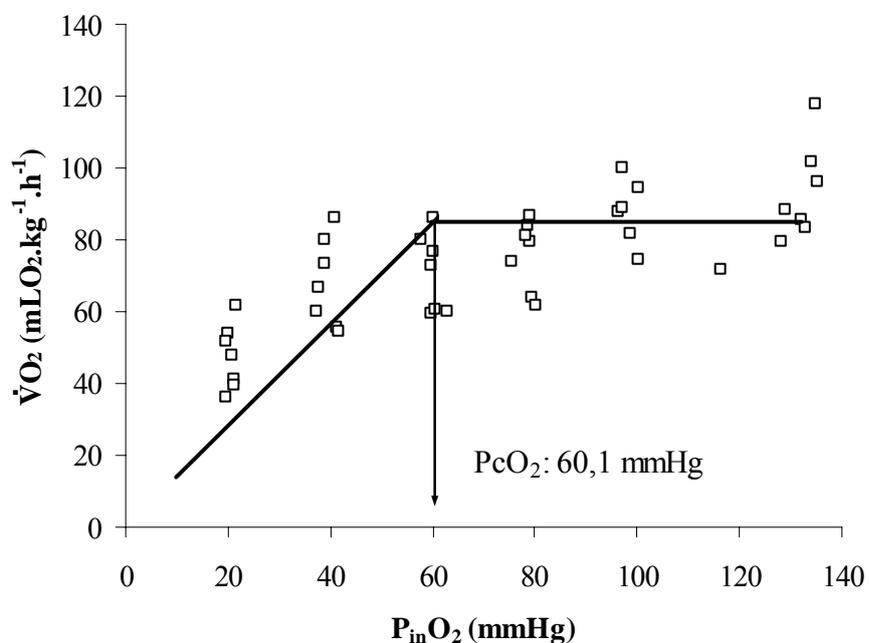
| $P_{in}O_2$ (mmHg) | $\dot{V}O_2$ ( $\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) |                                    |
|--------------------|--|------------------------------------|
|                    | Controle   | Triclorfon                         |
| $139,6 \pm 0,1$    | $99,4 \pm 7,4$   | $93,1 \pm 5,0$                     |
| $100,7 \pm 0,2$    | $93,3 \pm 4,7$   | $85,5 \pm 3,9$                     |
| $80,1 \pm 0,3$     | $89,4 \pm 4,9$   | $75,8 \pm 3,7$ *                   |
| $60,3 \pm 0,1$     | $89,4 \pm 5,1$   | <b><math>70,8 \pm 4,1</math></b> * |
| $40,3 \pm 0,1$     | $89,2 \pm 4,7$   | <b><math>68,0 \pm 4,6</math></b> * |
| $20,3 \pm 0,2$     | <b><math>57,4 \pm 4,8</math></b>   | <b><math>47,5 \pm 3,4</math></b>   |



**Figura 11:** Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia ( $139,6 \pm 0,1$  mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.



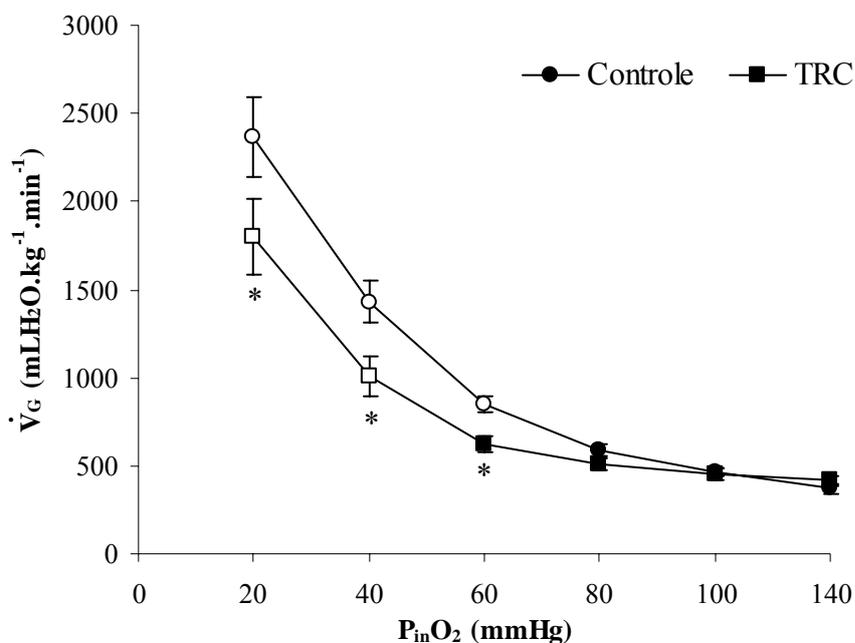
**Figura 12:** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  - mmHg) sobre a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$  - mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de *O. niloticus* do grupo controle (n = 7). A seta representa a  $P_{cO_2}$ .



**Figura 13:** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  - mmHg) sobre a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$  - mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de *O. niloticus* do grupo exposto ao TRC (n = 7). A seta representa a  $P_{cO_2}$ .

**Tabela 3:** Valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

| $P_{in}O_2$ (mmHg) | $\dot{V}_G$ (mLH <sub>2</sub> O.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |                         |
|--------------------|---|-------------------------|
|                    | Controle  | Triclorfon              |
| 139,6 ± 0,1        | 369,6 ± 24,9  | 414,2 ± 29,8            |
| 100,7 ± 0,2        | 462,4 ± 25,5  | 454,9 ± 32,0            |
| 80,1 ± 0,3         | 587,6 ± 36,7  | 508,5 ± 34,9            |
| 60,3 ± 0,1         | <b>848,4 ± 42,7</b>   | 618,8 ± 44,4 *          |
| 40,3 ± 0,1         | <b>1429,9 ± 120,4</b>   | <b>1011,5 ± 111,9 *</b> |
| 20,3 ± 0,2         | <b>2367,5 ± 230,0</b>   | <b>1800,6 ± 213,3 *</b> |



**Figura 14:** Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

### 4.2.3 Frequência respiratória ( $f_R$ )

Os valores médios de frequência respiratória ( $f_R$ ) frente às diferentes tensões de oxigênio da água de entrada no respirômetro ( $P_{in}O_2$ ) estão apresentados na tabela 4 e representados graficamente na figura 15.

A  $f_R$  dos peixes do grupo controle manteve-se aproximadamente constante em todas as tensões de  $O_2$  experimentais ( $\sim 75,5 \pm 0,3$  ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ ). Nos peixes do grupo exposto ao TRC, a  $f_R$  não apresentou diferença significativa entre os valores obtidos em normóxia ( $54,4 \pm 2,1$  ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ ) até a tensão de 40 mmHg, abaixo da qual, foram obtidos os maiores valores de  $f_R$  ( $73,0 \pm 4,4$  ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ ), aproximadamente 34% maior do que aquele obtido em normóxia.

Comparando-se os dados obtidos em ambos os grupos experimentais, observou-se que os valores apresentados pelos peixes do grupo exposto ao TRC foram significativamente inferiores aos apresentados pelo grupo controle em todas as tensões de  $O_2$  experimentais (redução de aproximadamente 23%). A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

### 4.2.4 Volume ventilatório ( $V_T$ )

Os valores médios do volume ventilatório ( $V_T$ ) para os grupos controle e exposto ao TRC estão apresentados na tabela 5 e representados graficamente na figura 16.

Nos peixes do grupo controle, o valor do  $V_T$  observado em normóxia foi de  $4,3 \pm 0,5$  mL $H_2O$ . $\text{kg}^{-1}$ .ciclo respiratório $^{-1}$ . Abaixo 80 mmHg, houve aumento significativo neste parâmetro e os maiores valores foram observados na tensão de 20 mmHg ( $21,5 \pm 1,9$  mL  $H_2O$ . $\text{kg}^{-1}$ .ciclo respiratório $^{-1}$ ), valor aproximadamente 5 vezes maior que aqueles obtidos em normóxia.

Nos peixes do grupo exposto ao TRC, o  $V_T$  registrado em normóxia ( $8,2 \pm 0,7$  mL $H_2O$ . $\text{kg}^{-1}$ .ciclo respiratório $^{-1}$ ) manteve-se constante até a tensão de 60 mmHg, abaixo da qual, aumentos significativos neste parâmetro foram observados. Assim como observado no grupo controle, os maiores valores de  $V_T$  foram observados na tensão de 20 mmHg ( $25,9 \pm 2,6$  mL $H_2O$ . $\text{kg}^{-1}$ .ciclo respiratório $^{-1}$ ), valor aproximadamente 3 vezes maior que aqueles obtidos em normóxia.

Nas tensões de O<sub>2</sub> iniciais (140 a 80 mmHg), os valores de V<sub>T</sub> obtidos para o grupo exposto ao TRC foram significativamente maiores que aqueles observados para o grupo controle, correspondendo a aumentos de aproximadamente 91, 56 e 34%, respectivamente.

A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

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

Os valores médios da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ) do grupo controle e exposto ao TRC frente às diferentes tensões de O<sub>2</sub> experimentais estão apresentados na tabela 6 e representados graficamente na figura 17.

A redução nas tensões de O<sub>2</sub> experimentais induziu aumentos significativos nos valores de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  de ambos os grupos experimentais. No grupo controle, a  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  em normoxia foi de  $3,9 \pm 0,2$  mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>. A partir da tensão de 60 mmHg ( $9,3 \pm 0,2$  mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>), os valores da necessidade ventilatória apresentaram um aumento significativo, apresentando os maiores valores na tensão de 20 mmHg ( $34,7 \pm 2,0$  mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>).

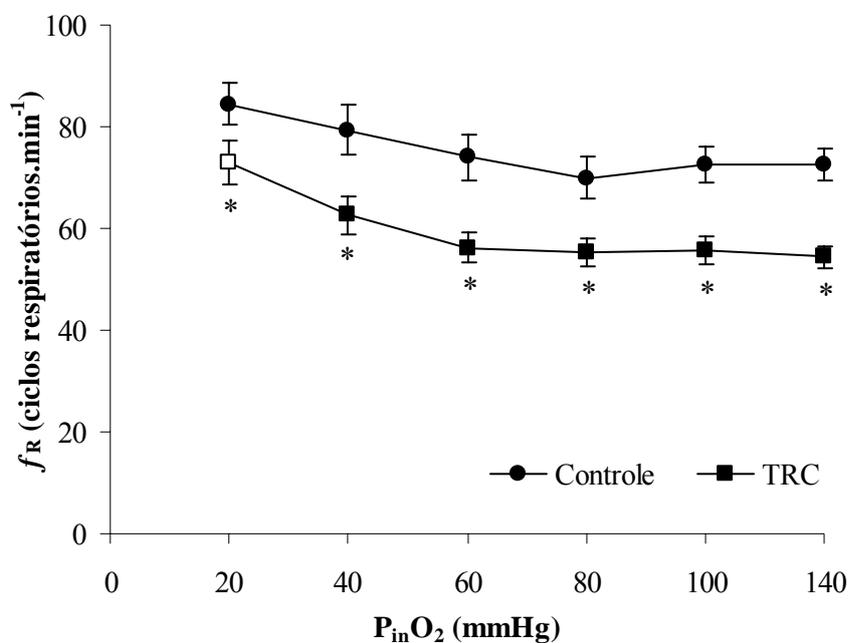
No grupo exposto ao TRC, aumentos significativos da  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  em relação aos valores obtidos em normóxia ( $4,3 \pm 0,2$  mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) só foram observados em P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> abaixo de 60 mmHg. Os maiores valores de  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  foram obtidos na tensão de 20 mmHg ( $40,3 \pm 5,1$  mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>).

Quando comparados, os grupos experimentais não diferiram entre si em nenhuma das tensões de O<sub>2</sub> analisadas.

A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

**Tabela 4:** Valores médios da frequência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

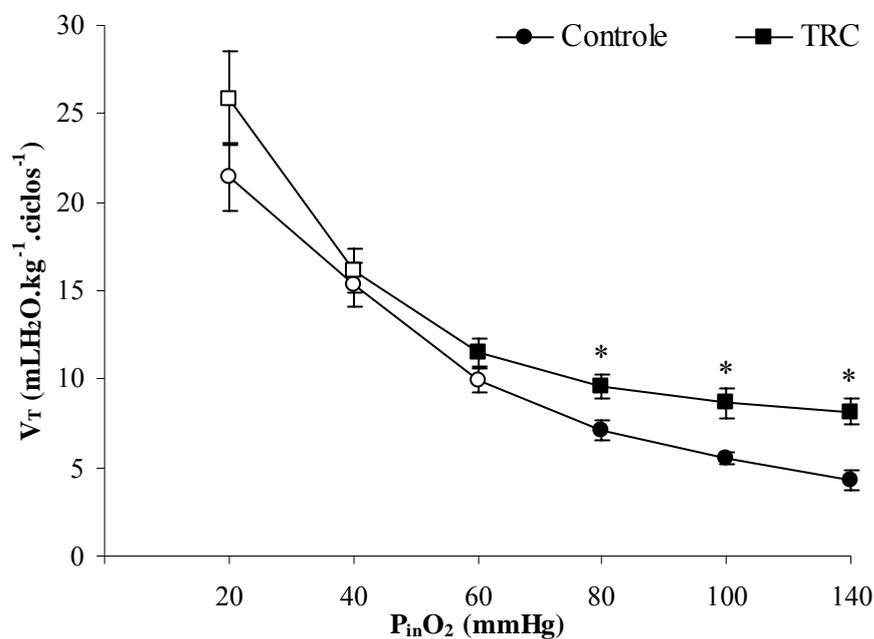
| $P_{in}O_2$ (mmHg) | $f_R$ (ciclos respiratórios.min <sup>-1</sup> ) |                     |
|--------------------|---|---------------------|
|                    | Controle  | Triclorfon          |
| 139,6 ± 0,1        | 72,6 ± 3,1                                      | 54,4 ± 2,1 *        |
| 100,7 ± 0,2        | 72,5 ± 3,6                                      | 55,7 ± 2,6 *        |
| 80,1 ± 0,3         | 70,0 ± 4,1                                      | 55,4 ± 2,8 *        |
| 60,3 ± 0,1         | 73,9 ± 4,4                                      | 56,3 ± 3,0 *        |
| 40,3 ± 0,1         | 79,4 ± 4,9                                      | 62,6 ± 3,8 *        |
| 20,3 ± 0,2         | 84,4 ± 4,1                                      | <b>73,0 ± 4,4 *</b> |



**Figura 15:** Frequência respiratória ( $f_R$ ) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

**Tabela 5:** Valores médios do volume ventilatório ( $V_T$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

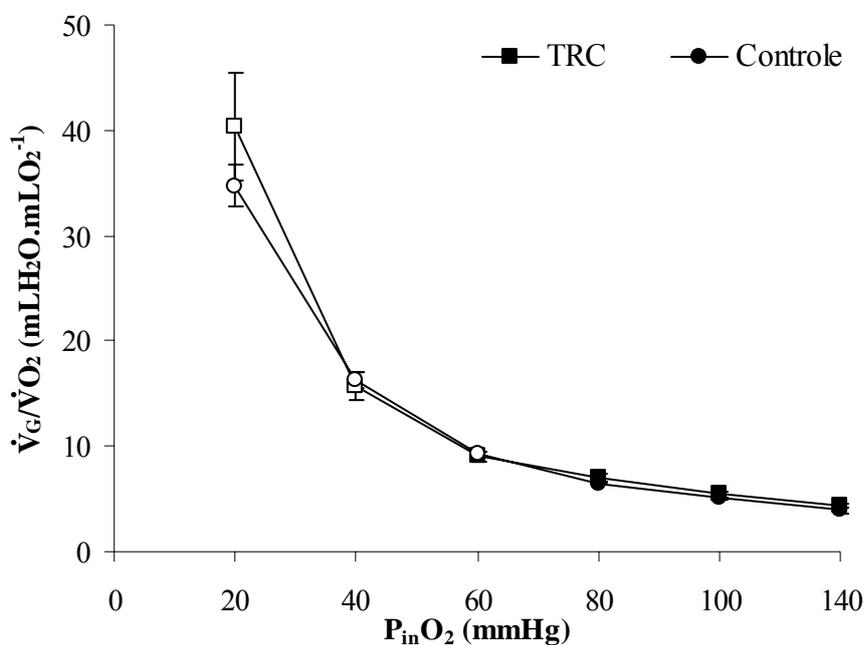
| $P_{in}O_2$ (mmHg) | $V_T$ (mLH <sub>2</sub> O.kg <sup>-1</sup> .ciclo respiratório <sup>-1</sup> ) |                   |
|--------------------|--|-------------------|
|                    | Controle   | Triclorfon        |
| 139,6 ± 0,1        | 4,3 ± 0,5  | 8,2 ± 0,7 *       |
| 100,7 ± 0,2        | 5,5 ± 0,4  | 8,6 ± 0,8 *       |
| 80,1 ± 0,3         | 7,1 ± 0,6  | 9,5 ± 0,7 *       |
| 60,3 ± 0,1         | <b>10,0 ± 0,8</b>  | 11,5 ± 0,8        |
| 40,3 ± 0,1         | <b>15,3 ± 1,2</b>  | <b>16,2 ± 1,2</b> |
| 20,3 ± 0,2         | <b>21,5 ± 1,9</b>  | <b>25,9 ± 2,6</b> |



**Figura 16:** Volume ventilatório ( $V_T$ ) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

**Tabela 6:** Valores médios da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  - mLH<sub>2</sub>O.mLO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg) (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

| $P_{in}O_2$ (mmHg) | $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ (mLH <sub>2</sub> O.mLO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> ) |                   |
|--------------------|---|-------------------|
|                    | Controle  | Triclorfon        |
| 139,6 ± 0,1        | 3,9 ± 0,2   | 4,3 ± 0,2         |
| 100,7 ± 0,2        | 5,1 ± 0,1   | 5,4 ± 0,3         |
| 80,1 ± 0,3         | 6,5 ± 0,1   | 7,0 ± 0,4         |
| 60,3 ± 0,1         | <b>9,3 ± 0,2</b>  | 9,0 ± 0,4         |
| 40,3 ± 0,1         | <b>16,3 ± 0,7</b>   | <b>15,6 ± 1,3</b> |
| 20,3 ± 0,2         | <b>34,7 ± 2,0</b>   | <b>40,3 ± 5,1</b> |



**Figura 17:** Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Valores médios ± E.P.M.

#### 4.2.6 Extração de oxigênio (EO<sub>2</sub>)

Os valores médios de extração de oxigênio (EO<sub>2</sub>) frente às diferentes tensões de oxigênio da água de entrada no respirômetro (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>) estão apresentados na tabela 7 e representados graficamente na figura 18.

A EO<sub>2</sub> dos peixes do grupo controle obtida em normóxia (82,8 ± 2,3 %) manteve-se constante até a tensão de 60 mmHg, abaixo da qual, os valores de EO<sub>2</sub> reduziram-se significativamente, atingindo seus valores mínimos na tensão de 20 mmHg (51,4 ± 3,2 %), correspondendo a uma redução de aproximadamente 38%.

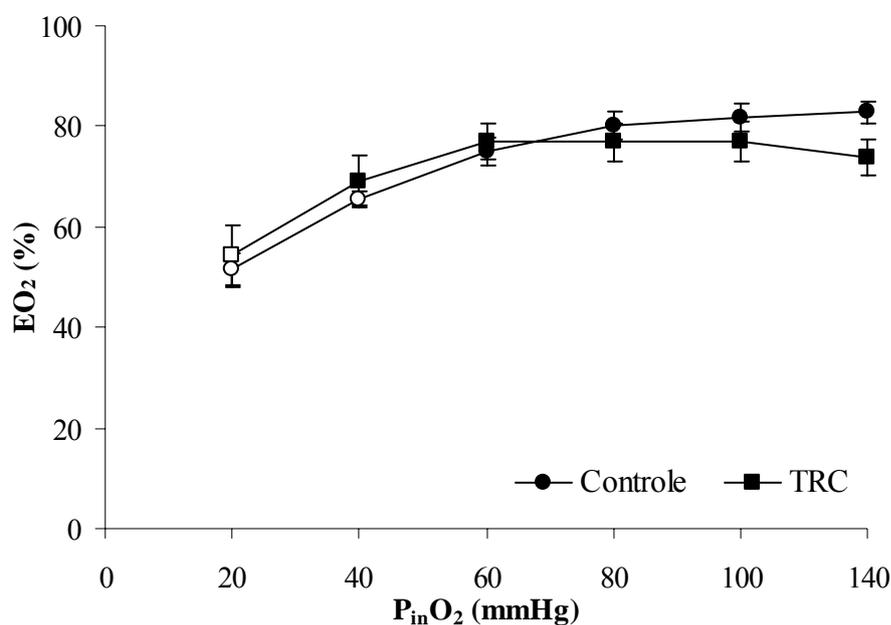
Nos peixes do grupo exposto ao TRC, a EO<sub>2</sub> obtida em normóxia (73,8 ± 3,7 %) manteve-se constante até a tensão de 40 mmHg, abaixo da qual, os valores da EO<sub>2</sub> obtidos foram significativamente menores do que aqueles observados em normóxia. Os menores valores de EO<sub>2</sub> foram observados na tensão de 20 mmHg (54,2 ± 6,3 %), correspondendo a uma redução de aproximadamente 27%.

A comparação dos valores de EO<sub>2</sub> de ambos os grupos experimentais não revelou diferenças significativas em nenhuma das tensões de O<sub>2</sub> analisadas.

A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

**Tabela 7:** Valores médios da extração de O<sub>2</sub> (EO<sub>2</sub> - %) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg) (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

| P <sub>in</sub> O <sub>2</sub> (mmHg) | EO <sub>2</sub> (%) |                   |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------|
|                                       | Controle            | Triclorfon        |
| 139,6 ± 0,1                           | 82,8 ± 2,3          | 73,8 ± 3,7        |
| 100,7 ± 0,2                           | 81,8 ± 2,9          | 77,0 ± 3,9        |
| 80,1 ± 0,3                            | 80,2 ± 2,7          | 76,8 ± 3,9        |
| 60,3 ± 0,1                            | 75,1 ± 2,8          | 76,9 ± 3,5        |
| 40,3 ± 0,1                            | <b>65,3 ± 1,5</b>   | 69,2 ± 5,0        |
| 20,3 ± 0,2                            | <b>51,4 ± 3,2</b>   | <b>54,2 ± 6,3</b> |



**Figura 18:** Extração de oxigênio (EO<sub>2</sub>) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg) (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

#### 4.2.7 Freqüência cardíaca

Os valores médios de freqüência cardíaca ( $f_H$  - bpm) *in vivo* de *O. niloticus* dos grupos controle e exposto ao triclorfon (TRC) nas diferentes tensões de  $O_2$  estão apresentados na tabela 8 e representados graficamente na figura 19.

A  $f_H$  do grupo controle manteve-se constante entre as tensões de  $O_2$  de 140 e 40 mmHg, com valores em torno de  $36,0 \pm 0,8$  bpm. Na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg ocorreu uma bradicardia significativa e a  $f_H$  atingiu o valor mínimo de  $29,5 \pm 2,4$  bpm, correspondente a uma redução de 23 % em relação ao valor observado em normóxia.

No grupo exposto ao TRC, a  $f_H$  apresentou o mesmo padrão de resposta, com valores de aproximadamente  $30,0 \pm 1,3$  bpm nas tensões de 100 a 40 mmHg. Na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg, este grupo também apresentou bradicardia e a  $f_H$  atingiu o valor mínimo de  $29,5 \pm 2,4$  bpm, correspondente a uma redução de 25 % em relação ao valor observado em normóxia.

Os valores de  $f_H$  do grupo exposto ao TRC foram significativamente inferiores aos registrados para o grupo controle em todas as tensões de  $O_2$  experimentais (Figura 18), correspondendo a uma redução de aproximadamente 23 %.

A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

#### 4.2.8 Intervalo R-R

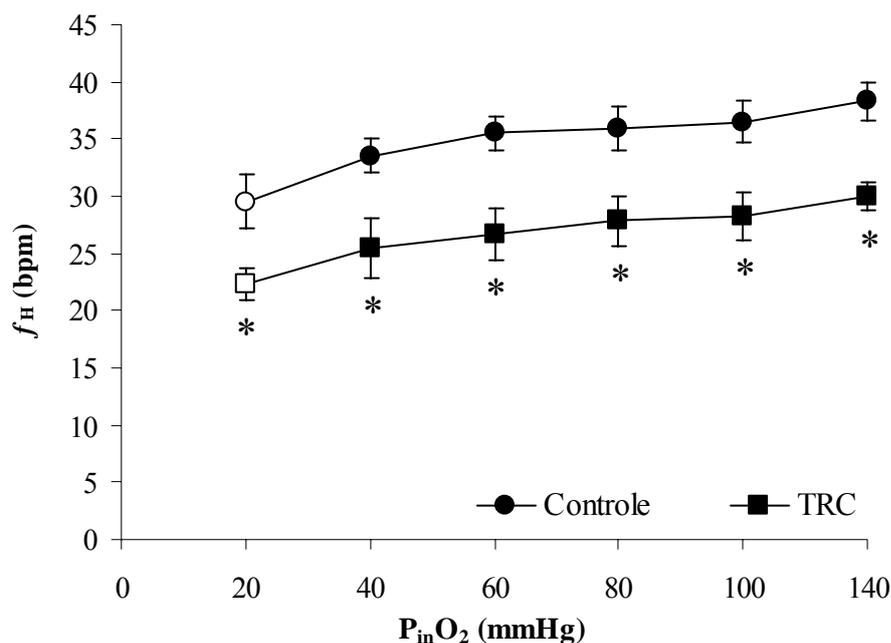
Os valores médios do intervalo R-R para os grupos controle e exposto ao TRC estão apresentados na tabela 9 e representados graficamente na figura 20.

O intervalo R-R do grupo controle foi mantido constante até 40 mmHg, aumentando significativamente em 20 mmHg, enquanto que no grupo TRC, este parâmetro foi mantido constante em todas as  $P_{in}O_2$  experimentais. Entretanto, os valores de intervalo RR do grupo TRC foram significativamente superiores aos do controle no intervalo de  $P_{in}O_2$  compreendido entre 140 e 40 mmHg.

A análise de variância two-way indicou que não houve interação significativa entre a exposição ao TRC e a hipóxia para este parâmetro.

**Tabela 8:** Valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia ( $139,6 \pm 0,1$  mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

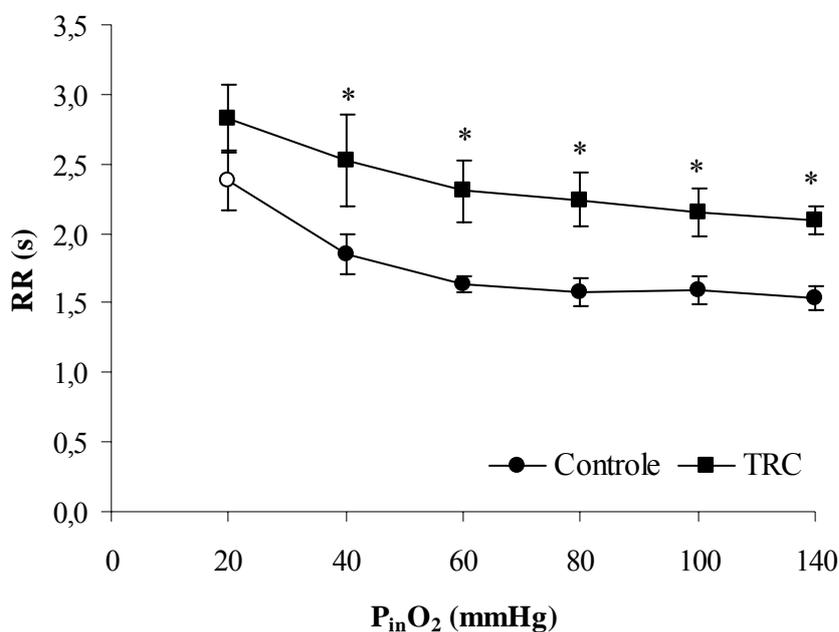
| $P_{in}O_2$ (mmHg) | $f_H$ (bpm)                      |                                    |
|--------------------|----------------------------------|------------------------------------|
|                    | Controle                         | Triclorfon                         |
| $139,6 \pm 0,1$    | $38,4 \pm 1,6$                   | $30,0 \pm 1,3$ *                   |
| $100,7 \pm 0,2$    | $36,5 \pm 1,8$                   | $28,3 \pm 2,1$ *                   |
| $80,1 \pm 0,3$     | $35,9 \pm 1,9$                   | $27,8 \pm 2,1$ *                   |
| $60,3 \pm 0,1$     | $35,5 \pm 1,5$                   | $26,7 \pm 2,2$ *                   |
| $40,3 \pm 0,1$     | $33,6 \pm 1,5$                   | $25,5 \pm 2,6$ *                   |
| $20,3 \pm 0,2$     | <b><math>29,5 \pm 2,4</math></b> | <b><math>22,3 \pm 1,3</math></b> * |



**Figura 19:** Frequência cardíaca ( $f_H$ ) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia ( $139,6 \pm 0,1$  mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

**Tabela 9:** Valores médios do intervalo R-R (s) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à diferentes tensões de O<sub>2</sub> na água. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

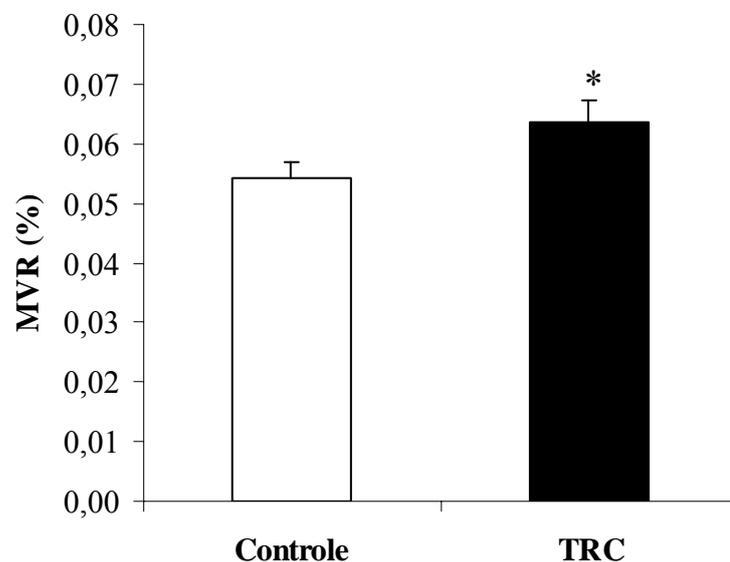
| <b>P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> (mmHg)</b> | <b>Intervalo R-R</b> |                   |
|---|----------------------|-------------------|
|   | <b>Controle</b>      | <b>Triclorfon</b> |
| 139,6 ± 0,1                               | 1,5 ± 0,1            | 2,1 ± 0,1 *       |
| 100,7 ± 0,2                               | 1,6 ± 0,1            | 2,1 ± 0,2 *       |
| 80,1 ± 0,3                                | 1,6 ± 0,1            | 2,2 ± 0,2 *       |
| 60,3 ± 0,1                                | 1,6 ± 0,1            | 2,3 ± 0,2 *       |
| 40,3 ± 0,1                                | 1,9 ± 0,1            | 2,5 ± 0,3 *       |
| 20,3 ± 0,2                                | <b>2,4 ± 0,2</b>     | 2,8 ± 0,2         |



**Figura 20:** Intervalo R-R de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 7) e exposto ao TRC (n = 7), submetidos à hipóxia gradual. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (139,6 ± 0,1 mmHg). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

### 4.3 Massa ventricular relativa

O índice de massa ventricular relativa, apresentado na figura 21, mostrou-se significativamente maior no grupo tratado com TRC ( $0,063 \pm 0,003$  %), quando comparado com o grupo controle ( $0,054 \pm 0,002$  %).



**Figura 21:** Massa ventricular relativa (%) de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 10) e exposto ao TRC (n = 10). O asterisco indica diferença significativa entre os grupos experimentais ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

## 4.4 Experimentos *in vitro*

### 4.4.1 Efeito do tempo experimental

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *O. niloticus*, estimulados a 0,2 Hz, ao longo do tempo experimental (40 min), nos grupos controle e exposto ao TRC estão apresentados na tabela 10 e representados graficamente na figura 22. Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT - Time to Peak tension e THR - Time to Half Relaxation) são apresentados na tabela 11 e representados na figura 23.

Durante todo o protocolo experimental não houve redução significativa na  $F_c$  em ambos os grupos. Entretanto, o grupo exposto ao TRC apresentou uma redução significativa na  $F_c$  quando comparado com o grupo controle (de  $6,3 \pm 0,5$  para  $4,2 \pm 0,3 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), durante os 40 minutos experimentais, correspondendo a uma redução de aproximadamente 33%.

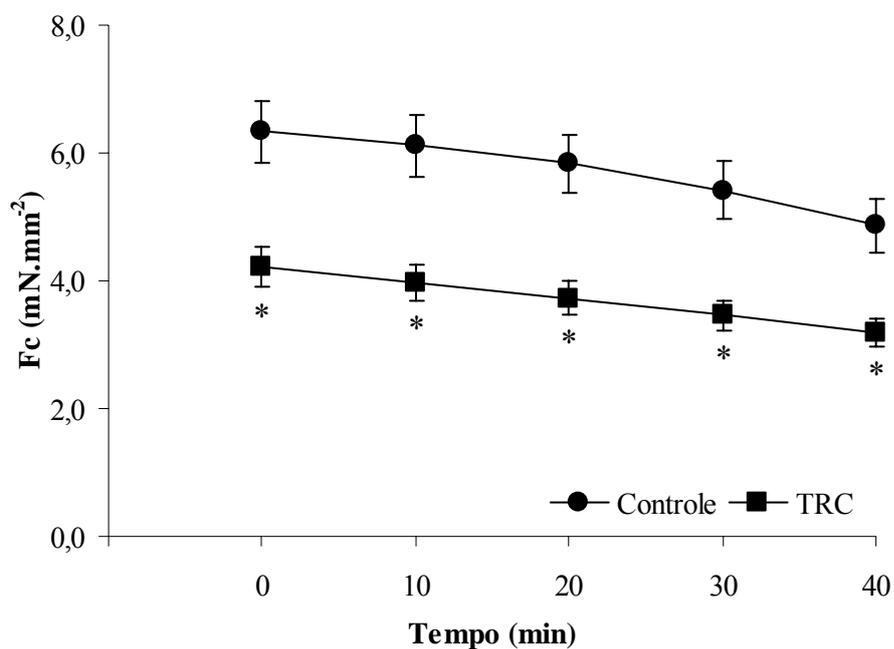
Os parâmetros tempo-dependentes (TPT e TRH) não sofreram alteração significativa durante os 40 minutos experimentais em nenhum dos grupos, considerando-se os mesmos tempos experimentais. Também não foram verificadas diferenças significativas entre estes parâmetros quando comparados os diferentes grupos experimentais.

O grupo controle apresentou valores médios de  $545,0 \pm 15,6$  ms para o TPT e de  $402,1 \pm 21,6$  ms para o THR enquanto que no grupo exposto ao TRC, estes valores foram de  $583,2 \pm 20,4$  e  $453,4 \pm 47,8$  ms, respectivamente.

No entanto, ao analisar-se a relação entre os parâmetros tempo-dependentes e a força de contração em cada grupo experimental de forma isolada, foi possível observar que tanto a relação TPT/ $F_c$  quanto o THR/ $F_c$ , apresentaram aumentos significativos em seus valores no grupo exposto ao TRC durante todo o tempo experimental. Os valores médios para estes parâmetros estão apresentados na tabela 12 e representados graficamente na figura 24.

**Tabela 10:** Valores da força de contração isométrica (Fc -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* nos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 0,2 Hz. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

| Tempo (min) | Fc ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) |                 |
|-------------|---------------------------------------|-----------------|
|             | Controle                              | Triclorfon      |
| 0           | $6,3 \pm 0,5$                         | $4,2 \pm 0,3$ * |
| 10          | $6,1 \pm 0,5$                         | $4,0 \pm 0,3$ * |
| 20          | $5,8 \pm 0,5$                         | $3,7 \pm 0,3$ * |
| 30          | $5,4 \pm 0,4$                         | $3,5 \pm 0,2$ * |
| 40          | $4,9 \pm 0,4$                         | $3,2 \pm 0,2$ * |



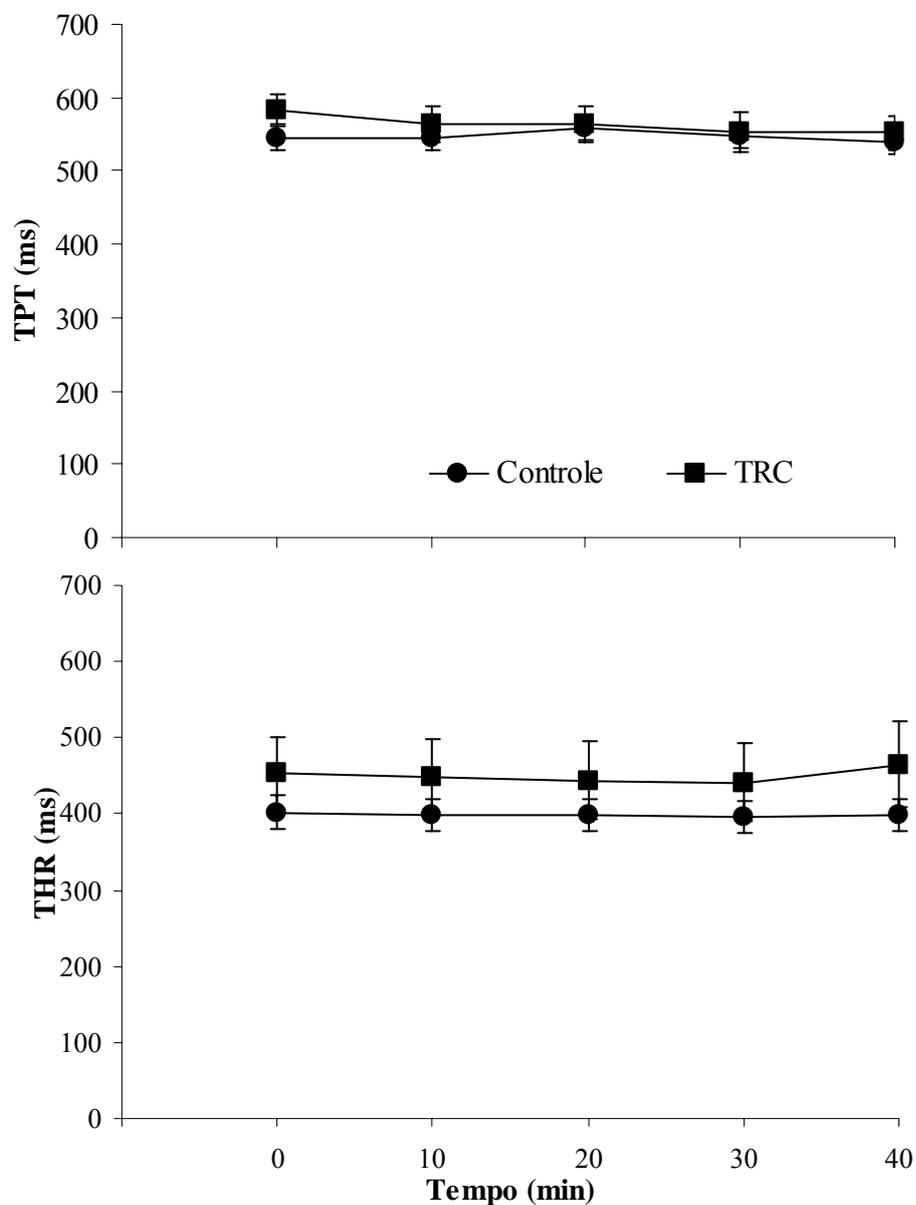
**Figura 22:** Efeito do tempo experimental (40 minutos) no desenvolvimento de força de contração isométrica (Fc) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 11:** Valores do tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, nos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 0,2 Hz. (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

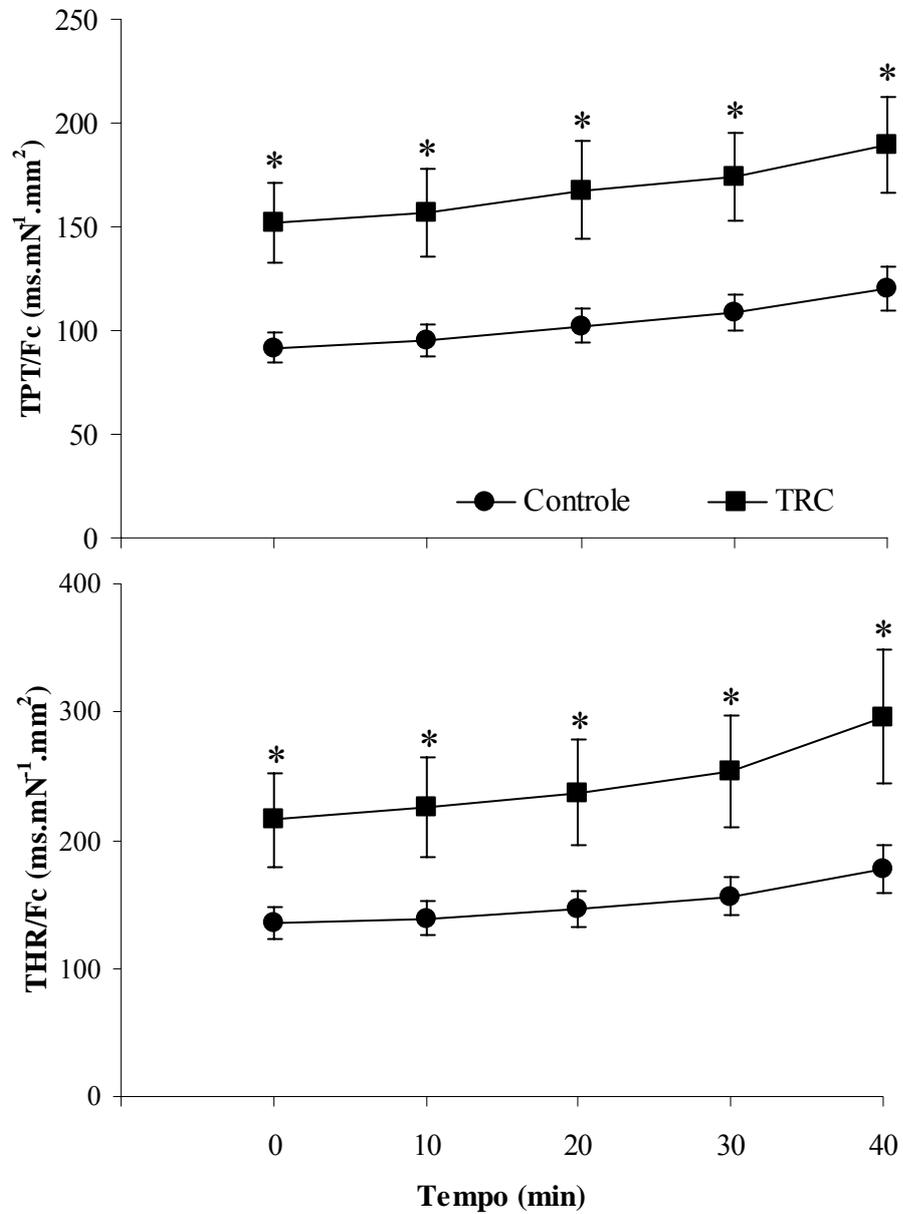
| Tempo (min) | TPT - ms     |              | THR - ms     |              |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|             | Controle     | Triclorfon   | Controle     | Triclorfon   |
| 0           | 545,0 ± 15,6 | 583,2 ± 20,4 | 402,1 ± 21,6 | 453,4 ± 47,8 |
| 10          | 544,4 ± 15,3 | 563,6 ± 25,4 | 398,5 ± 20,9 | 448,6 ± 50,4 |
| 20          | 558,3 ± 16,7 | 563,5 ± 25,2 | 397,6 ± 21,2 | 443,9 ± 50,3 |
| 30          | 547,7 ± 15,9 | 553,8 ± 27,3 | 395,1 ± 21,4 | 441,8 ± 52,0 |
| 40          | 538,4 ± 15,0 | 552,5 ± 23,4 | 397,6 ± 21,1 | 464,7 ± 56,9 |

**Tabela 12:** Valores da relação TPT/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) e THR/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), submetidas a 40 minutos de estimulação à frequência de 0,2 Hz. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

| Tempo (min) | TPT/Fc - $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ |                | THR/Fc - $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ |                |
|-------------|--|----------------|--|----------------|
|             | Controle                                 | Triclorfon     | Controle                                 | Triclorfon     |
| 0           | 91,8 ± 7,4                               | 152,2 ± 19,1 * | 135,3 ± 12,8                             | 215,7 ± 36,2 * |
| 10          | 95,1 ± 7,6                               | 156,9 ± 21,0 * | 139,1 ± 13,2                             | 225,0 ± 39,0 * |
| 20          | 102,2 ± 8,0                              | 167,7 ± 23,6 * | 145,8 ± 14,0                             | 237,3 ± 41,3 * |
| 30          | 108,3 ± 8,7                              | 174,4 ± 21,2 * | 156,3 ± 15,3                             | 253,7 ± 44,0 * |
| 40          | 120,0 ± 10,5                             | 189,1 ± 23,0 * | 177,7 ± 18,7                             | 296,4 ± 52,3 * |



**Figura 23:** Efeito do tempo experimental (40 minutos) nos tempos para o pico de tensão (TPT - ms) e para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



**Figura 24:** Efeito do tempo experimental (40 minutos) na relação TPT/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) e THR/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle ( $n = 12$ ) e exposto ao TRC ( $n = 12$ ). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Aumento da concentração de cálcio extracelular

O efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_e$ ) sobre a força de contração ( $F_c - mN.mm^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares dos grupos controle e exposto ao TRC estão apresentados na tabela 13 e representados graficamente na figura 25.

A elevação do  $(Ca^{2+})_e$  provocou um efeito inotrópico positivo nas tiras ventriculares de *O. niloticus* de ambos os grupos experimentais. No grupo controle, a partir da concentração de 8,5 mM, houve um aumento significativo na  $F_c$  (de  $6,1 \pm 0,2$  para  $9,7 \pm 0,7 mN.mm^{-2}$ ) enquanto que no grupo exposto ao TRC, esse aumento significativo ocorreu a partir de 10,5 mM (de  $3,9 \pm 0,4$  para  $6,7 \pm 0,7 mN.mm^{-2}$ ).

A  $F_c$  do grupo controle foi significativamente maior que a observada para o grupo exposto ao TRC em todas  $[Ca^{2+}]_e$ .

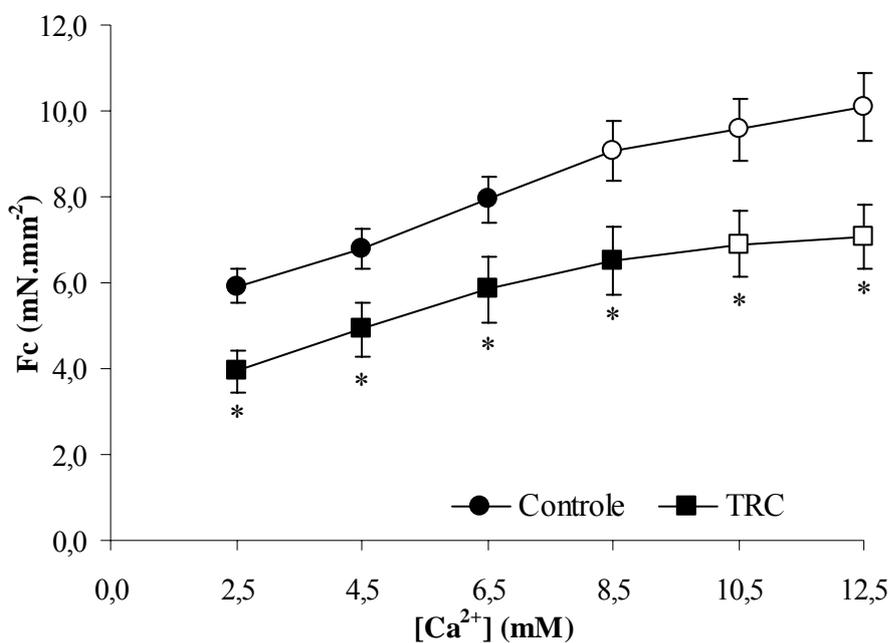
A tabela 14 apresenta os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *O. niloticus* de ambos os grupos experimentais, quando submetidas à elevação gradual da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ .

A análise estatística revelou que, durante as elevações da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ , os valores de TPT não sofreram alterações significativas (Figura 26). Os valores de THR obtidos em todas as  $[Ca^{2+}]_e$  seguiram a mesma tendência apresentada pelos valores de TPT, não sendo observadas alterações significativas deste parâmetro (Figura 26).

No entanto, a análise da relação entre os parâmetros tempo-dependentes e a força de contração em cada grupo experimental revelou que tanto a relação TPT/ $F_c$  quanto a relação THR/ $F_c$  apresentaram aumentos significativos em seus valores no grupo exposto ao TRC, durante todo o tempo experimental (Tabela 15 e Figura 27). Em ambos os grupos, os valores de TPT/ $F_c$  apresentaram reduções significativas a partir da  $[Ca^{2+}]_e$  de 8,5 mM, quando comparados aos valores iniciais (2,5 mM).

**Tabela 13:** Valores da força de contração isométrica (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup>. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios ± E.P.M.

| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub> (mM) | Fc (mN.mm <sup>-2</sup> ) |                    |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|
|                                       | Controle                  | Triclorfon         |
| 2,5                                   | 5,9 ± 0,4                 | 3,9 ± 0,5 *        |
| 4,5                                   | 6,8 ± 0,4                 | 4,9 ± 0,6 *        |
| 6,5                                   | 7,9 ± 0,5                 | 5,9 ± 0,8 *        |
| 8,5                                   | <b>9,1 ± 0,7</b>          | 6,5 ± 0,8 *        |
| 10,5                                  | <b>9,6 ± 0,7</b>          | <b>6,9 ± 0,8 *</b> |
| 12,5                                  | <b>10,1 ± 0,8</b>         | <b>7,1 ± 0,7 *</b> |



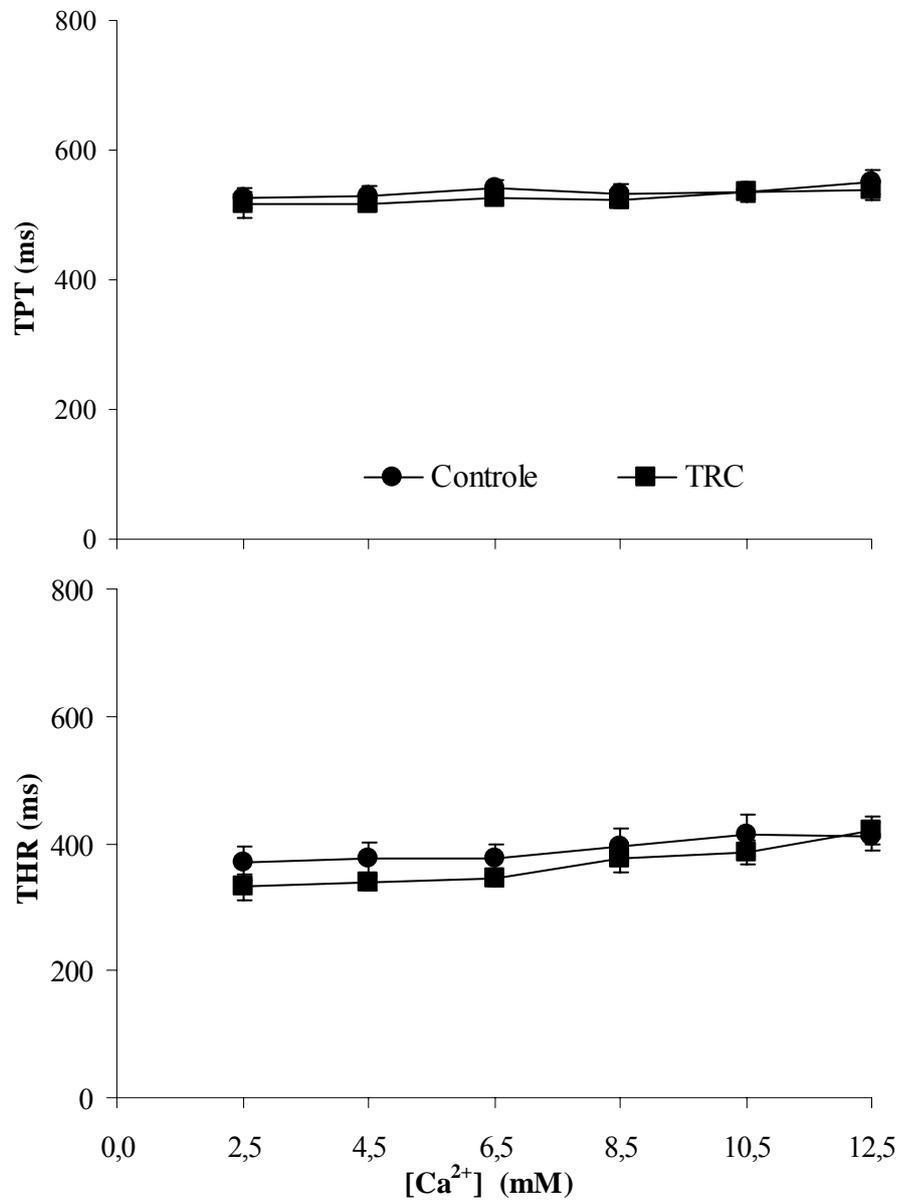
**Figura 25:** Efeito da elevação gradual na concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> no desenvolvimento de força (Fc) pelas tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05).

**Tabela 14:** Valores do tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ . (P < 0,05). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

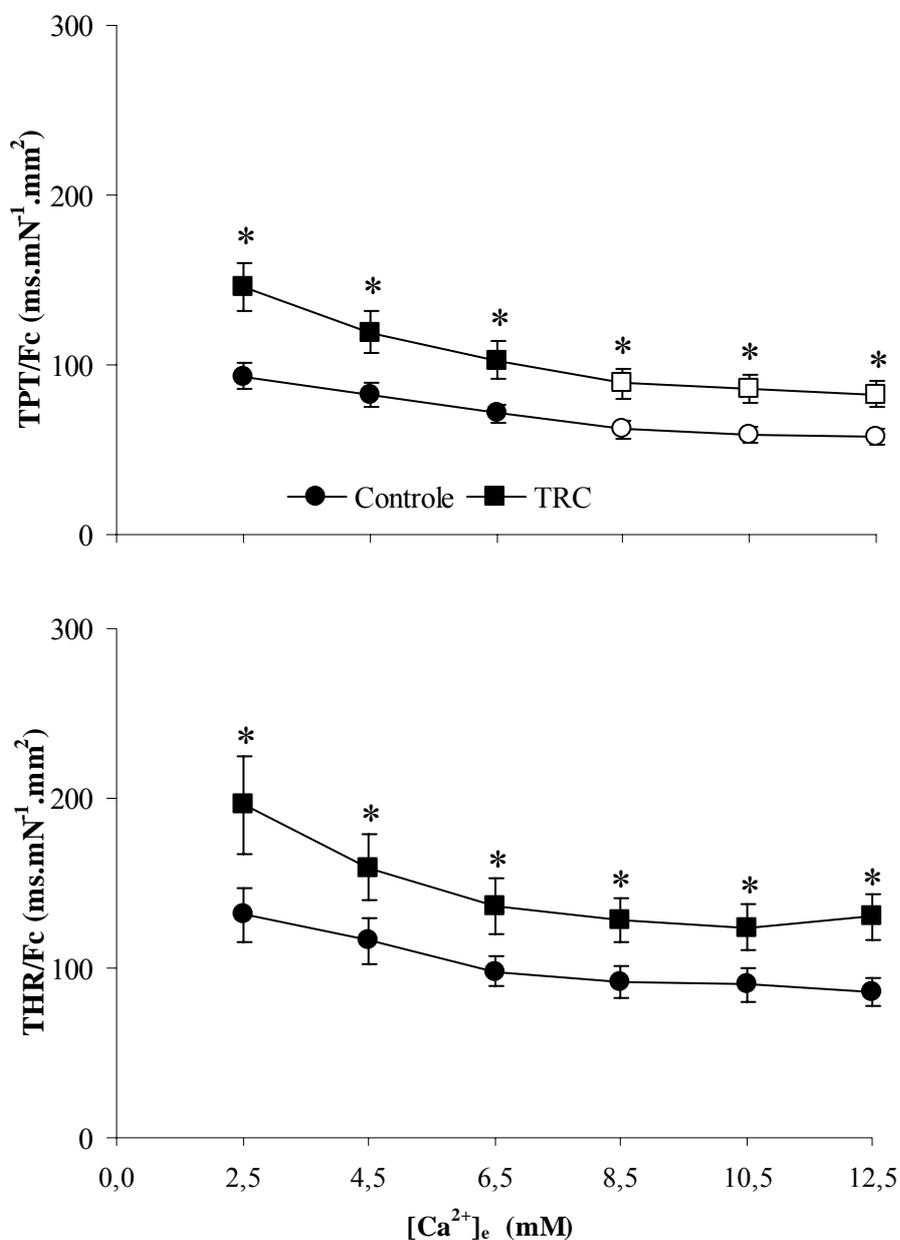
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub><br>(mM) | TPT - ms         |                  | THR - ms         |                  |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
|  | Controle         | Triclorfon       | Controle         | Triclorfon       |
| 2,5                                      | 501,7 $\pm$ 13,3 | 521,5 $\pm$ 19,8 | 331,2 $\pm$ 15,4 | 343,9 $\pm$ 22,0 |
| 4,5                                      | 506,5 $\pm$ 15,5 | 522,9 $\pm$ 11,3 | 336,1 $\pm$ 15,3 | 354,0 $\pm$ 19,4 |
| 6,5                                      | 536,4 $\pm$ 16,9 | 531,0 $\pm$ 10,4 | 341,0 $\pm$ 13,0 | 358,5 $\pm$ 18,3 |
| 8,5                                      | 511,9 $\pm$ 14,2 | 532,0 $\pm$ 14,8 | 361,9 $\pm$ 23,7 | 396,1 $\pm$ 27,3 |
| 10,5                                     | 515,7 $\pm$ 19,8 | 544,2 $\pm$ 13,7 | 370,8 $\pm$ 18,5 | 398,0 $\pm$ 21,4 |
| 12,5                                     | 524,6 $\pm$ 16,1 | 546,5 $\pm$ 15,0 | 387,6 $\pm$ 11,8 | 426,8 $\pm$ 21,3 |

**Tabela 15:** Valores da relação TPT/Fc (ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) e THR/Fc (ms.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta à elevação gradual na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ . Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub><br>(mM) | TPT/Fc ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> |                                    | THR/Fc - ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> |                    |
|--|---|------------------------------------|---|--------------------|
|  | Controle                                    | Triclorfon                         | Controle                                      | Triclorfon         |
| 2,5                                      | 93,2 $\pm$ 7,7                              | 145,9 $\pm$ 14,1 *                 | 131,4 $\pm$ 16,1                              | 196,0 $\pm$ 29,0 * |
| 4,5                                      | 81,9 $\pm$ 7,2                              | 119,4 $\pm$ 12,7 *                 | 116,0 $\pm$ 13,6                              | 159,0 $\pm$ 19,4 * |
| 6,5                                      | 71,2 $\pm$ 5,5                              | 102,9 $\pm$ 11,2 *                 | 98,2 $\pm$ 8,8                                | 136,3 $\pm$ 16,3 * |
| 8,5                                      | <b>62,0 <math>\pm</math> 5,4</b>            | <b>89,2 <math>\pm</math> 8,6 *</b> | 91,5 $\pm$ 9,4                                | 128,3 $\pm$ 13,0 * |
| 10,5                                     | <b>58,8 <math>\pm</math> 5,1</b>            | <b>85,5 <math>\pm</math> 8,2 *</b> | 90,2 $\pm$ 10,0                               | 123,7 $\pm$ 13,4 * |
| 12,5                                     | <b>57,4 <math>\pm</math> 4,8</b>            | <b>82,6 <math>\pm</math> 7,5 *</b> | 85,9 $\pm$ 8,2                                | 130,1 $\pm$ 13,7 * |



**Figura 26:** Efeito da elevação gradual na concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> nos tempos para o pico de tensão (TPT - ms) e para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12).



**Figura 27:** Efeito da elevação gradual na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  nas relações TPT/Fc ( $ms.mN^{-1}.mm^2$ ) e THR/Fc ( $ms.mN^{-1}.mm^2$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle ( $n = 12$ ) e exposto ao TRC ( $n = 12$ ). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (2,5 mM). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.3 Aumento da frequência de estimulação

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *O. niloticus* sujeitos a incrementos na frequência de estimulação (Hz) até que os registros se tornassem irregulares, nos grupos controle e exposto ao TRC, estão apresentados na tabela 16 e representados graficamente na figura 28. Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) são apresentados na tabela 17 e representados na figura 29.

No do grupo controle, o aumento da frequência de estimulação causou uma redução significativa da  $F_c$  em relação aos valores iniciais (0,2 Hz) a partir da frequência de estimulação de 1,0 Hz (de  $6,4 \pm 0,6$  para  $4,4 \pm 0,4 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ). Neste grupo as preparações foram capazes de manter contrações regulares até a frequência de 3,0 Hz, quando os valores mínimos de  $F_c$  foram registrados ( $0,4 \pm 0,1 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ).

No grupo exposto ao TRC, o aumento da frequência de estimulação causou uma redução significativa da  $F_c$  em relação aos valores iniciais (0,2 Hz) a partir da frequência de estimulação de 0,8 Hz (de  $4,3 \pm 0,2$  para  $3,5 \pm 0,2 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ). As preparações não foram capazes de manter contrações regulares a partir da frequência de 2,8 Hz, quando os valores mínimos de  $F_c$  foram registrados ( $0,4 \pm 0,1 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ).

Os valores de  $F_c$  no grupo controle foram significativamente superiores aos registrados para o grupo exposto ao TRC em todas as frequências de estimulação experimentais.

Os valores de TPT obtidos a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz ( $475,7 \pm 7,3$  ms) no grupo controle e 0,8 Hz ( $432,6 \pm 4,9$  ms) no grupo exposto ao TRC foram significativamente inferiores aos valores iniciais (controle:  $548,6 \pm 12,6$  ms; TRC:  $537,7 \pm 13,6$  ms), atingindo os valores mínimos de  $157,4 \pm 14,6$  ms na frequência de 3,0 Hz (grupo controle) e  $162,3 \pm 23,7$  ms na frequência de 2,8 Hz (grupo exposto ao TRC).

Em ambos os grupos experimentais, os valores de THR sofreram reduções significativas a partir da frequência de 0,8 Hz. No controle, o THR inicial ( $366,4 \pm 22,4$  ms) reduziu-se significativamente para  $298,8 \pm 11,6$  ms a 0,8 Hz, chegando ao valor mínimo de  $86,6 \pm 8,1$  ms na frequência de 3,0 Hz. No grupo TRC, o valor inicial de  $347,6 \pm 14,5$  ms reduziu-se para  $293,1 \pm 7,8$  ms a 0,8 Hz, chegando ao valor mínimo de  $85,0 \pm 11,5$  ms na frequência de 2,8 Hz.

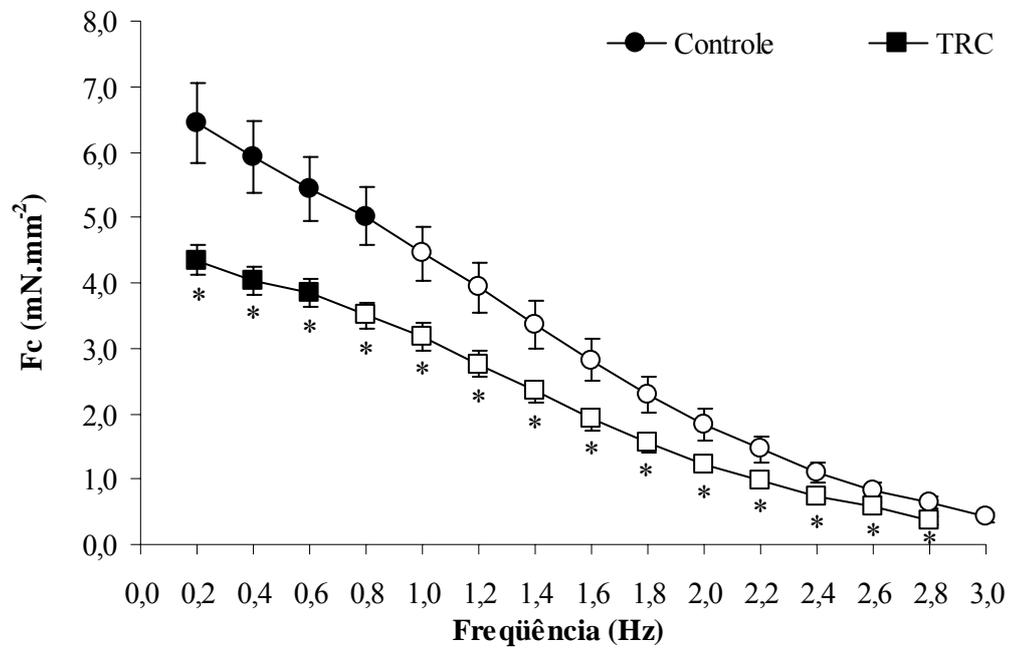
Quando comparados entre si, os valores de TPT e de THR de ambos os grupos experimentais não diferiram significativamente durante os incrementos na frequência de estimulação.

A análise da relação entre os parâmetros tempo-dependentes e a força de contração em cada grupo experimental é apresentada na tabela 18 e representada graficamente na figura 30.

O grupo controle apresentou elevações significativas tanto nos valores da relação TPT/Fc quanto o THR/Fc a partir frequência de estimulação de 2,4 Hz enquanto que tais aumentos ocorreram a partir de 2,2 Hz no grupo TRC. Adicionalmente, o grupo TRC apresentou valores de TPT/Fc e THR/Fc significativamente superiores aos do grupo controle em todas as frequências de estimulação experimentais.

**Tabela 16:** Valores da força de contração ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle ( $n = 12$ ) e exposto ao TRC ( $n = 12$ ), em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

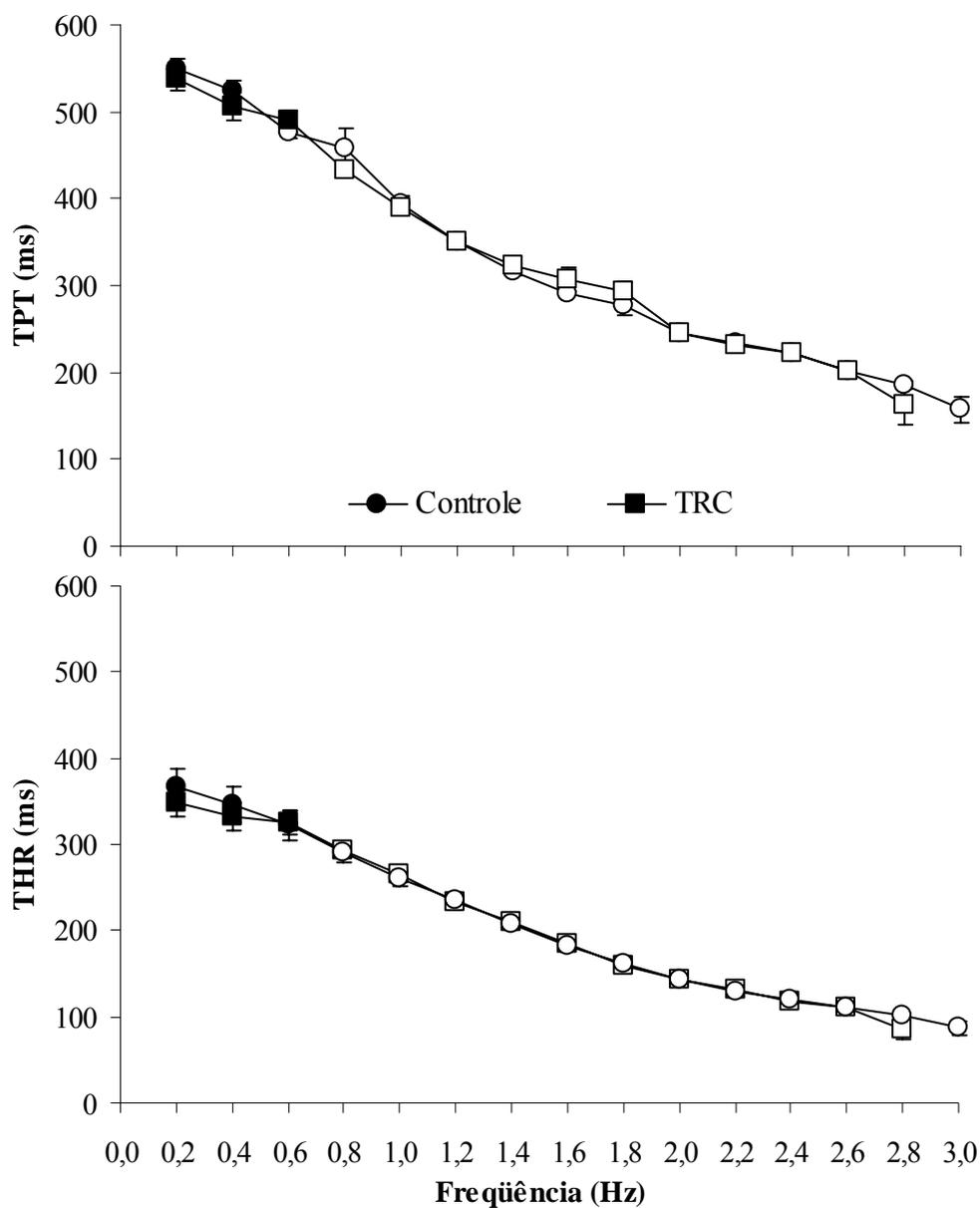
| Frequência (Hz) | $F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) |                                   |
|-----------------|--|-----------------------------------|
|                 | Controle                                 | Triclorfon                        |
| 0,2             | 6,4 $\pm$ 0,6                            | 4,3 $\pm$ 0,2 *                   |
| 0,4             | 5,9 $\pm$ 0,5                            | 4,0 $\pm$ 0,2 *                   |
| 0,6             | 5,4 $\pm$ 0,5                            | 3,8 $\pm$ 0,2 *                   |
| 0,8             | 5,0 $\pm$ 0,57                           | <b>3,5 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,0             | <b>4,4 <math>\pm</math> 0,4</b>          | <b>3,2 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,2             | <b>3,9 <math>\pm</math> 0,4</b>          | <b>2,8 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,4             | <b>3,4 <math>\pm</math> 0,4</b>          | <b>2,3 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,6             | <b>2,8 <math>\pm</math> 0,3</b>          | <b>1,9 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,8             | <b>2,3 <math>\pm</math> 0,3</b>          | <b>1,5 <math>\pm</math> 0,1 *</b> |
| 2,0             | <b>1,8 <math>\pm</math> 0,2</b>          | <b>1,2 <math>\pm</math> 0,1 *</b> |
| 2,2             | <b>1,5 <math>\pm</math> 0,2</b>          | <b>1,0 <math>\pm</math> 0,1 *</b> |
| 2,4             | <b>1,1 <math>\pm</math> 0,2</b>          | <b>0,7 <math>\pm</math> 0,1 *</b> |
| 2,6             | <b>0,8 <math>\pm</math> 0,1</b>          | <b>0,6 <math>\pm</math> 0,1 *</b> |
| 2,8             | <b>0,6 <math>\pm</math> 0,1</b>          | <b>0,4 <math>\pm</math> 0,1 *</b> |
| 3,0             | <b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>          |                                   |



**Figura 28:** Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração (Fc) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05).

**Tabela 17:** Valores do tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12), em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos iniciais (0,2 Hz) ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

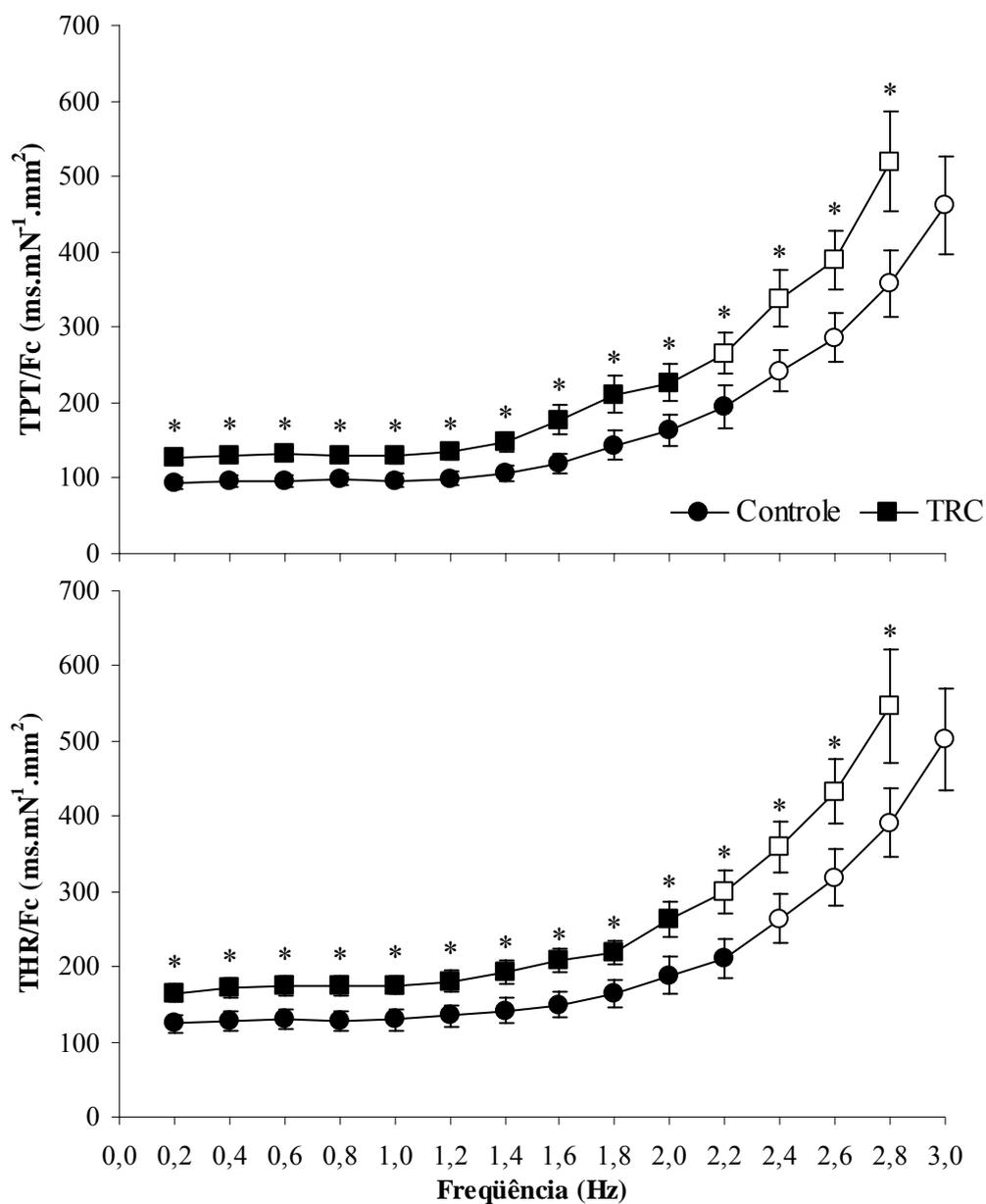
| Frequência<br>(Hz) | TPT - ms                           |                                    | THR - ms                           |                                   |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
|                    | Controle                           | Triclorfon                         | Controle                           | Triclorfon                        |
| 0,2                | 548,6 $\pm$ 12,6                   | 537,7 $\pm$ 13,6                   | 366,4 $\pm$ 22,4                   | 347,6 $\pm$ 14,5                  |
| 0,4                | 525,4 $\pm$ 9,7                    | 505,3 $\pm$ 15,7                   | 346,1 $\pm$ 21,4                   | 333,2 $\pm$ 16,3                  |
| 0,6                | <b>475,7 <math>\pm</math> 7,3</b>  | 489,5 $\pm$ 12,4                   | 322,4 $\pm$ 17,7                   | 324,7 $\pm$ 14,2                  |
| 0,8                | <b>457,3 <math>\pm</math> 22,8</b> | <b>432,6 <math>\pm</math> 4,9</b>  | <b>290,8 <math>\pm</math> 11,6</b> | <b>293,1 <math>\pm</math> 7,8</b> |
| 1,0                | <b>393,3 <math>\pm</math> 8,9</b>  | <b>389,0 <math>\pm</math> 4,2</b>  | <b>259,6 <math>\pm</math> 8,5</b>  | <b>264,6 <math>\pm</math> 4,5</b> |
| 1,2                | <b>351,0 <math>\pm</math> 4,5</b>  | <b>349,5 <math>\pm</math> 4,5</b>  | <b>235,4 <math>\pm</math> 4,8</b>  | <b>233,1 <math>\pm</math> 3,4</b> |
| 1,4                | <b>315,9 <math>\pm</math> 3,7</b>  | <b>322,8 <math>\pm</math> 3,0</b>  | <b>207,6 <math>\pm</math> 3,2</b>  | <b>209,8 <math>\pm</math> 2,2</b> |
| 1,6                | <b>291,2 <math>\pm</math> 2,6</b>  | <b>307,0 <math>\pm</math> 14,5</b> | <b>182,5 <math>\pm</math> 2,2</b>  | <b>184,4 <math>\pm</math> 2,0</b> |
| 1,8                | <b>276,7 <math>\pm</math> 10,9</b> | <b>292,2 <math>\pm</math> 12,5</b> | <b>161,5 <math>\pm</math> 2,5</b>  | <b>158,7 <math>\pm</math> 3,0</b> |
| 2,0                | <b>245,5 <math>\pm</math> 2,8</b>  | <b>245,2 <math>\pm</math> 3,3</b>  | <b>142,7 <math>\pm</math> 1,8</b>  | <b>143,9 <math>\pm</math> 2,1</b> |
| 2,2                | <b>234,7 <math>\pm</math> 5,9</b>  | <b>231,1 <math>\pm</math> 1,5</b>  | <b>129,7 <math>\pm</math> 1,3</b>  | <b>131,7 <math>\pm</math> 2,0</b> |
| 2,4                | <b>222,3 <math>\pm</math> 6,4</b>  | <b>222,5 <math>\pm</math> 7,7</b>  | <b>120,8 <math>\pm</math> 2,8</b>  | <b>118,7 <math>\pm</math> 1,6</b> |
| 2,6                | <b>200,9 <math>\pm</math> 4,3</b>  | <b>201,0 <math>\pm</math> 3,8</b>  | <b>111,4 <math>\pm</math> 1,1</b>  | <b>111,9 <math>\pm</math> 1,7</b> |
| 2,8                | <b>186,3 <math>\pm</math> 4,3</b>  | <b>162,3 <math>\pm</math> 23,7</b> | <b>102,0 <math>\pm</math> 0,8</b>  | <b>85,0 <math>\pm</math> 11,5</b> |
| 3,0                | <b>157,4 <math>\pm</math> 14,6</b> |                                    | <b>86,6 <math>\pm</math> 8,1</b>   |                                   |



**Figura 29:** Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 12) e exposto ao TRC (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz) ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 18:** Valores da na relação TPT/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) e THR/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, nos grupos controle ( $n = 12$ ) e exposto ao TRC ( $n = 12$ ), em resposta a incrementos na frequência de estimulação. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

| Frequência<br>(Hz) | TPT/Fc $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ |                                      | THR/Fc - $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ |                                      |
|--------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|
|                    | Controle                               | Triclorfon                           | Controle                                 | Triclorfon                           |
| 0,2                | 92,4 $\pm$ 7,8                         | 128,2 $\pm$ 8,2 *                    | 123,7 $\pm$ 12,0                         | 165,1 $\pm$ 11,2 *                   |
| 0,4                | 96,1 $\pm$ 8,1                         | 129,9 $\pm$ 8,8 *                    | 127,3 $\pm$ 12,9                         | 170,9 $\pm$ 12,6 *                   |
| 0,6                | 95,1 $\pm$ 8,0                         | 131,6 $\pm$ 8,2 *                    | 130,4 $\pm$ 13,8                         | 174,3 $\pm$ 12,2 *                   |
| 0,8                | 97,7 $\pm$ 7,6                         | 128,8 $\pm$ 8,2 *                    | 128,1 $\pm$ 13,6                         | 175,0 $\pm$ 12,6 *                   |
| 1,0                | 96,9 $\pm$ 8,6                         | 129,0 $\pm$ 9,2 *                    | 129,8 $\pm$ 14,1                         | 175,5 $\pm$ 12,7 *                   |
| 1,2                | 99,1 $\pm$ 9,3                         | 134,8 $\pm$ 10,5 *                   | 134,8 $\pm$ 14,5                         | 179,8 $\pm$ 14,1 *                   |
| 1,4                | 106,0 $\pm$ 10,8                       | 148,1 $\pm$ 12,2 *                   | 141,3 $\pm$ 16,2                         | 192,0 $\pm$ 15,1 *                   |
| 1,6                | 118,4 $\pm$ 12,7                       | 176,4 $\pm$ 19,5 *                   | 149,3 $\pm$ 17,0                         | 208,0 $\pm$ 16,5 *                   |
| 1,8                | 143,6 $\pm$ 20,1                       | 210,5 $\pm$ 25,0 *                   | 164,2 $\pm$ 19,0                         | 219,6 $\pm$ 15,5 *                   |
| 2,0                | 163,4 $\pm$ 21,7                       | 226,7 $\pm$ 23,7 *                   | 188,4 $\pm$ 24,4                         | 262,5 $\pm$ 24,3 *                   |
| 2,2                | 195,3 $\pm$ 28,7                       | <b>265,6 <math>\pm</math> 27,7 *</b> | 211,3 $\pm$ 25,7                         | <b>298,6 <math>\pm</math> 28,6 *</b> |
| 2,4                | <b>241,9 <math>\pm</math> 27,4</b>     | <b>338,2 <math>\pm</math> 37,0 *</b> | <b>264,0 <math>\pm</math> 32,6</b>       | <b>358,9 <math>\pm</math> 34,8 *</b> |
| 2,6                | <b>285,8 <math>\pm</math> 32,4</b>     | <b>388,5 <math>\pm</math> 38,5 *</b> | <b>318,5 <math>\pm</math> 37,7</b>       | <b>432,5 <math>\pm</math> 42,8 *</b> |
| 2,8                | <b>357,0 <math>\pm</math> 43,7</b>     | <b>518,8 <math>\pm</math> 66,4 *</b> | <b>391,2 <math>\pm</math> 45,7</b>       | <b>547,3 <math>\pm</math> 75,4 *</b> |
| 3,0                | <b>461,2 <math>\pm</math> 64,8</b>     |                                      | <b>502,3 <math>\pm</math> 68,5</b>       |                                      |



**Figura 30:** Efeito do aumento da frequência de estimulação nas relações TPT/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) e THR/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle ( $n = 12$ ) e exposto ao TRC ( $n = 12$ ). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.4 Capacidade de bombeamento cardíaco

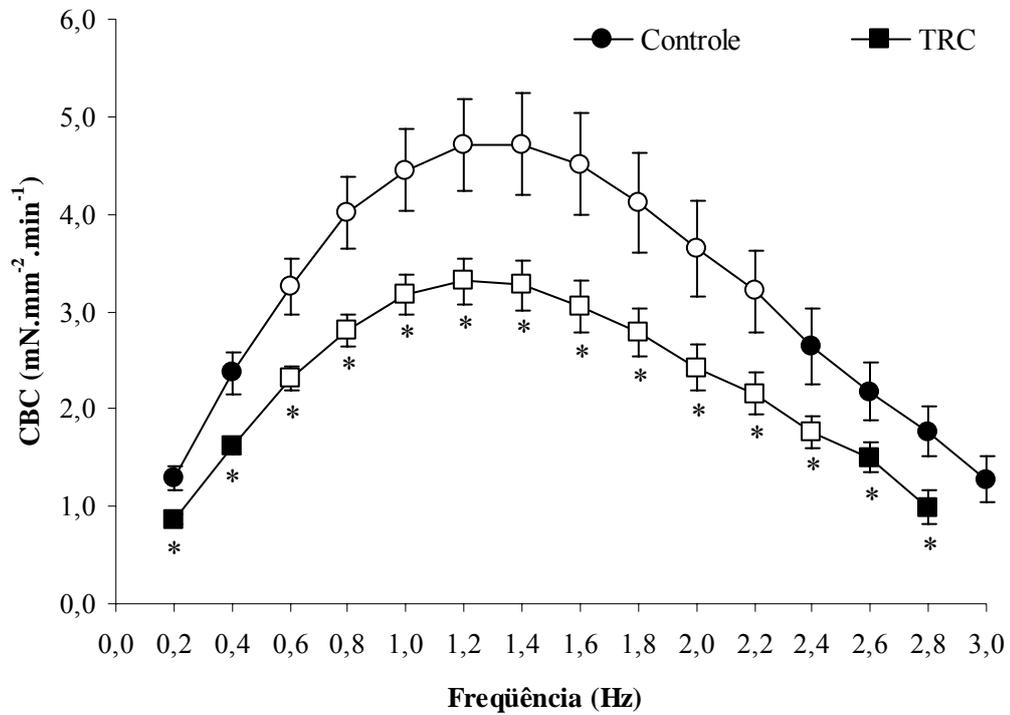
O produto da frequência de estimulação pela força de contração isométrica máxima foi usado para mensurar a capacidade de bombeamento cardíaco - CBC ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Os valores médios deste parâmetro estão apresentados na tabela 19 e representados graficamente na figura 31.

Os valores máximos da CBC foram obtidos entre 0,6 e 2,2 Hz ( $3,26 \pm 0,29$  e  $3,21 \pm 0,43 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente) no grupo controle e entre 0,8 a 2,0 Hz ( $2,80 \pm 0,16$  a  $2,42 \pm 0,24 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente) no grupo exposto ao TRC.

A análise estatística revelou que os valores de CBC do grupo controle foram significativamente superiores aos do grupo exposto ao TRC em todas as frequências de estimulação experimentais.

**Tabela 19:** Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle ( $n = 12$ ) e exposto ao TRC ( $n = 12$ ). Valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

| Frequência (Hz) | CBC ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) |                                   |
|-----------------|--|-----------------------------------|
|                 | Controle   | Triclorfon                        |
| 0,2             | 1,3 $\pm$ 0,1  | 0,9 $\pm$ 0,0 *                   |
| 0,4             | 2,4 $\pm$ 0,2  | 1,6 $\pm$ 0,1 *                   |
| 0,6             | <b>3,3 <math>\pm</math> 0,3</b>                            | <b>2,3 <math>\pm</math> 0,1 *</b> |
| 0,8             | <b>4,0 <math>\pm</math> 0,4</b>                            | <b>2,8 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,0             | <b>4,4 <math>\pm</math> 0,4</b>                            | <b>3,2 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,2             | <b>4,7 <math>\pm</math> 0,5</b>                            | <b>3,3 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 1,4             | <b>4,7 <math>\pm</math> 0,5</b>                            | <b>3,3 <math>\pm</math> 0,3 *</b> |
| 1,6             | <b>4,5 <math>\pm</math> 0,5</b>                            | <b>3,1 <math>\pm</math> 0,3 *</b> |
| 1,8             | <b>4,1 <math>\pm</math> 0,5</b>                            | <b>2,8 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 2,0             | <b>3,6 <math>\pm</math> 0,5</b>                            | <b>2,4 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 2,2             | <b>3,2 <math>\pm</math> 0,4</b>                            | <b>2,2 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 2,4             | 2,6 $\pm$ 0,4  | <b>1,8 <math>\pm</math> 0,2 *</b> |
| 2,6             | 2,2 $\pm$ 0,3  | 1,5 $\pm$ 0,2 *                   |
| 2,8             | 1,8 $\pm$ 0,3  | 1,0 $\pm$ 0,2 *                   |
| 3,0             | 1,3 $\pm$ 0,2  |                                   |



**Figura 31:** Capacidade de bombeamento cardíaco (CBC -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus* dos grupos controle ( $n = 12$ ) e exposto ao TRC ( $n = 12$ ). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Experimentos *in vivo*

#### 5.1.1 Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e Tensão crítica de oxigênio ( $PcO_2$ )

O amplo uso de pesticidas tornou-se uma ameaça constante aos ecossistemas aquáticos, os quais estão freqüentemente expostos à crescente ação antropogênica (ADAMS & GREELEY, 2000). Dentre os pesticidas, os organofosforados (OPs) merecem destaque pelo seu amplo uso em todo o mundo, especialmente na agricultura. Apesar dos OPs apresentarem baixa persistência e serem facilmente degradados na natureza, há uma preocupação a respeito destes pesticidas, devido a sua toxicidade a espécies não-alvos, mesmo quando em baixas concentrações (YAN et al., 2006).

Segundo Lang et al. (1997), os peixes são particularmente sensíveis à contaminação da água e a presença de poluentes pode interferir significativamente em determinados processos fisiológicos, como observados no presente estudo.

Os baixos níveis de oxigênio dissolvido estão entre os principais problemas comumente encontrados onde a poluição aquática está presente e muitas respostas fisiológicas de peixes a esses poluentes são semelhantes àquelas desencadeadas em resposta à hipóxia ambiental (HEATH, 1995).

O consumo de oxigênio integra a atividade metabólica global de um animal em resposta a fatores ambientais específicos, refletindo o gasto energético (MEHRLE & MAYER, 1984). A taxa metabólica de peixes normalmente é mensurada pelo consumo de oxigênio, o qual é particularmente útil em casos de exposição à xenobióticos, sendo recomendado como índice de toxicidade subletal, uma vez que esta medida indica o custo aeróbico da exposição ao composto (CAMPBELL et al., 2002; CHENG & FARRELL, 2007; MACKINNON & FARRELL 1992).

De acordo com Randall, citado por Schlenk et al. (2008), em organismos aquáticos existe uma correlação positiva entre o consumo de  $O_2$ /taxa metabólica e a transferência do xenobiótico através das brânquias. Assim, este parâmetro pode ser uma ferramenta útil para prever a exposição branquial ao composto em questão (YANG et al., 2000a,b).

Yang et al. (2000a) sugerem que as brânquias são a principal via para a entrada de xenobióticos em peixes. As trocas gasosas são rápidas e o influxo do xenobiótico por outras

vias (p. ex. alimentação) acaba sendo menos importante. Assim, estes autores consideram possível estimar a taxa de transferência do xenobiótico utilizando a taxa de consumo de O<sub>2</sub> do peixe.

Quando o consumo de oxigênio é medido em função da redução da pressão parcial de oxigênio da água, os peixes podem ser: (i) conformistas - a  $\dot{V}O_2$  se reduz de maneira uniforme com a diminuição do oxigênio ambiental, ou (ii) reguladores - a  $\dot{V}O_2$  permanece relativamente constante com a redução do oxigênio ambiental desde o valor de saturação até a tensão crítica de oxigênio (PcO<sub>2</sub>), abaixo da qual a  $\dot{V}O_2$  se reduz com a diminuição da pressão de oxigênio ambiental, provavelmente devido à redução gradual na eficiência dos mecanismos homeostáticos envolvidos na tomada de O<sub>2</sub> pelas brânquias e na difusão do gás para os tecidos (DAVIS, 1975; STEFFENSEN, 2006).

O presente estudo reforça os resultados prévios de Fernandes & Rantin (1989) e Kalinin et al. (1999), os quais mostraram que a espécie *Oreochromis niloticus* é oxireguladora, já que a  $\dot{V}O_2$  manteve-se constante, independente da PO<sub>2</sub> ambiental. No entanto, o presente estudo revela que a exposição ao triclorfon (TRC) não apenas reduziu os valores de  $\dot{V}O_2$  em condições hipóxicas, como também aumentou significativamente a PcO<sub>2</sub>, reduzindo a capacidade de manter a tomada de O<sub>2</sub> constante, reduzindo as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos.

De acordo com Heath (1995), os organofosforados parecem inibir o consumo de O<sub>2</sub> e, portanto, a taxa metabólica *in vivo*. Rath & Misra (1979) notaram uma inibição dose-dependente na  $\dot{V}O_2$ , que varia com o tamanho do peixe, sendo que peixes de menor tamanho apresentaram uma maior inibição da  $\dot{V}O_2$  após 15 da exposição ao OP diclorvós (1,0 mg.L<sup>-1</sup>). Entretanto, estes autores também verificaram que os peixes de menor tamanho se recuperaram mais rapidamente quando colocados em água não contaminada, sugerindo um processo de desintoxicação mais rápido nestes animais, obtido por meio de elevações na taxa metabólica.

O metil paration levou a uma redução de 14% na  $\dot{V}O_2$  de tilápias mossambicas (*Tilapia mossambica*) expostas durante 48 h a 1/3 da CL<sub>50</sub> (RAO et al., 1985). Este mesmo OP também reduziu a  $\dot{V}O_2$  em matrinxãs (*Brycon cephalus*) expostos a 1/3 da CL<sub>50</sub> durante 96 h (OLLE, 2007).

Percas “spangled” (*Leiopotherapon unicolor*) expostas a 10 mg.L<sup>-1</sup> do OP temefós mostraram a mesma tendência citada acima, havendo redução da  $\dot{V}O_2$  de 0,17 mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para aproximadamente 0,10 mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> após 2 h de exposição e para, aproximadamente,

0,06 mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> após 3 horas de exposição (GEHRKE, 1988). Uma possível razão para este resultado poderia estar relacionada ao aumento da produção de muco nas brânquias, também observada nos animais expostos ao TRC no presente estudo, embora em pequena quantidade.

Segundo McKim et al. (1987), as respostas cardio-respiratórias de peixes expostos a OPs podem ser explicadas pela ação desses compostos na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). A tomada de oxigênio pelas brânquias é amplamente determinada pela área de superfície funcional respiratória, a qual pode ser aumentada pela epinefrina, através de vasodilatação, ou diminuída pela acetilcolina, através de vasoconstrição. Assim, a inibição da AChE nas brânquias poderia resultar em contínua estimulação das junções neuro-musculares, levando à constrição na base das artérias eferentes dos filamentos branquiais, reduzindo o fluxo de sangue através das lamelas secundárias. Como o TRC é capaz de inibir a atividade da AChE muscular em tilápia-do-Nilo (GUIMARÃES et al., 2007), tal inibição também poderia estar ocorrendo nas brânquias, causando a redução na eficiência da tomada de oxigênio observada no presente estudo, relacionada a uma redução na área da superfície funcional respiratória.

### 5.1.2 Parâmetros ventilatórios

A manutenção da homeostasia respiratória depende da capacidade de mobilizar mecanismos compensatórios, como o aumento na ventilação branquial, para manter o gradiente de oxigênio entre a água e o sangue o mais elevado possível, assegurando assim a eficiência nas trocas gasosas (FERNANDES & RANTIN, 1989). O aumento na ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) em resposta à redução na tensão de oxigênio ambiental foi observado em várias espécies de peixes, como em traíra (*Hoplias malabaricus*), trairão (*Hoplias lacerdae*) (RANTIN et al., 1992), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (KALININ et al., 2000), entre outras.

No presente trabalho, ambos os grupos experimentais apresentaram aumentos significativos na  $\dot{V}_G$  frente à hipóxia gradual. Esses aumentos em ambos os grupos foram caracterizados pelo maior aumento no volume ventilatório ( $V_T$ ), quando comparado com a frequência respiratória ( $f_R$ ).

Em resposta à hipóxia, diferentes estratégias são utilizadas pelos peixes para ajustar a ventilação branquial. Um tipo de resposta é o aumento na  $\dot{V}_G$  devido a um maior aumento na

$f_R$  do que no  $V_T$ , assim como observado na carpa comum, *Cyprinus carpio* (MARVIN & HEATH, 1968), bluegill, *Lepomis macrochirus* (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979) e pacu, *Piaractus mesopotamicus* (AGUIAR et al., 2002).

Contudo, a resposta mais comumente observada em teleósteos é um maior aumento no volume ventilatório ( $V_T$ ), quando comparado com a frequência respiratória ( $f_R$ ). Alguns exemplos de espécies que apresentam esse tipo de resposta são: tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (FERNANDES & RANTIN, 1989; KALININ et al., 1999), traíra, *Hoplias malabaricus* (KALININ et al., 1993), curimatá, *Prochilodus scrofa* (FERNANDES et al., 1995) e cascudo, *Hypostomus regani* (MATTIAS et al., 1998).

Do ponto de vista metabólico, este maior aumento no  $V_T$  em relação à  $f_R$  é, aparentemente, a forma mais eficaz de aumentar a  $\dot{V}_G$ , uma vez que o custo energético deste processo é, geralmente, muito alto em teleósteos (JOHANSEN et al., 1967). 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.

No presente estudo a  $\dot{V}_G$  de ambos os grupos experimentais não diferiu significativamente em normóxia, resposta também observada por Olle (2007) em matrinxãs (*Brycon cephalus*) expostos ao metil paration. No entanto, ao reduzir-se a  $PO_2$ , os peixes expostos ao TRC, foi observada uma redução na  $\dot{V}_G$ , a qual pode estar associada a uma redução no  $V_T$ , possivelmente associada a um prejuízo nos mecanismos compensatórios que conservam o  $V_T$  aumentado frente a redução na  $PO_2$ .

Ao analisar a exposição aguda ao clorpirifós em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Bradbury et al. (1991) observaram uma redução na  $f_R$  destes animais, enquanto o  $V_T$  manteve-se aumentado e a  $\dot{V}O_2$  manteve-se próxima aos valores obtidos anteriormente à exposição ao OP, tendências também observadas no presente estudo.

A reduzida  $f_R$  registrada para o grupo exposto ao TRC, também foi observada em tilápia mossambica (*Tilapia mossambica*) exposta ao malation (BASHA et al., 1984) e em perca “spangled” (*L. unicolor*) exposta ao temefós (GEHRKE, 1988). Uma possível razão para essa resposta seria o rápido efeito dos OPs nos nervos respiratórios (GEHRKE, 1988).

Segundo Sancho et al. (1998), peixes expostos a inseticidas anticolinesterásicos apresentam sinais de paralisia muscular, especialmente nas brânquias e no aparelho ventilatório, devido à hiperestimulação colinérgica.

Coppage & Matthews (1974) sugeriram que os compostos OPs provavelmente causem a morte nos vertebrados superiores pelo bloqueio da neurotransmissão no centro respiratório (localizado no bulbo) ou nas junções neuromusculares do aparelho ventilatório. Além disso, de acordo com Cochran & Burnett (1996), os animais podem apresentar perda do controle muscular com o aumento de fasciculações e contrações musculares, o que poderia inibir a capacidade do animal ventilar, impedindo as trocas gasosas e levando a morte.

A necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ) é uma ferramenta útil para analisar as trocas gasosas. Um aumento na demanda de  $O_2$  pode ser atribuído a um aumento na  $\dot{V}_G$  ou na extração de oxigênio (DEJOURS, 1981). Aumentos na  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  durante a redução na disponibilidade de  $O_2$  são indicativos de uma reduzida eficiência na extração do oxigênio ( $EO_2$ ) da corrente ventilatória ou, em outras palavras, uma maior quantidade de água deve passar pela superfície funcional respiratória para que seja obtida a mesma quantidade de oxigênio.

No presente estudo, ambos os grupos experimentais apresentaram aumentos significativos na  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  frente à redução na  $PO_2$ , não sendo observadas diferenças significativas entre eles, sugerindo que a exposição ao TRC não afetou a eficácia na tomada de  $O_2$  pelas brânquias. Assim, a análise dos parâmetros ventilatórios sugere que a estrutura das brânquias não foi alterada pelo TRC.

Segundo Kerstens et al. (1979), os elevados valores de extração de  $O_2$  resultam em uma menor necessidade ventilatória, assim como observado no presente estudo.

De acordo com a "equação fundamental da fisiologia respiratória" de Dejourns (1981):  $\dot{V}O_2 = P_{in}O_2 \cdot EO_2 \cdot \dot{V}_G$ , quando a concentração de  $O_2$  do meio declina, a manutenção da tomada de  $O_2$  constante só é possível caso ocorra um aumento na ventilação branquial e/ou na extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ). Como a capacidade de aumento na  $EO_2$  é muito limitada em peixes, o aumento na  $\dot{V}_G$  é necessário para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  (KALININ, 1996). De fato, os valores de  $EO_2$  de ambos os grupos experimentais foram muito semelhantes no presente trabalho.

Martins (2007) expôs exemplares de *O. niloticus* ao TRC nas mesmas condições do presente estudo (0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TRC por 96 h) e verificou que este OP não induziu peroxidação lipídica nas brânquias. Além disso, as brânquias apresentaram aumento de atividade do sistema antioxidante, expresso pelo aumento das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST), aliado a uma possível

excreção de peróxidos diretamente pela superfície branquial, mecanismos estes que foram capazes de conter o aumento da concentração das ERO, ou seja, não ocorreu degeneração celular no tecido branquial. Tais resultados corroboram os encontrados no presente estudo, onde a  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$  e a  $EO_2$  foram mantidas nos níveis dos controles após a exposição ao TRC.

Assim, podemos observar que em condições normóxicas e nas tensões de 100 e 80 mmHg, apenas foram encontradas alterações na  $f_R$  e no  $V_T$ . No grupo exposto ao TRC, a  $f_R$  reduzida provavelmente foi resultado da ação deste OP nos nervos respiratórios, levando a uma paralisia muscular, especialmente nas brânquias e aparelho respiratório (GEHRKE, 1988; SANCHO et al., 1998), enquanto que o  $V_T$  aumentado parece ser um mecanismo de compensação para a reduzida  $f_R$ , permitindo assim, a passagem de um maior volume ventilatório pelas brânquias.

Nas tensões de 60 e 40 mmHg, houve uma redução da  $\dot{V}O_2$  no grupo exposto ao TRC, provavelmente associada a mecanismos utilizados para compensar tanto a exposição ao OP quanto a redução na  $PO_2$ . Esta resposta está também relacionada à redução na  $\dot{V}_G$ , associada também à redução da  $f_R$ . Nessas tensões, o  $V_T$  já não apresenta diferenças entre os grupos, o que poderia ter levado a redução na  $\dot{V}_G$ , provavelmente devido ao efeito do OP em conjunto com a redução da  $PO_2$ .

Na tensão de 20 mmHg, apenas foram observadas diferenças entre os grupos na  $\dot{V}_G$  e na  $f_R$ , provavelmente pelas razões já citadas anteriormente.

### 5.1.3 Frequência cardíaca ( $f_H$ ) e intervalo R-R

A frequência cardíaca ( $f_H$ ) é utilizada como um índice dos efeitos tóxicos causados pelos poluentes ambientais em peixes e reduções na  $f_H$  tem sido observadas em peixes expostos a uma variedade de xenobióticos (HEATH, 1995; TEUSCHLER et al., 2005).

No presente estudo, a exposição ao TRC reduziu significativamente a  $f_H$  em todas as tensões de  $O_2$  experimentais, quando comparadas ao grupo controle. Ambos os grupos analisados mantiveram a  $f_H$  constante e desenvolveram bradicardia na tensão de 20 mmHg.

De acordo com Farrell (1984), o reflexo bradicárdico produzido pela hipóxia pode ser fundamental para assegurar o desempenho do coração durante a hipóxia do miocárdio. Assim, a redução da  $f_H$  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 extração de  $O_2$  pelo próprio miocárdio esponjoso.

Gehrke (1988) também verificou uma redução na  $f_H$  em *L unicolor* frente à exposição ao temefós. Nesta espécie, a exposição a esse OP primeiramente inibiu a tomada de  $O_2$ , sendo a inibição cardíaca tardia, indicando que este OP afeta rapidamente os nervos respiratórios, levando certo tempo para alcançar o coração. De acordo com este autor, a razão para a redução imediata na  $\dot{V}O_2$  sem apresentar a bradicardia hipóxica, poderia estar relacionada com a inibição, pelo temefós, dos quimiorreceptores de  $O_2$  branquiais, bloqueando o reflexo bradicárdico à hipóxia, o que poderia ser o caso do presente estudo. Este mesmo autor sugere que o atraso entre as respostas ventilatória e cardíaca indicam que este OP atua diretamente nos nervos respiratórios e não via sistema nervoso central.

Reduções na  $f_H$  também foram observados em matrinxãs (*Brycon cephalus*) expostos ao metil paration (OLLE, 2007) e trutas arco-íris (*Salmo gairdneri*) expostas ao malation, carbaril e fenitrothion (DUANGSAWASDI & KLAVERKAMP, 1979; McKIM et al., 1987).

A inibição da AChE é particularmente crítica ao coração de peixes, já que o controle colinérgico vagal tem um papel inibitório fundamental, sendo que a modulação do tônus vagal é apontada como o principal mecanismo de controle da  $f_H$  (LAURENT et al., 1983). Assim, a inibição da AChE poderia potencializar o tônus vagal, levando a efeitos adversos na circulação sanguínea e em processos metabólicos. A inibição da função cardíaca pode interferir na tomada de  $O_2$  e a liberação de  $CO_2$  pelas brânquias e resultar em hipóxia tecidual (AGUIAR et al., 2004).

Segundo Antonijevic & Stojiljkovic (2007), os OPs compartilham um modo de ação comum, manifestando seus efeitos tóxicos primariamente via inibição da AChE. Conseqüentemente, a acetilcolina se acumula nas fendas sinápticas de músculos e nervos, levando a uma hiperestimulação dos receptores colinérgicos. A crise colinérgica aguda, imediatamente após a exposição aos OPs, inclui sinais e sintomas resultantes da hiperestimulação de receptores muscarínicos (p.ex. bradicardia e hipotensão), nicotínicos (p.ex. hipertensão, taquicardia, fasciculação) e ambos receptores centrais muscarínicos e nicotínicos (p.ex. tremores, incoordenação de movimentos, convulsões, depressão central da respiração, coma e morte).

Além disso, segundo Ward et al. (1993), alguns OPs podem agir diretamente nos receptores muscarínicos e atuar como agonistas ou antagonistas. Atuando como agonista

nesses receptores, a liberação de acetilcolina seria reduzida e a toxicidade resultante da inibição da AChE seria modificada. No entanto, a natureza dessa interação em vários tecidos e a contribuição dos efeitos diretos de anticolinesterásicos nos receptores muscarínicos e seus efeitos tóxicos ainda não estão completamente esclarecidos.

A análise dos registros eletrocardiográficos possibilita a verificação de pequenas variações no intervalo entre os batimentos cardíacos, as quais determinam os sinais de variabilidade da frequência cardíaca. Desta forma, é possível avaliar a presença ou não de um equilíbrio entre as influências simpática e parassimpática no ritmo cardíaco. O ramo simpático do sistema nervoso aumenta a  $f_H$ , implicando em intervalos mais curtos entre batimentos, e o ramo parassimpático a desacelera, resultando em intervalos maiores entre os batimentos. Assim, a variabilidade cardíaca pode ser medida com base nos intervalos entre batimentos, os quais são mais facilmente observados como intervalos R-R, que são os intervalos de tempo entre duas ondas R consecutivas (ALTIMIRAS, 1999; HAMILTON et al., 2004)

Alterações em alguns parâmetros ambientais como a temperatura da água (DE VERA & PRIEDE, 1991; PRIEDE, 1974) e a hipóxia ambiental (BORCH et al., 1993) podem influenciar a variabilidade cardíaca em peixes.

No presente estudo, foi possível observar que a exposição ao TRC aumentou o intervalo R-R, resultando em intervalos mais longos entre os batimentos, onde o ramo parassimpático atua desacelerando a  $f_H$  (HAMILTON et al., 2004). Esta redução tanto na  $f_H$ , quanto no intervalo R-R, observada no grupo exposto ao TRC, deve-se, provavelmente, à ação inibitória deste OP na AChE, potencializando o tônus vagal (AGUIAR et al., 2004).

## 5.2. Massa ventricular relativa

Em peixes, a massa ventricular relativa (MVR) apresenta uma grande variação, tanto interespecífica quanto intra-específica (FARREL & JONES, 1992). No presente estudo, a exposição ao TRC aumentou os valores da MVR em relação ao grupo controle. Infelizmente, não há nenhum dado disponível na literatura a respeito dos efeitos de OPs na morfologia do coração de peixes. Ratos Wistar que receberam uma dose subletal semanal, via enteral, do OP metamidofós, por 12 semanas consecutivas, desenvolveram hipertrofia nos miócitos cardíacos (CALORE et al., 2007), o que poderia estar relacionado a uma hipertensão arterial sistêmica durante o tratamento, como descrito por Saadeh et al. (1997) em 22% dos casos de intoxicação aguda por organofosforados e carbamatos em humanos.

Outro mecanismo que deve ser considerado é o possível papel do estresse oxidativo na indução de alterações fenotípicas no coração. Luo et al. (2006) submeteu miócitos cardíacos de ratos adultos a 24h de exposição ao ácido dietilditiocarbâmico (DDC, 1 M), um inibidor da superóxido dismutase (SOD) e verificou um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Este estresse oxidativo induzido pelo DDC causou uma hipertrofia nos miócitos ERO-dependente. Desta forma, o estresse oxidativo no tecido cardíaco, induzido pela exposição de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TRC em tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*), observado por Martins (2007), pode ser considerado como uma possível causa para a hipertrofia cardíaca encontrada.

Além disso, é importante enfatizar que, devido à ausência de túbulos transversos (túbulos T) nos miócitos de peixes, mesmo uma hipertrofia moderada pode aumentar a distância de difusão, afetar rapidamente o metabolismo aeróbio e limitar a contratilidade muscular (CLARK & RODNICK, 1998).

### 5.3 Experimentos *in vitro*

O protocolo do efeito do tempo experimental no desenvolvimento de força (Fc) pelas tiras ventriculares foi realizado para avaliar uma possível ocorrência de efeito inotrópico negativo no decorrer dos protocolos experimentais, que tiveram um tempo máximo de 40 minutos, devido à deterioração das preparações.

Assim, este primeiro protocolo mostrou que a Fc, tanto no grupo controle, quanto no grupo exposto ao TRC, manteve-se constante ao longo do experimento, não tendo sido registrado qualquer efeito inotrópico negativo devido à deterioração das preparações. Porém, foi possível observar um efeito inotrópico negativo do TRC sobre as preparações do grupo exposto a este organofosforado quando comparado ao grupo controle, uma vez que a Fc média deste grupo (~ 3,7 mN.mm<sup>-2</sup>) foi menor que a do grupo controle (~ 5,7 mN.mm<sup>-2</sup>). Estes resultados corroboram os descritos por Olle (2007) para matrinxãs, *B. cephalus* expostos a concentrações subletais de metil paration, os quais apresentaram valores de Fc 70% menores que os do grupo controle.

Os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) também não sofreram alterações durante o tempo experimental, nem com a exposição ao TRC. No entanto, ao relacionar esses parâmetros com os respectivos valores de Fc, foi possível observar um aumento nos valores de TPT/Fc e THR/Fc no grupo exposto ao TRC, provavelmente devido a um prejuízo nos

mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  no acoplamento E-C, levando um maior tempo para a contração e também para o relaxamento (SHIELS & FARRELL, 1997).

Dierkes-Tizek et al. (1984) descreveram um efeito inibitório do paroxon e paration na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase cardíaca de ratos, o que poderia aumentar o tempo de relaxamento. Se tal mecanismo é válido para peixes, o TRC poderia estar inibindo a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal no presente estudo, uma vez que foram observados aumentos tanto na razão TPT/Fc quanto na razão THR/Fc em todos os protocolos experimentais.

Segundo Costa et al. (2000), em *O. niloticus* o RS parece não ter importância funcional ao acoplamento E-C do músculo cardíaco, sugerindo que a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração do aparato contrátil é diretamente dependente do influxo e efluxo deste íon pela sarcolema (SL). Estes autores descreveram que aumentos na concentração de cálcio extracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) levam a um inotropismo positivo significativo nas tiras ventriculares de *O. niloticus*. Esta tendência foi confirmada no presente estudo. Porém, o efeito inotrópico positivo apresentado pelo grupo exposto ao TRC não foi suficiente para restaurar de Fc os valores desenvolvidos pelo grupo controle, o que indica que a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  não é um fator predominante para atuar contra o inotropismo negativo causado pelo TRC.

Apesar da menor Fc desenvolvida pelo grupo exposto ao TRC, o aumento na Fc causado pelo aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  foi proporcional em ambos os grupos, sugerindo que a exposição ao TRC não alterou a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ .

Os incrementos na  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  não causaram alterações significativas nos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) de nenhum dos grupos experimentais. Também não foram observadas diferenças significativas entre os valores de TPT e THR dos grupos controle e exposto ao TRC. No entanto, ao relacionar esses parâmetros com a respectiva Fc, foi possível observar aumentos tanto de TPT/Fc quanto de THR/Fc no grupo exposto ao TRC, provavelmente devido a um prejuízo nos mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o acoplamento E-C, assim como descrito anteriormente.

Diversos estudos avaliaram a relação entre a força isométrica máxima e a frequência de contração em diversas espécies de peixes. Na maioria destas espécies, 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 (SHIELS et al., 2002), semelhante ao observado em tilápia-do-Nilo, *O. niloticus* (COSTA et al., 2000), bem como no presente estudo, em ambos os grupos experimentais.

De acordo com Driedzic & Gesser (1985), a relação força-frequência negativa está relacionada a uma menor capacidade de obtenção de  $\text{Ca}^{2+}$  livre a partir das reservas

intracelulares, associada a mecanismos transsarcolemais insuficientes, do ponto de vista funcional, para a manutenção do inotropismo a elevadas taxas de estimulação, determinando indiretamente o grau de eficiência do acoplamento E-C no músculo cardíaco. Desta forma, o aumento da frequência de estimulação reduz o tempo disponível para a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  do interior da célula via retículo sarcoplasmático (RS) e trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (AHO & VORNANEN, 1998; HOVE-MADSEN et al., 1998).

Em ambos os grupos experimentais, a frequência máxima observada *in vitro* (3,0 Hz para os controles e 2,8 Hz para o grupo TRC) excedeu a frequência cardíaca observada *in vivo* (~ 0,6 Hz ou 36 bpm para os controle e ~ 0,5 Hz ou 30 bpm para o grupo TRC). Tais resultados são consistentes com os obtidos para várias espécies, tanto de clima tropical como temperado, indicando que os miócitos cardíacos não estão trabalhando, *in vivo*, no limite de capacidade de seu acoplamento E-C.

Os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) sofreram reduções nos seus valores com o aumento na frequência de estimulação, não tendo sido alterados pela exposição ao TRC. Porém, ao relacionar esses parâmetros com as respectivas Fc, foi possível observar aumentos nas relações TPT/Fc e THR/Fc no grupo exposto ao TRC, provavelmente devido a um prejuízo nos mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como descrito anteriormente.

No presente estudo, o efeito mais notável da exposição ao TRC nas preparações musculares cardíacas foi a redução no desenvolvimento de força em todos os protocolos experimentais.

Corroborando estes resultados, Martins (2007) observou que a exposição a 0,5 ppm de TRC por 96 horas, mesma concentração e tempo de exposição utilizados no presente estudo, causou estresse oxidativo no tecido cardíaco de *O. niloticus*. O TRC induziu aumentos significativos nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) e na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutaciona S-transferase (GST), bem como redução significativa nos níveis cardíacos de glutaciona reduzida (GSH). A indução das enzimas SOD e GST pode ser interpretada como uma adaptação do sistema antioxidante de defesa no sentido de compensar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio frente à exposição ao TRC. Entretanto, o aumento da atividade destas enzimas antioxidantes não foi suficiente para evitar danos oxidativos aos lipídios, o que pode levar a alterações na fluidez das membranas. A diminuição dos níveis de GSH reflete, provavelmente, um aumento na produção de oxidantes, num grau que excederia a capacidade de desintoxicação pela GSH.

Luo et al. (2006) verificaram que miócitos cardíacos de ratos adultos expostos por tempo prolongado ao estresse oxidativo apresentaram uma reduzida quantidade de canais de

Ca<sup>2+</sup> do tipo L, condições que favorece a redução da entrada de Ca<sup>2+</sup> pela SL, além da redução da quantidade de Ca<sup>2+</sup> armazenado no RS.

Considerando-se que no miocárdio ventricular de *O. niloticus* o cálcio ativador deve ser proveniente do meio extracelular e o estresse oxidativo induzido pelo TRC no músculo cardíaco (como descrito anteriormente), os efeitos descritos por Luo et al. (2006) poderiam ser responsáveis pelo efeito inotrópico negativo e pelo aumento nas relações TPT/Fc e THR/Fc observados no presente estudo.

Assim, a redução nos valores de  $f_H$  e Fc observados após a exposição ao TRC poderiam estar relacionados ao aumento da LPO cardíaca e ao desenvolvimento de estresse oxidativo. A peroxidação lipídica em membranas biológicas causa perda de fluidez, redução no potencial de membrana, aumento da permeabilidade ao H<sup>+</sup> e outros íons e, eventualmente, ruptura, levando a liberação do conteúdo da célula e organelas (GUTTERIDGE, 1995). Esses achados podem explicar, pelo menos em parte, a redução na eficiência cardíaca induzida pelo TRC no presente estudo.

Um importante índice do rendimento muscular é dado pelo produto da frequência de estimulação pela força isométrica máxima. Através deste cálculo é possível determinar a capacidade de bombeamento cardíaco - CBC (MATIKAINEN & VORNANEN, 1992), a qual apresentou menores valores nos animais do grupo exposto ao TRC. A exposição a este OP deslocou a curva de frequência ótima para baixo, devido seu efeito negativo no desenvolvimento de força, mostrando que a capacidade de bombeamento foi prejudicada pela exposição ao TRC.

Devido às características lipofílicas, os inseticidas se acumulam nas regiões lipídicas das membranas, onde podem induzir alterações físicas e químicas (VIDEIRA et al., 1996). Desta forma, a exposição a inseticidas organofosforados afeta amplamente o balanço celular do cálcio, tanto diretamente quanto indiretamente, através de receptores muscarínicos (HOWARD et al., 2007; RAHEJA & GILL, 2002; SUN et al., 2000), nicotínicos e/ou modificando a importância relativa de cada componente celular como fornecedor de cálcio para o aparato contrátil (SUN et al., 2000).

Em resumo, o presente trabalho mostrou que a exposição de tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TRC durante 96 h causou alterações na função cardio-respiratória. Do lado respiratório, o TRC induziu reduções tanto na  $\dot{V}O_2$  quanto na  $\dot{V}_G$  em hipóxia moderada a severa e elevação da PcO<sub>2</sub>, além de acentuada redução na  $f_R$ , efeitos

parcialmente devidos à ação deste OP na musculatura respiratória e nas brânquias. Tais efeitos podem reduzir a capacidade de sobrevivência desta espécie em condições hipóxicas prolongadas. Além disso, a exposição ao TRC levou a reduções marcantes tanto na  $f_H$  *in vivo* quanto na força de contração isométrica das tiras ventriculares de tilápia-do-Nilo.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, que avaliou a exposição por 96 horas à concentração subletal de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de triclorfon (Neguvon<sup>®</sup>) sobre a função cardio-respiratória do teleosteo de água doce de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), permitiram as seguintes conclusões:

- a) A exposição ao triclorfon (TRC) não apenas reduziu os valores da taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) como também aumentou significativamente a tensão crítica de  $O_2$  ( $PcO_2$ ), reduzindo a capacidade de manter a tomada de  $O_2$  constante, reduzindo as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos por períodos prolongados;
- b) O efeito do TRC sobre os parâmetros ventilatórios sugere a ação deste organofosforado sobre os nervos respiratórios devido a sua ação anticolinesterásica, aumentando o tônus vagal e, desta forma, levando a uma redução na atividade muscular do aparato ventilatório. Tais efeitos incluíram redução marcante na frequência respiratória ( $f_R$ ) em todas as tensões de  $O_2$  experimentais, redução na ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) em hipóxia moderada a severa e aumento do volume ventilatório ( $V_T$ ) em normóxia e hipóxia moderada;
- c) Apesar dos efeitos sobre os nervos respiratórios, o TRC não alterou a necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ) e a extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ), mostrando que a estrutura branquial foi preservada;
- d) A exposição ao TRC reduziu a frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$ ) em todas as tensões de  $O_2$  experimentais, efeito possivelmente resultante de sua ação anticolinesterásica, aumentando o tônus vagal e, desta forma, levando a uma redução na atividade cardíaca;
- e) Os valores de intervalo R-R dos peixes expostos ao TRC sofreram aumentos entre as tensões de 140 e 40 mmHg, resultando em intervalos mais longos entre os batimentos, comprovando a predominância do tônus parassimpático (provavelmente devido à ação inibitória deste OP sobre AChE) nestas tensões de  $O_2$  experimentais;

- 
- f) O índice de massa ventricular relativa (MVR) apresentou um aumento nos seus valores frente à exposição ao TRC, o que poderia estar relacionado a uma hipertensão arterial sistêmica e/ou ao desenvolvimento do estresse oxidativo no tecido cardíaco, induzido pela exposição ao TRC;
- g) O protocolo do efeito do tempo experimental no desenvolvimento de força de contração ( $F_c$ ) mostrou que não houve deterioração da  $F_c$  das tiras ventriculares em ambos os grupos experimentais, ao longo do experimento, não tendo sido registrado qualquer efeito inotrópico negativo;
- h) A  $F_c$  das tiras ventriculares foi significativamente menor no grupo exposto ao TRC em todos os protocolos experimentais. Tal redução de força de contração, assim como reduções na  $f_H$  frente à exposição ao TRC podem estar relacionadas ao aumento da peroxidação lipídica cardíaca e ao desenvolvimento de estresse oxidativo, responsáveis por causar perda de fluidez, redução no potencial de membrana e aumento da permeabilidade ao  $H^+$  e outros íons;
- i) Em todos os protocolos experimentais as relações TPT/ $F_c$  e THR/ $F_c$  apresentaram valores superiores no grupo exposto ao TRC, possivelmente devido a um prejuízo nos mecanismos de transporte de  $Ca^{2+}$  durante o acoplamento E-C;
- j) Os incrementos na concentração de cálcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_e$ ) levaram a um inotropismo positivo nas tiras ventriculares de ambos os grupos experimentais. Porém, no grupo exposto ao TRC, este efeito inotrópico positivo não foi suficiente para restaurar os valores de  $F_c$  desenvolvidos pelo grupo controle, indicando que a disponibilidade de  $Ca^{2+}$  não é um fator predominante para atuar contra o inotropismo negativo causado pelo TRC;
- k) Em ambos os grupos experimentais, a frequência máxima observada *in vitro* excedeu a frequência cardíaca observada *in vivo*, indicando que os miócitos cardíacos não estão trabalhando, *in vivo*, no limite de capacidade de seu acoplamento E-C;
- l) A capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) foi prejudicada pela exposição ao TRC, deslocando a curva de frequência ótima para baixo, devido seu efeito negativo no desenvolvimento de força.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAD, J.M.T. **Controle químico de qualidade**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 204p.
- ADAMS, S.M.; GREELEY, M.S. Ecotoxicological indicators of water quality: using multiresponse indicators to assess the health of aquatic ecosystems. **Water Air Soil Poll.**, v. 123, p. 103-115, 2000.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Índice Monográfico - Triclorfon**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/c10.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2007.
- AGUIAR, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. The effects of temperature on the cardio-respiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 299-308, 2002.
- AGUIAR, L.H. et al. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environ. Res.**, v. 95, p. 224-230, 2004.
- AHO, E.; VORNANEN, M. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 525-532, 1998.
- ALEXANDER, R.B.; SMITH, R.A.; SCHWARZ, G.E. Effect of stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico. **Nature**, v. 403, p. 758-761, 2000.
- ALKAHEM, H.F. et al. Toxicity Bioassay and Changes in Haematological Parameters of *Oreochromis niloticus* Induced by Trichlorfon. **Arab. Gulf. J. Sci. Res.**, v. 16, n. 3, p. 581-593, 1998.
- ALTIMIRAS, J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 124A, p. 447-460, 1999.
- ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L. Is the short-term modulation of heart rate in teleost fish physiologically significant? Assessment by spectral analysis techniques. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 1197-1206, 1995.
- ANTONIJEVIC, B.; STOJILJKOVIC, M.P. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. **Clin. Med. Res.**, v. 5, p. 71-82, 2007.
- ANTUNES-MADEIRA, M.C.; MADEIRA, V.M.C. Interaction of insecticides with lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 550, p. 384-392, 1979.
- ANTUNES-MADEIRA, M.C.; MADEIRA, V.M.C. Membrane partitioning of organophosphorus and organochlorine insecticides and its implications for mechanisms of toxicity. **Pestic. Sci.**, v. 26, p.167-179, 1989.

- BAGCHI, D. et al. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, v. 104, p. 129-140, 1995.
- BASHA, S. M., et al. Respiratory potentials of the fish (*T. mossambica*) under malathion carbaryl and lindane intoxication. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 32, p. 570-574, 1984.
- BERS, D.M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 258p.
- BORCH, K.; JENSEN, F.B.; ANDERSEN, B.B. Cardiac activity, ventilation rate and acid-base regulation in rainbow trout exposed to hypoxia and combined hypoxia and hypercapnia. **Fish Physiol. Biochem.**, n. 12, p. 101-110, 1993.
- BOSCOLO, W.R. et al. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 30, n. 5, p.1391-1396, 2001.
- BRADBURY, S.P. et al. Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in identifying acute toxicity syndromes in fish: part 4. Central Nervous System seizure agents. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 10, n. 1, p. 115-131, 1991.
- CAJARAVILLE, M.P. et al. A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. Total. Environ.**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CALLEWAERT, G. Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. **Cardiovasc. Res.**, v. 26, p. 923-932, 1992.
- CALORE, E.E.; PEREZ, N.M.; HERMAN, M.M. Morphometric studies of cardiac myocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 66, p. 447-450, 2007.
- CAMPBELL, H.A.; HANDY, R.D.; SIMS, D.W. Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to dietary copper. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 59, p. 768-777, 2002.
- CARLSON, K.; JORTNER, B.S.; EHRICH, M. Organophosphorous compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 168, p. 102-113, 2000.
- CARMICHAEL, G.J. Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass. **Prog. Fish. Cult.**, v. 46, p. 11-115, 1984.
- CAVALIERE, M.J. et al. Miotoxicidade por organofosforados. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, p. 267-272, 1996.
- CELICHOWSKI, J., BICHLER, E. The time course of the last contractions during incompletely fused tetani of motor units in rat skeletal muscle. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 62, p. 7-17, 2002.

- CHANDRASEKARA, H.U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquac. Res.**, v. 36, p. 144-140, 2005.
- CHANG, C. et al. Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 20, p. 574-585, 2006.
- CHAPMAN, R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. H535-H552, 1983.
- CHENG, W. W.; FARRELL, A. P. Acute and Sublethal Toxicities of Rotenone in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Swimming Performance and Oxygen Consumption **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 388-396, 2007.
- CLARK, R.J.; RODNICK, K.J. Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1541-1552, 1998.
- COCHRAN, R.E.; BURNETT, L.E. Respiratory responses of the salt marsh animals, *Fundulus heteroclitus*, *Leiostomus xanthurus*, and *Palaemonetes pugio* to environmental hypoxia and hypercapnia and to the organophosphate pesticide, azinphosmethyl. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 195, p. 125-144, 1996.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de março de 2005. Seção I.
- COOPER, C.M. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems - a review. **J. Environ. Qual.**, v. 22, p. 402-408, 1993.
- COPPAGE, D.L.; MATTHEWS, E. Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. **Bull. Environ. Cont. Tox.**, v. 11, p. 483-488, 1974.
- COSTA, M.J. et al. Cardiac tissue function of the telesot fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. **J. Therm. Biol.**, v. 25, p. 373-379, 2000.
- COSTA, M.J. et al. Effect of acute temperature transitions on chronotropic and inotropic responses in the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 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, p. 2295-2332, 1975.
- DE VERA, L.; PRIEDE, I.G. The heart rate variability signal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.**, n. 156, p. 611-617, 1991.

- DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. New York: Elsevier, 265 p., 1981.
- DIERKES-TIZEK, U. et al. Effect of organophosphates on rat heart ATPases. **Arzneim. Forsch.**, v. 34, n. 66, p. 671-678, 1984.
- DORES, E.F.G.C.; De-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, mato grosso - análise preliminar. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p.27-36, 2001.
- DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H.  $Ca^{2+}$  protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. **J. Comp. Physiol.**, v. 156B, p. 135-142, 1985.
- DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. **J. Exp. Biol.**, v. 140, p. 227-241, 1988.
- DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 221-258, 1994.
- DUANGSAWASDI, M., KLAVERKAMP, J.F. Acephate and fenitrothion toxicity in rainbow trout: effects of temperature stress and investigations on the sites of action. In: Marking, L.L.; Kimerle, R.D. **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment**, 667, Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1979. p. 35-51.
- DUNIER, M.; SIWICKI, A.K. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 3, p. 423-438, 1993.
- DUNIER, M.; SIWICKI, A.K.; DEMAEL, A. Effects of organophosphorus insecticides: effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune responses of carp (*Cyprinus carpio*). III. In vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in vivo effects on humoral responses. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 22, p. 79-87, 1991.
- ECOBICHON, D.J.; JOY, R.M. Pesticides and neurological diseases. In: CASARETT, L. J.; DOULL, J. **Toxicology: the basic science of poisons**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 565-622.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **A aquicultura e a atividade pesqueira**. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=aquic:::27>>. Acesso em: 23 jul. 2008.
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY -. **Registration Eligibility Decision (RED) Trichlorfon**. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508W), 1997, 190p.
- EXTOXNET - Extension Toxicology Network. **Pesticide Information Profiles-Trichlorfon** (1996). Disponível em < <http://extoxnet.orst.edu/pips/trichlor.htm>>. Acesso em 20 mai. 2007.

- FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **Am. J. Physiol.**, v. 245, n. 14, p. C1-C14, 1983.
- FARRELL, A.P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 523-536, 1984.
- FARRELL, A.P.; JONES, D.R. The heart. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARRELL, A.P. **Fish Physiology**, v. XII, pt A: **The Cardiovascular System**, 1992. p. 1-88.
- 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, p. 123-133, 1995.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish. Biol.**, v. 35, p. 509-519, 1989.
- FINLAYSON, B.J.; RUDNICKI, R.A. Storage and handling as sources of error in measuring fish acetylcholinesterase activity. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 35, p. 790-795, 1985.
- FUKUTO, T.R. Mechanism of Action of Organophosphorus and carbamate insecticides. **Environ. Health Perspect.**, v. 87, p. 245-254, 1990.
- 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, p. 767-774, 1988.
- GLASS, M.L. et al. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp (*Cyprinus carpio* L.). **J. Fish Biol.**, v. 39, p. 143-149, 1991.
- GOLTERMAN, H.L.; CLIMO, R.S. **Methods for chemical analysis of freshwater**. IBP Handbook 8. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1969, 171p.
- GOVEN, B.A.; GILBERT, J.P.; GRATZEK, J.B.; Apparent drug resistance to the organophosphate dimethyl (2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl) phosphonate by monogenetic trematodes. **J. Wild. Disease.**, v. 16, p. 343-346, 1980.
- GREENBERG, A.E.; TARAS, M.J.; RAND, M.C. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 14 ed. Illinois: Springfield Bru-El Graphic, 1976. 310p.
- GUIMARÃES, A.T.B., SILVA DE ASSIS, H.C., BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 68, p. 57-62, 2007.
- GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v. 41, p. 1819-1828, 1995.
- HAMILTON, R.M.; MCKECHNIE, P.S.; MACFARLANE, P.W. Can cardiac vagal tone be estimated from the 10-second ECG? **Inter. J. Cardiol.**, n. 95, p. 109-115, 2004.

- HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2. ed. Lewis Publishers: CRC Press, 1995. 359 p.
- HERBERT, N.A.; STEFFENSEN, J.F. The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. **Mar. Biol.**, n. 147, p.1403-1412, 2005.
- HOVE-MADSEN, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and force-frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 47-60, 1992.
- HOVE-MADSEN, L., LLACH, A., TORT, L. Quantification of Ca<sup>2+</sup> uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 44, p. R2070-R2080, 1998.
- HOVE-MADSEN, L.; LLACH, A.; TORT, L. The function of the sarcoplasmic reticulum is not inhibited by low temperatures in trout atrial myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 281, p. R1902-R1906, 2001.
- HOWARD, M.D. et al. Comparative effects of oral chlorpyrifos exposure on cholinesterase activity and muscarinic receptor binding in neonatal and adult rat heart. **Toxicol.** v. 238, p. 157-165, 2007.
- HUGHES, G. M. et al. Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20 °C and the effects of hypoxia. **J. Fish Biol.**, v. 22, p. 613-628, 1983.
- HUGHES, G.M., SAUNDERS, R.L. Responses of respiratory pumps to hypoxia in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J. Exp. Biol.**, v. 53, 529-545, 1970.
- INESTROSA, N.C.; PERELMAN, A. Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.10, p. 325-329, 1989.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Estatística da pesca-2005**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 2007. 147 p.
- ISHIBASHI, Y. et al. Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. **Fish. Sci.**, v. 68, p. 1374-1383, 2002.
- JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; GRIGG, G. C. Respiratory control in lungfish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 20A, p. 835-854, 1967.
- JOHNSON, M.K. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. **Rev. Biochem. Toxicol.**, v. 4, p. 141-212, 1982.
- JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicol.**, v. 166, p. 139-160, 2001.

KALININ, A. L.; RANTIN, F.T.; GLASS, M L. Dependence on body size of respiratory function in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during hypoxia. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 12, p. 47-51, 1993.

KALININ, A.L. et al. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus* during normoxia and exposed to graded hypoxia. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 60, n. 2, p. 249-254, 2000.

KALININ, A.L. **Função respiratória de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de O<sub>2</sub> ambiental: tomada de O<sub>2</sub> 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.; GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. A comparison of directly measured and estimated gill ventilation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 122A, p. 207-211, 1999.

KERSTENS, A.; LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. The ventilation, extraction, and uptake of oxygen in undisturbed flounders, *Platichthys flesus*: responses to hypoxia acclimation. **J. Exp. Biol.**, v. 83, p. 169-179, 1979.

KLEIN, S. et al. Utilização de produtos químicos no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) em alevinos de surubim do Iguapé *Steindachneridion sp.*, Garavello (1991). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 1, p. 51-58, 2004

KUBOTA, A.H. Metodologia de indicadores de dose interna para avaliação em trabalhadores expostos a pesticidas organofosforados. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, p. 879-881, 2000.

LAHAV, E., RA'NAN, Z. Salinity tolerance of genetically produced tilapia (*Oreochromis*) hybrids. **Isr. J. Aquac.**, v. 49, n. 3, p. 160-165, 1997.

LANG, O. et al. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterase by metidathion and paraquat in alimentary canal of common carp, **Gen. Pharmacol.**, v. 29, p. 55-59, 1997.

LAURENT, P.; HOLMGREN, S.; NILSSON, S. Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 76A, n. 3, p. 525-542, 1983.

LEWATOWSKI, B.; PYTKOWSKI, B. Cellular mechanisms of the relationship between myocardial force and frequency of contractions. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 50, p. 97-120, 1987.

LINNAEUS, C. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. **Holmiae Systema Nature.**, 1758, 824p.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, p. 656-666, 2001.

- LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 43-49, 1998.
- LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38-49, 1979.
- LOPES, R.B. et al. Bioconcentration of trichlorfon insecticides in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**, v. 64, p.56-62, 2006.
- LUO, J. et al. Prolonged oxidative stress inverts the cardiac force–frequency relation: role of altered calcium handling and myofilament calcium responsiveness. **J. Mol. Cel. Cardiol.**, v. 40, p. 64-75, 2006.
- MACKINNON, D.L; FARRELL, A.P. The effect of 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole on juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Sublethal toxicity testing. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 11, p. 1541–1548, 1992.
- MARQUES, P.R.B.O. et al. Análise de pesticidas em amostras ambientais oriundas da barragem de Boa Esperança (PI/MA Brasil): avaliação preliminar. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Amb.**, v. 12, p. 13-30, 2002.
- MARRS, T.C. Organophosphate anticholinesterase poisoning. **Toxic Subst. Mech.**, v.15, p. 357-388, 1996.
- MARTINS, N.D. **Efeitos do inseticida organofosforado triclorfon (Neguvon®) sobre biomarcadores do estresse oxidativo em tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**. Monografia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- MARVIN, D.E.; HEATH, A.G. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 27A, p. 349-355, 1968.
- MASSARI, M.M. **Avaliação das respostas cardio-respiratórias de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Schwartz, 1983), às variações da temperatura ambiental e recuperação subsequente**. 1993. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1993.
- MASSARI, M.M. et al. The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ECG waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J. Therm. Biol.**, v. 23, p. 283-290, 1998.
- MATIKAINEN, N.; VORNANEN, M. Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. **J. Exp. Biol.**, n. 167, p. 203-220, 1992.
- MATTIAS, A.T.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 311-315, 1998.

- MAXIMIANO, A.A. et al. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 2, p. 483-491, 2005.
- McKIM, J.M., BRADBURY, S.P., NIEMIT, G.J. Fish Acute Toxicity Syndromes and Their Use in the QSAR Approach to Hazard Assessment. **Environ. Health Perspect.**, v. 71, p. 171-186, 1987.
- MEHRLE, P. M.; MAYER, F.L. Biochemistry/physiology. In: RAND, G. M; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application**. New York: Hemisphere, 1984. p 264-274.
- MEURER, F.; Hayashi, C.; Boscolo, W. R. Influence of diet processing form on performance and survival of Nile tilapia during sex revert phase. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 32, n. 2, p. 1516-3598, 2003.
- MUNDAY, B. et al. **The interactions of aquaculture and the environment**. A bibliographical review. The Commission of European Communities Directory General for Fisheries. Greece. 183 p. 1992.
- MUUSZE, B. et al. Hypoxia tolerance of Amazon fish respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 120A, 151-156, 1998.
- NARAHASHI, T. Nerve membrane ion channels as the target site of environmental toxicants. **Environ. Health Perspect.**, v. 71, p. 25-29, 1987.
- NETO, A.J.S.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.
- NOGA, E.J. **Fish Disease: Diagnosis and Treatment**. St. Louis, Missouri: Blackwell Publishing, 1996. 367 p.
- OHWEILER, O. A. **Teoria e prática a análise quantitativa inorgânica**. Brasília:Universidade de Brasília, 1968, v,2, 536p
- OLLE, C.D. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR®) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus***. 2007. 130 p. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007
- PAVANELLI, G.C., EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 2002. 305 p.
- PERRY, S.F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. **Fish Ecophysiology**. London: Chapman & Hall. 1993. p. 231-264.

- PINHEIRO, L.M.S.; PINHEIRO, L.E.L.; MARTINS, R.T. Aspectos técnicos da tilapicultura. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 50, p. 75-80, 2006.
- POPMA, T.; MASSER, M. **Tilapia: life history and biology**. Local: SRAC - Southern Regional Aquaculture Center, 1999. (Publication n. 283).
- PRIEDE, I.G. The effects of swimming activity and section of the vagus nerves on heart rate in rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, n. 60, p. 305-319, 1974.
- RAHEJA, G., GILL, K.D. Calcium homeostasis and dichlorvos induced neurotoxicity in rat brain. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 232, p. 13-18, 2002.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, S.M. **Fundamentals of aquatic toxicology methods and applications**. Australia: McGraw-Hill International Book Company, 1984. 666p.
- RANDALL, D.J.; CAMERON, J.N. Respiratory control of arterial pH as temperature changes in rainbow trout *Salmo gairdneri*. **Am. J. Physiol.**, v. 225, p.997-1002, 1973.
- RANTIN, F.T. et al. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environ. Biol. Fish.**, v. 36, p. 93-97, 1993.
- RANTIN, F.T. et al. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life in two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish. Biol.**, v. 41, p. 805-812, 1992.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Alterações Hematológicas em Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). **B. Inst. Pesca**, v. 24, p.187-196, 1997.
- RAO, K.S.P.; SALIB, I.K.A., RAO, K.V.R. Methyl parathion (0-0-dimethyl0-4-nitrophenyl thiophosphate) effects on whole-body and tissue respiration in the teleost, *Tilapia mossambica* (Peters). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 9, n. 3, p. 339-345, 1985.
- RATH, S.; MISRA, B.N. Sub-lethal effects of dichlorvos (DDVP) on respiratory metabolism of *Tilapia mossambica*, Peters of 3 age groups. **Exp. Gerontol.**, v. 14, n. 1, p. 37-41, 1979.
- RAYMOND-DELPECH, V. et al. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. **Invertebr. Neurosci.**, v. 5, p. 119-133, 2005.
- RIVAROLI, L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae) and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Erythrinidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 145A, p. 322-327, 2006.
- ROCHA, M. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Importance of the sarcoplasmic reticulum and adrenergic stimulation on the cardiac contractility of the neotropical teleosts *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions. **J. Comp. Physiol.**, v. 177B, p. 713-721, 2007.

- RODRIGUES, E. L. et al. Histopathologic lesions in the livers of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal concentration of the organophosphate insecticide Dipterex 500<sup>®</sup> (Trichlorfon). **Acta Sci.**, v. 23, p. 503-505, 2001.
- ROUSSEAU, E.; SMITH J. S.; MEISSNER G. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca<sup>2+</sup> release channels. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. C364-C368, 1987.
- SAADEH, A. M.; FARSAKH, N. A.; AL-ALI, M. K.: Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. **Heart**, v. 77, p. 461-464, 1997.
- SANCHO, E. et al. Pesticide Toxicokinetics in Fish: Accumulation and Elimination. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 41, p. 245-250, 1998.
- 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.
- SCHALCH, S.H.C. et al. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em jovens pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Sci. Anim. Sci.** v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.
- SCHLENK, D. et al. Biomarkers. In: Di GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The Toxicology of Fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p. 683-731.
- SHIELS, H. A., VORNANEN, M., FARRELL, A. P. The force-frequency relationship in fish hearts – a review. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132A, p. 811-826, 2002.
- SHIELS, H.A.; FARRELL, A.P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing Ca<sup>2+</sup> to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 1607-1621, 1997.
- SHIMURA, S., Seasonal occurrence, sex ratio and site preference of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea: Branchiura) parasitic on cultured freshwater salmonids in Japan. **Parasitology.**, v. 86, p. 537-552, 1983.
- SMITH, F.M.; JONES, D.R. The effects of changes in blood oxygen carrying capacity on ventilation volume in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Exp. Biol.**, v. 97, p. 325-335, 1982.
- STEFFENSEN, J.F. Oxygen consumption of fish exposed to hypoxia: Are they all oxyregulators or are any oxyconformers? **Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality**. U.S. Environmental Protection Agency. Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, p. 239-250, 2006.
- SUN, X. et al. Effects of low concentrations of paraoxon on Ca<sup>2+</sup> mobilization in a human parotid salivary cell-line HSY. **Arch. Oral Biol.**, v. 45, p. 621-638, 2000.
- TAUIL, P.L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 3, p. 275-277, 2006.

- TEUSCHLER, L.K. et al. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 58, p. 1283-1291, 2005.
- THOMAS, M.J.; HAMMAN, B.N.; TIBBITS, G.F. Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, trout, dogfish. **J. exp. Biol.**, v. 199, p. 1999-2009, 1996.
- TIBBITS, G.F.; HOVE-MADSEN, L.; BERS, D.M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. **Can. J. Zool.**, v. 69, p. 2014-2019, 1991.
- TIBBITS, G.F.; MOYES, C.D.; HOVE-MADSEN, L. Excitation-contraction coupling in the teleost heart. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARRELL, A.P. **Fish Physiology**, v. **XII**, pt A: **The Cardiovascular System**, 1992. p. 267-303.
- TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, p. 135-142, 2002.
- TONKOPII, V. Oxidative stress in the mechanism of organophosphates neurotoxicity, **Toxicol. Lett.**, v. 144, p. s132, 2003.
- TREWAVAS, E. Tilapias: taxonomy and speciation. In: The biology and culture of tilapias. Philippines, ICLARM. P. 3-13 (Conference Proceedings, 7), 1982.
- VARÓ, I. et al. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Pestic. Biochem. Phys.**, v. 75, p. 61-72, 2003.
- VEIGA, M.L.; RODRIGUES, E.L.; PACHECO, F.J. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 45, n. 2, p. 171-175, 2002.
- VIDEIRA, R. A.; ANTUNES-MADEIRA, M. C.; MADEIRA, V. M. C. Biophysical perturbations induced by ethylaziphos in lipid membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 97, p. 139-153, 1999.
- VIDEIRA, R. A.; ANTUNES-MADEIRA, M. C.; MADEIRA, V. M. C. Interaction of ethylaziphos with the physical organization of model and native membranes. **Bioch. Bioph. Acta.**, v. 1281, p. 65-72, 1996.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.
- VITTOZZI, L.; DE ANGELIS, G. A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. **Aquatic Toxicol.**, v.19, p. 167-204, 1991.
- VORNANEN, M. L-type  $Ca^{2+}$  current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 533-547, 1998.

- VORNANEN, M. Sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 41, p. R1432-R1440, 1997.
- WARD, T.R. et al. Correlation of the anticholinesterase activity of a series of organophosphates with their ability to compete with agonist binding to muscarinic receptors. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 122, p. 300-307, 1993.
- WETZEL, R.G. Oxygen. In: **Limnology**. Philadelphia: Saunders Company. 1975. p. 123-141.
- WIER, W.G. Cytoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 52, p. 467-485, 1990.
- WU, R. S.S. et al. Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. **Environ. Sci. Technol.**, n. 37, p. 1137-1141, 2003.
- YAN, X. J. et al. Quantitative structure-toxicity relationships of organophosphorous pesticides to fish (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, v. 63, n. 5, p. 744-750, 2006.
- YANG, R. et al. Relationship between toxicant transfer kinetic processes and fish oxygen consumption. **Aquat. Toxicol.**, v. 48, p. 95-108, 2000a.
- YANG, R. et al. A physiological model to predict xenobiotic concentration in fish. **Aquat. Toxicol.**, v. 48, p. 109-117, 2000b.
- ZANIBONI FILHO, E. O desenvolvimento da piscicultura brasileira sem a deterioração da qualidade da água. **Rev. Bras. Biol.**, v. 57, n. 1, p. 2-9, 1997.
- ZILBERMAN, I. Introdução à engenharia ambiental. Canoas: ULBRA, 1997. 103 p.