

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

**Comparação entre os efeitos da exposição em nível subletal de Glifosato e
dos herbicidas a base de glifosato Roundup Original[®] e Roundup
Transorb R[®] sobre girinos de rã-touro.**

Rafael Zanelli Rissoli

**São Carlos
2012**

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

Comparação entre os efeitos da exposição em nível subletal de Glifosato e dos herbicidas a base de glifosato Roundup Original[®] e Roundup Transorb R[®] sobre girinos de rã-touro.

Rafael Zanelli Rissoli

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

Co-orientadora: Profa. Dra. Monica Jones Costa

**São Carlos
2012**

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

R596ce

Rissoli, Rafael Zanelli.

Comparação entre os efeitos da exposição em nível subletal de glifosato e dos herbicidas a base de glifosato Roundup Original® e Roundup Transorb R® sobre girinos de rã-touro / Rafael Zanelli Rissoli. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

123 f.

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

1. Fisiologia. 2. Fisiologia comparada. 3. Função cardiorrespiratória. 4. Histologia animal. 5. Ecotoxicologia. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

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

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Rafael Zanelli Rissoli

Dia 05/10/2012

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Kalinin.....

Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho.....

Prof^a. Dr^a. Odete Rocha.....

À minha família e amigos que me apoiaram
e incentivaram durante o mestrado e em
tantas outras fases da minha vida.

Dedico

À minha mãe, que perdoou minha ausência
nos momentos em que mais precisou.

Cada dia de trabalho, noite de
estudo e palavra que compõem
este trabalho tiveram como
inspiração em sua força e
entusiasmo.

Ofereço

Agradecimentos

Às orientadoras e grandes amigas Dra. Ana Lúcia Kalinin e Dra. Monica Jones Costa por me concederem a oportunidade de realizar o mestrado e pela atenção, zelo e paciência com que me acompanharam. A conduta ética e responsável com que me conduziram é e sempre será uma referência para o desenvolvimento minha vida profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pelo desenvolvimento de parte dos equipamentos utilizados e pela ajuda no decorrer dos experimentos de respirometria.

Aos docentes do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar *campus* São Carlos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários do DCF, em especial aos técnicos Sr. Ângelo Carnelosi e José Sanches pelo auxílio prestado, bem como às gerentes da copinha Sras. Nadir, Cláudia e Graça pelo bom humor e por terem feito o café maravilhoso que animou a maioria dos dias de trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) e do DCF, André Guelli, Daniele Sunti, Diana Monteiro, Eliane Marques, Eliton Vasconcelos, Gabrielle de Paula, Juliana Thomaz, Jakeline Ferreira, Karla Malaquias, Larissa Parreira, Lucas Ferro, Lucas Zena, Marcelo Paulino, Natalia Shiogiri, Nathan D. Martins, Rafael Cipriano, Samuel S. Beserra, Talita Laurie, Thiago C. Belão e Vivian M. Zeraik, pela inestimável ajuda durante a rotina de trabalho, pelo apoio e pelos agradáveis momentos de descontração aos quais compartilhamos.

Igualmente á equipe do Laboratório de Fisiologia da Conservação (LAFISC) da UFSCar- *campus* Sorocaba, Fernando U. Gamero, Larissa R. Ribeiro, Mariana Arena, Raquel F. Salla e Samuel E. Dal Médico, a qual me auxiliou imensamente na execução de grande parte dos experimentos e me incentivou desde a graduação até o final do mestrado. A amizade e companheirismo que demonstraram por mim me fazem sentir muito honrado em também fazer parte da equipe.

Aos membros do Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) da UFSCar-*campus* Sorocaba, Dr. Fábio Camargo Abdalla e Dra. Elaine C. M. da Silva Zacarin, Matheus Marcondes, Gisele Rizzi, Daiane Almeida, Guilherme Sampaio,

Felipe Melo, não apenas pela essencial ajuda durante a aplicação das técnicas de histologia, mas também pela paciência e simpatia com que me receberam em seu laboratório.

Aos grandes amigos e companheiros de república Paulo André Tavares e Pedro Victor Buck por me fornecerem estadia durante o período em que estive em Sorocaba e pelos inúmeros momentos engraçados que compartilhamos.

Aos amigos Danilo T. Amaral, Isabel Bonatelli, Manolo F. Perez e Ana C. Fegies por me auxiliarem na rotina de laboratório tanto em questões corriqueiras quanto complexas e por representarem uma companhia agradável em Sorocaba.

À minha namorada Mayris de Paula Silva que com carinho e atenção me ajudou imensamente nos momentos finais do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro, essencial para o desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

Os herbicidas a base de glifosato são extensivamente utilizados na agricultura e piscicultura para o controle de plantas daninhas, sendo comumente encontrado em corpos d'água. O herbicida Roundup Original[®] é um dos herbicidas a base de glifosato mais utilizados no Brasil, possuindo em sua composição básica um concentrado de isopropilamina de glifosato e um surfactante. Tem sido sugerido que o ingrediente letal do Roundup[®] não é o glifosato em si, mas sim o surfactante, que permite ao herbicida penetrar na cutícula da planta. Entre as formulações à base de glifosato que levam o nome Roundup, uma das mais recentes é o Roundup Transorb R[®]. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da exposição por 96 horas a concentrações subletais de glifosato (1 ppm), Roundup Original[®] (1 ppm de equivalente ácido de glifosato) e do Roundup Transorb R[®] (1 ppm de equivalente ácido de glifosato) sobre o nível de atividade, marcadores cardiorrespiratórios e histológicos de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*. O nível de atividade dos girinos foi significativamente elevado apenas pela exposição ao glifosato, sugerindo uma resposta de fuga ao estímulo estressor que poderia desviar energia dos processos morfogenéticos. Todos os herbicidas testados causaram alterações morfológicas no tecido cutâneo, incluindo inchaço celular e consequente espessamento da parede epitelial, ruptura de cromátides, entre outras. A VO_2 dos girinos, em condições controle, manteve-se constante até a tensão de O_2 de 40 mmHg, sugerindo que a tensão crítica de O_2 desta espécie deve estar entre 40 e 20 mmHg. A exposição ao glifosato causou redução da VO_2 em relação aos valores controle, efeito este possivelmente relacionado às alterações causadas por este composto na pele destes animais, aumentando as distâncias difusionais e, conseqüentemente, reduzindo a tomada de O_2 . O Roundup Transorb R[®] elevou os valores de VO_2 em relação ao controle, sugerindo um efeito do surfactante e/ou dos componentes inertes presentes nesta formulação sobre este parâmetro. A falta de diferença entre os valores de VO_2 controle e os obtidos após exposição ao Roundup Original[®] pode sugerir que o aumento da taxa metabólica induzido pelo estresse causado pela exposição tenha sido mascarado pelo espessamento da camada epidérmica, que possivelmente dificultou a tomada de O_2 . A frequência cardíaca *in loco* de girinos não foi alterada pela exposição ao glifosato e ao Roundup Original[®]. A exposição ao glifosato causou diminuição significativa da massa ventricular. A exposição aos diferentes xenobióticos não promoveu efeitos adversos sobre o desempenho das tiras ventriculares sob a frequência de estimulação subfisiológica de 0,2 Hz, uma vez que nenhum dos parâmetros analisados (Fc, TPT e THR) foi significativamente alterado. A exposição ao Roundup Original[®] foi a única que acarretou em alterações frente ao aumento de frequência de estimulação, provocando aumentos na força de contração e diminuições no tempo de relaxamento. Sugere-se que uma possível indução, desencadeada pelo surfactante presente no herbicida, da produção de NO no endotélio cardíaco possa desencadear tal efeito. A associação entre a adrenalina e a exposição ao Roundup Original[®] anulou completamente os incrementos de força e a aceleração do relaxamento, sugerindo a existência de uma interação antagônica entre o Roundup Original[®] e a adrenalina.

ABSTRACT

Glyphosate based herbicides are widely used in agriculture and fishery to control of weeds, being found commonly in water bodies. The Roundup Original[®] is one of the most used glyphosate-based herbicides that presents in its basic composition isopropylamin glyphosate salt and a surfactant. Many studies suggest that the surfactant is the most lethal compound of Roundup's formulation. Among the Roundup[®] formulations, Roundup Transorb R[®] is the most recent. The main goal of this study was to evaluate the possible impacts of exposition to glyphosate (1 ppm), Roundup Original[®] (1ppm glyphosate acid equivalent e/a.) and Roundup Transorb R[®] (1ppm e/a) sublethal concentrations on bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) activity level, cardiorespiratory and histological endpoints. The tadpole's activity level was significantly augmented only by the glyphosate exposition, suggesting that a stressful condition would divert energy from morphogenetic processes. All tested herbicides caused skin morphological alterations like cellular hypertrophy, hypertrophy of epithelium wall and chromatid rupture. The VO_2 values in Control group were constant until the O_2 tension of 40 mmHg suggesting that the critical O_2 tension for this species is between 40 and 20mmHg. The exposure to glyphosate caused a significant VO_2 reduction, possibly due to the observed epidermis hypertrophy, which reduces the O_2 uptake. Roundup Transorb R[®] increased VO_2 values, suggesting that the composition of inert compounds and surfactants in this formulation influences this parameter. There was no difference between the VO_2 presented by the Roundup Original[®] and Control group, which suggests that the possible increase on O_2 consumption caused by Roundup exposure was masque by the epidermis hypertrophy. The registered *in loco* cardiac frequency wasn't altered by the glyphosate and Roundup Original. Glyphosate caused a significant ventricular mass decrease. No difference was observed on Fc, TPT and THR of ventricular strips at sub-physiological stimulation frequencies (0,2 Hz). The Roundup Original[®] group was the only that presented changes induced by increases in the stimulation frequency, showing Fc increases and THR decreases. It is suggested that this formulation induces the NO production, which promotes cardiac relaxation. However, these increases in Fc and THR acceleration were completely abolished by the addition of adrenaline, suggesting the existence of an antagonistic interaction between the Roundup Original[®] and adrenaline.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Morfologia externa de um exemplar de girino de rã-touro no estágio 25 de Gosner. 9
- Figura 2- Morfologia externa de um indivíduo juvenil de rã-touro..... 9
- Figura 3- Fotomicrografia eletrônica de um miócito isolado de: A: *Rana esculenta* (COLOMO *et al.*, 1997); e, B: *Rana pipiens* (BARR *et al.*, 1965) (aumento de 12.000 vezes). Notar o pequeno diâmetro dos miócitos ($5,78 \pm 0,11 \mu\text{m}$). ... 11
- Figura 4.- Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco, comparando o modelo existente em mamíferos. (A) com o proposto para vertebrados basais (B). A figura também ilustra algumas diferenças entre a estrutura dos miócitos de vertebrados basais e mamíferos, como variações no diâmetro das células, distribuição e abundância do RS e existência de túbulos-T. As linhas pontilhadas sugerem um possível papel das fontes de Ca^{2+} . DHPR: canal de dihidropiridina (ou canal L); SL: sarcolema; RS: retículo sarco(endo)plasmático (modificado de TIBBITS *et al.*, 1992). 12
- Figura 5 - Registros representativos dos potenciais de ação do miocárdio ventricular de diferentes espécies (A: MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; B-C: MITRA & MORAD, 1985; D-F: VARRÓ *et al.*, 1993). 17
- Figura 6 - Representação gráfica de diferentes estágios larvais de *Rana dalmatina*. A- Destaque das brânquias transientes, externas, de um exemplar em estágio 22 de Gosner. B- Destaque das brânquias persistentes, já internalizadas, de um exemplar em estágio 30 de Gosner. As barras horizontais representam a escala. Adaptado de BRUNELLI *et al.* (2004). 19
- Figura 7 - Secção longitudinal de um girino demonstrando a posição dos tufo branquiais e das placas filtradoras. Adaptado de VIERTAL & RICHTER, 1999..... 22
- Figura 8 - Micrografia eletrônica das estruturas branquiais de girinos de *Rana dalmatina* (estágio 28 de CAMBAR & MARROT). A- filtro branquial. B- Tufo branquial. Adaptado de BRUNELLI *et al.*,(2004). 22
- Figura 9 - Esquema demonstrando a percentagem de trocas gasosas através da pele em indivíduos em estágio larval e adulto de *L.catesbeianus*. As barras brancas representam a quantidade de O_2 captado e as negras a de CO_2 excretado através da pele (Adaptado de KARDONG, 2008). 24

- Figura 10 - Esquema demonstrando os efeitos teóricos da mudança na taxa metabólica basal ($\dot{V}O_2$ expressa como consumo de O_2) e da condutância total de O_2 do corpo sobre a tensão crítica de O_2 (P_c) em um organismo oxirregulador. Uma dada P_c pode ser afetada por mudanças na taxa metabólica basal e no CO_2 . Por exemplo, P_c em 100 mmHg (A)- pode ser reduzida para 50 mmHg tanto pela (D)- divisão da VO_2 pela metade quanto pela (B)- multiplicação da CO_2 por 2; uma diminuição ainda maior pode ser observada com a (C)- atuação dos dois efeitos simultaneamente. Adaptado de MCDIRMIT & RONALD (1999). 29
- Figura 11 - Esquema do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos *in loco*. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro.. 37
- Figura 12 - Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos *in loco*. 39
- Figura 13 - Esquema representando o equipamento de geração e registro de contrações isométricas. a.) transdutor de força (b.) acoplado a uma das extremidades da preparação. (c.) Outra extremidade da preparação presa ao gancho imerso em (d.) solução fisiológica. (e.) O eletrodo de platina responsável pela transmissão dos impulsos elétricos para a solução presente no interior da (f.) cubeta. 41
- Figura 14 - Método de encaixe das tiras ventriculares entre o transdutor de força e o eletrodo de platina. Notar: 1- Transdutor de força; 2- Cubeta de 20 mL; 3- Amplificador. 42
- Figura 15 - Efeito do tempo de experimentação (40 min) sobre a força de contração (F_c – mN . mm⁻²), tempo para o pico de força (TPT – ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e Glifosato na temperatura de 25 °C. As barras verticais representam os valores médios + 1 E.P.M. 47
- Figura 16 - Valores da força de contração (F_c – mN/mm²) desenvolvidas pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e grupo exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver tabela 3. 50

Figura 17 - Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. 51

Figura 18 - Valores dos tempos para o pico de tensão (TPT - ms), das tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. 53

Figura 19 - Valores dos tempos para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares, $n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. 54

Figura 20 - Valores dos tempos para tensão de repouso (RT - % da F_c desenvolvida a 0,2 Hz) das tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. 55

Figura 21 - Efeito do tempo de experimentação (40 min) sobre a força de contração (F_c - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$), sobre o tempo para o pico de força (TPT - ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e Roundup Original na temperatura de 25°C . As barras verticais representam os valores médios ± 1 E.P.M. 58

Figura 22 - Valores da força de contração (F_c – mN/mm²) desenvolvidas pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e Roundup Original por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RO} e RO. Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatística entre os grupos CT_{RO} e RO ($P < 0,05$). Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver Tabela 7. 61

Figura 23 - Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mN . mm-2 . min-1) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Original® por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RO} e RO. Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatística entre os grupos CT_{RO} e RO ($P < 0,05$). Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver Tabela 7. 62

Figura 24 - Valores dos tempos para o pico de tensão (TPT – ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Original® por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RO}) e Roundup Original (RO). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. 64

Figura 25 - Valores dos tempos, para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Original® por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RO}) e Roundup Original (RO). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatística entre os grupos CT_{RO} e RO ($P < 0,05$). Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver Tabela 8. 65

Figura 26 - Valores da tensão de repouso (RT - % da Fc desenvolvida a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Original[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (↕) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RO}) e Roundup Original (RO). Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M. 66

Figura 27 - Efeito do tempo de experimentação (40 min) sobre a força de contração (Fc - mN . mm-2), sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e Roundup Transorb R na temperatura de 25 °C. As barras verticais representam os valores médios + 1 E.P.M. 69

Figura 28- Valores da força de contração (Fc - mN/mm2) desenvolvidas pelas tiras ventriculares (n = 16) dos do grupos Controle e exposto ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (↕) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RTR} e RTR. Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M. 72

Figura 29 - Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mN . mm-2 . min-1) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e exposto ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (↕) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RTR} e RTR. Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M. 73

Figura 30 - Valores dos tempos para o pico de tensão (TPT - ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (↕) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RTR}) e Roundup Transorb R (RTR). Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M. 75

Figura 31 - Valores dos tempos para meio relaxamento (THR - ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (↕) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RTR}) e Roundup Transorb R (RTR). Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M. 76

Figura 32 - Valores da tensão de repouso (RT - % da Fc desenvolvida a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (↕) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RTR}) e Roundup Transorb R (RTR). Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M. 77

Figura 33 - Comparação entre o efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (Pin O₂-mmHg) sobre a tomada de O₂ ($\dot{V}O_2$ mlO₂.Kg⁻¹.h⁻¹) dos grupos Controle e Glifosato. As linhas azuis representam o grupo Controle (Ctrl, n=17) e as linhas vermelhas o grupo exposto ao Glifosato (Gli, n=10). * indica diferença estatística entre o grupo Gli e o grupo Ctrl em uma mesma tensão (p < 0,05). I- representa diferença estatística entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental (P < 0,05). 80

Figura 34 - Comparação entre o efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (Pin O₂-mmHg) sobre a tomada de O₂ ($\dot{V}O_2$ - mlO₂.Kg⁻¹.h⁻¹) nos grupos Controle e Roundup Original. As linhas azuis representam o grupo Controle (Ctrl,n=17) e as linhas verdes o grupo exposto ao Roundup Original[®] (RO, n=10). I- representa diferença estatística entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental (P < 0,05). 80

Figura 35 - Comparação entre o efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (Pin O₂-mmHg) sobre a tomada de O₂ ($\dot{V}O_2$ - mlO₂.Kg⁻¹.h⁻¹) dos grupos Controle e Roundup Transorb R. As linhas azuis representam o grupo Controle (Ctrl,n=17) e as linhas roxas o grupo exposto ao Roundup Transorb R[®] (RTR, n=7). * indica diferença estatística entre o grupo RTR e o grupo Ctrl em uma mesma tensão (P < 0,05). I- representa diferença estatística entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental (P < 0,05). 81

Figura 36 - Comparação do efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (Pin O₂-mmHg) sobre a tomada de O₂ ($\dot{V}O_2$ - mlO₂.Kg⁻¹.h⁻¹) dos grupos CT, GLI, RO e RTR. CT (linhas azuis; n = 17), GLI (linhas vermelhas; n = 10), RO (linhas verdes; n = 10) e RTR (linhas roxas; n = 7). A avaliação estatística entre os grupos consta na Tabela 13. .. 81

Figura 37 - Cortes longitudinais da pele dorsal de *L. catesbeianus* dos grupos Controle, Glifosato, R. Original e R. Transorb R em coloração H.E. Os painéis A e B são referentes ao tecido pertencente ao grupo Controle; C e D ao grupo exposto ao Glifosato; E e F ao grupo exposto ao Roundup Original[®] e G e H ao grupo exposto ao Roundup Transorb R[®]. A. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Núcleo de fibroblásto (n), Terminação nervosa (tn), Lâmina basal (lb). B. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Glândula granular (glg), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb). C. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), Terminação nervosa (tn), (↓) Célula inchada e com um formato esférico. D. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Terminação nervosa (tn), Papila dérmica (pd), (↙) Cromatinas fragmentadas. E. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), (↓) Célula inchada e com um formato esférico. F. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), Núcleo de fibroblásto (n), (↙) Cromatinas fragmentadas. G. Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), (↙) Cromatinas fragmentadas, (↓) Célula inchada e com um formato esférico, (★) Epitélio não alterado. H. Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Núcleo do fibroblasto (n), Glândula mista (glm), (↙) Cromatinas fragmentadas, (★) Epitélio não alterado. 83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Valores de nível de atividade (NA, n=30), massa ventricular relativa (MVR, n=6) e frequência cardíaca (f_H , n=30) do grupo Controle (CT_{GLI}) e do grupo exposto ao Glifosato (GLI) por 96 horas. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os valores em negrito denotam diferença estatística entre o mesmo parâmetro dos diferentes grupos experimentais ($P < 0,05$). 45
- Tabela 2 – Valores de força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares (n = 16) de girinos de rã-touro no grupo controle (CT_{GLI}; n = 16) e exposto por 96 horas ao Glifosato (GLI; n = 16) na temperatura de 25 °C durante 40 min de estimulação ininterrupta a 0,2 Hz. Valores médios \pm 1 E.P.M. 46
- Tabela 3 – Valores da força de contração (Fc – mN/mm²) e da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mN . mm⁻² . min⁻¹) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Glifosato) e daqueles expostos ao Glifosato por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina – 10⁻⁶ M). Valores médios \pm 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz). Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Glifosato) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio. 49
- Tabela 4 – Valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Glifosato) e daqueles expostos ao Glifosato por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina – 10⁻⁶ M). Valores médios \pm 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para os parâmetros TPT ou THR. Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Glifosato) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio. 52
- Tabela 5 - Valores de nível de atividade (NA, n=30), massa ventricular relativa (MVR, n=6) e frequência cardíaca (f_H , n=30) do grupo Controle (CT_{RO}) e do grupo exposto ao Roundup Original[®] (RO) por 96 horas. Valores médios \pm 1 E.P.M. 56

- Tabela 6 – Valores de força de contração (F_c), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares ($n = 16$) de girinos de rã-touro no grupo Controle ($n = 16$) e exposto por 96 horas ao Roundup Original ($n = 16$) na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 min de estimulação ininterrupta a 0,2 Hz. Valores médios ± 1 E.P.M. 57
- Tabela 7 – Valores da força de contração ($F_c - \text{mN/mm}^2$) e da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Original[®]) e daqueles expostos ao Roundup Original[®] por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação ($f_{\text{EST}} - \text{Hz}$) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina - 10^{-6} M). Valores médios ± 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para aquele parâmetro (F_c ou CBC). Os números em negrito indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Roundup Original) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio..... 60
- Tabela 8 – Valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Original[®]) e daqueles expostos ao Roundup Original[®] por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação ($f_{\text{EST}} - \text{Hz}$) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina - 10^{-6} M). Valores médios ± 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para os parâmetros TPT ou THR. Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Roundup Original[®]) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio..... 63
- Tabela 9 - Valores de nível de atividade (NA, $n=30$), massa ventricular relativa (MVR, $n=6$) e frequência cardíaca (f_H , $n=30$) do grupo Controle (CT_{RTR}) e do grupo exposto ao Roundup Transorb R[®] (RTR) por 96 horas. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito denotam diferença estatística entre o mesmo parâmetro dos diferentes grupos experimentais ($P < 0,05$). 67
- Tabela 10 – Valores de força de contração (F_c), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares ($n = 16$) de girinos de rã-touro no grupo Controle ($n = 16$) e exposto por 96 horas ao Roundup Transorb R ($n = 16$) na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 min de estimulação ininterrupta a 0,2 Hz. Valores médios ± 1 E.P.M. 68

Tabela 11 – Valores da força de contração (F_c - mN/mm^2) e da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Transorb R[®]) e daqueles expostos ao Roundup Transorb R[®] por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina - 10^{-6} M). Valores médios ± 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para aquele parâmetro (F_c ou CBC). 71

Tabela 12 – Valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Transorb R[®]) e daqueles expostos ao Roundup Transorb R[®] por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina - 10^{-6} M). Valores médios ± 1 E.P.M. I: registro irregular. O número *I* sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para os parâmetros TPT ou THR. Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Roundup Transorb R[®]) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio. 74

Tabela 13- Valores médios de consumo de O_2 (VO_2 - $\text{mLO}_2 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) de girinos de *Lithobates catesbeianus* dos grupos Controle (Ctrl, $n=17$) e expostos à 1ppm do equivalente ácido de glifosato dos compostos Glifosato (Gli, $n=10$), Roundup Original[®] (RO, $n=10$) e Roundup Transorb R[®] (RTR, $n=7$) por 96h. Os valores em negrito indicam diferença estatística significativa entre os grupos expostos e o grupo Controle em uma mesma tensão ($p < 0,05$). *I*-representa diferença estatística significativa entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$). 79

1 .INTRODUÇÃO & JUSTIFICATIVA	1
1.1 BREVES CONSIDERAÇÕES SOBRE O GRUPO DOS ANFÍBIOS	7
1.2 BREVES CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE ESTUDADA	8
1.2.1 <i>Posição Sistemática da Espécie</i>	10
1.3 MORFOLOGIA/FISIOLOGIA CARDÍACA DE ANFÍBIOS.....	10
1.3.1 <i>Miócitos de Anfíbios</i>	10
1.3.2 <i>Manejo de Cálcio no Coração de Anfíbios</i>	16
1.4 PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS EM ANFÍBIOS.....	17
1.4.1 <i>Mecanismos respiratórios de anuros</i>	17
1.4.2 <i>Estruturas respiratórias em girinos de rã-touro</i>	18
1.4.4 <i>Ritmogênese respiratória de girinos</i>	24
1.4.5 <i>Consumo de O₂ e metabolismo de girinos</i>	27
1.4.6 <i>Demandas metabólicas durante a metamorfose e contaminação ambiental</i>	30
1.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DA PELE DE ANUROS	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	34
3.1 REAGENTES E DROGAS.....	34
3.2 COLETA DOS ANIMAIS E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO.....	34
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA OS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	35
3.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL (MO).....	36
3.5. DETERMINAÇÃO DA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA	37
3.6. ESTUDO DA FUNÇÃO CARDÍACA	39
3.6.1. <i>Determinação da frequência cardíaca “in vivo”</i>	39
3.6.2 <i>Estudo da função cardíaca “in vitro”</i>	40
3.6.3 <i>Protocolos Experimentais</i>	42
3.7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	43
3.8. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO.....	45
4.1.1. <i>Nível de Atividade, Massa Ventricular Relativa e Frequência Cardíaca</i>	45
4.1.2. RESPOSTAS IN VITRO.....	45
4.1.2.1. <i>Força de Contração e Dinâmica Cardíaca em “Steady-State”</i>	45
4.1.2.2 <i>Efeito de Aumentos da Frequência de Estimulação</i>	48
4.2. EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP ORIGINAL®	56
4.2.1. <i>NÍVEL DE ATIVIDADE, MASSA VENTRICULAR RELATIVA FREQUÊNCIA CARDÍACA</i>	56

4.2.2. RESPOSTAS IN VITRO.....	57
4.2.2.1. Força de Contração e Dinâmica Cardíaca em Steady-State	57
4.2.2.2 Efeito de Aumentos da Frequência de Estimulação.....	59
4.3. EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP TRANSORB R®	67
4.3.1. <i>Nível de Atividade, Massa Ventricular Relativa Frequência Cardíaca</i>	67
4.3.2. <i>Respostas In Vitro</i>	67
4.3.2.1. Força de Contração e Dinâmica Cardíaca em “Steady-State”	67
4.3.2.2 Efeito de Aumentos da Frequência de Estimulação.....	70
4.4 PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS.....	78
4.4.1 <i>Determinação da Função Respiratória</i>	78
4.5 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS PELE DORSAL	82
5. DISCUSSÃO	84
5.1 PARÂMETROS DE FUNÇÃO CARDÍACA.....	84
5.2 PARÂMETROS DE FUNÇÃO RESPIRATÓRIA	92
5.3 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE PELE DORSAL.....	95
6. CONCLUSÕES	98
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1. INTRODUÇÃO & JUSTIFICATIVA

Durante a primeira metade do século XX, estudos pioneiros como o de Grinnell & Storer (1924) descreveram uma redução drástica de populações de anfíbios capaz de expor um grande número de espécies desse grupo a um risco de extinção local. Baseando-se nesta afirmação alarmante, ao longo de décadas seguintes, um grande número de autores se preocupou em averiguar a situação das populações de anfíbios ao redor do mundo, fato que contribuiu não apenas para a confirmação do risco de extinção de uma variedade de espécies, mas também para a verificação da abrangência global desse acontecimento (BRAGG 1960, GIBBS *et al.* 1971; COOKE 1972; BURY *et al.*, 1980; ANDRÉN & NILSON 1981; HAMMERSON 1982; CORN & FOGLEMAN 1984; HEYER *et al.* 1988; WAKE 1991; ALFORD & RICHARDS 1999; HAYES & JENNINGS 2000; HOULAHAN *et al.* 2000; MACKEY & BOONE, 2009).

Muitos fatores são apontados como sendo formadores desse cenário crítico, entretanto, a degradação ambiental (uma consequência da ação humana irrestrita sobre o ambiente) se relaciona diretamente a todos eles. Estudos têm sugerido que dentre as principais modificações ambientais que desencadearam a perda de diversidade de anfíbios estão destruição ou fragmentação de hábitat, aumento da incidência de radiação ultravioleta-B, aquecimento global, doenças, introdução de espécies exóticas, bem como o avanço da agricultura extensiva (RELYEA, 2003; VOYLES, *et al.*, 2009).

Dentre os fatores supracitados, a atividade agrícola atual merece uma análise cuidadosa por englobar duas características que podem (sozinhas e/ou em conjunto) atuar negativamente sobre as populações de anfíbios (GALLANT *et al.*, 2007). As monoculturas, como as de soja, milho, cana-de-açúcar, pínus e eucalipto, bem como a pecuária extensiva demandam grandes áreas e, no contexto do declínio das populações de anfíbios, são consideradas as atividades que mais motivam a perda e/ou alteração dos

habitats naturais. (DEVINE & FURLONG, 2007). Outra característica inerente da atividade agrícola moderna é a aplicação de uma grande variedade de fertilizantes e defensivos químicos, substâncias que, segundo trabalhos recentes de Mann *et al.* (2009) e Ortiz-Santaliestra *et al.* (2011), representam uma grande ameaça para as populações de anfíbios. Vale ressaltar que, dentre tais substâncias, a contaminação por pesticidas apresenta maior nocividade, pois, embora sejam raros os casos de mortandade por uma contaminação direta em larga escala (HARRIS *et al.*, 1998; DAVIDSON, 2004; FELLERS *et al.*, 2004), tais substâncias são capazes de alterar grandemente as funções do organismo mesmo em concentrações sub-letais (MANN *et al.*, 2009).

Pesticidas podem ser aplicados de diversas formas na agricultura, que vão desde pulverização por meio de bombas manuais ou apoiadas em tratores à pulverização com o auxílio de aviões (DORES & DELAMONICA-FREIRE, 2001). Principalmente quando aplicados irrestritamente, tais químicos podem atingir corpos d'água, como lagos, córregos, regiões alagadiças ou poças, pela pulverização direta ou sendo lixiviados (THOMPSON *et al.*, 2004). É relevante salientar que tais corpos d'água correspondem muitas vezes a microhabitats importantes para a sobrevivência, reprodução e/ou desenvolvimento de muitas espécies de anuros, fazendo com que uma eventual contaminação destes ambientes afete grandemente tais organismos, especialmente durante os estágios pré-metamórficos aquáticos, quando estes animais são especialmente sensíveis à exposição a produtos químicos (JOHANSSON *et al.*, 2006). Consequentemente, estudos toxicológicos envolvendo anfíbios são muito importantes, embora sejam muito escassos em comparação com aqueles realizados com os demais vertebrados (VENTURINO *et al.*, 2003).

Neste contexto, o glifosato, um herbicida de amplo espectro, é um dos defensivos agrícolas mais comumente utilizados na agricultura mundial (HULTBERG,

2007), sendo também extensivamente utilizado no ambiente aquático para o controle do crescimento de macrófitas (TSUI & CHU, 2003). Este componente é sintetizado através da inserção de um grupo fosfato em um aminoácido glicina (CABRERA *et al.*, 2008) e seu efeito deletério em plantas se deve ao bloqueio da enzima CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CP4-EPSPS), responsável pela síntese de aminoácidos essenciais, o que acarreta em dessecamento e morte da planta (WILLIAMS *et al.*, 2000).

No Brasil, a concentração de glifosato encontrada em afluentes próximos a culturas de soja e arroz foi de 0,36 a 2,16 mg.L⁻¹ (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Esses achados, associados à elevada solubilidade do glifosato em água e a sua grande concentração no ambiente, tornam de grande relevância para os estudos ecotoxicológicos a análise do impacto da exposição de organismos aquáticos a este herbicida e/ou às diferentes formulações de glifosato disponíveis comercialmente (ÇAVAN & KONEN, 2007).

Diversos estudos indicam que concentrações subletais de diferentes formulações a base de glifosato, como o Roundup[®], induzem efeitos tóxicos em peixes (SZAREK *et al.*, 2000; TERECH-MAJEWSKA *et al.*, 2004) e em outros organismos aquáticos como bactérias, microalgas, protozoários e crustáceos (TSUI & CHU 2003). Sparling *et al.* (2006) expuseram ovos de tigre d'água (*Trachemys scripta elegans*, WIED-NEUWIED, 1839) a aplicações de outras formulações do glifosato (Glypro[®], Dow Agrosiences) e observaram efeitos deletérios sobre o comportamento, sobrevivência, crescimento e genotoxicidade, apesar de somente quando expostos a concentrações superiores às aquelas consideradas ambientalmente relevantes. Embora convencionalmente considerado inofensivo para anfíbios, Relyea (2005) demonstrou que o Roundup[®] pode eventualmente levar ao declínio destas populações. Ademais, de acordo com Howe *et*

al. (2004), estudos de toxicidade das diferentes formulações à base de glifosato sobre anfíbios são de grande importância em virtude da dependência destes animais do ambiente aquático para reprodução e desenvolvimento primário.

As diversas formulações do Roundup[®] disponíveis no mercado são resultantes de associações de sais de glifosato a diferentes surfactantes, substâncias que permitem que o herbicida penetre na cutícula da planta, além de componentes ditos *inertes*. O surfactante utilizado em grande parte das formulações de Roundup[®] é o polioxietilenoamina (POEA), que compõe aproximadamente 15% do herbicida (HOWE ET AL., 2004) e diversos estudos o tem apontado como o ingrediente de maior toxicidade do Roundup[®] (PERKINS *et al.*, 2000; COX & SURGAN, 2006; BRAUSCH & SMITH, 2007).

Dentre as formulações comerciais à base de glifosato, o Roundup Original[®], que apresenta o glifosato na forma de sal de isopropilamina, (Monsanto Company, St Louis, MO, USA) corresponde a um dos pesticidas mais amplamente utilizados tanto no Brasil quanto no mundo. Costa *et al.*, (2008) indicou que a exposição aguda (48 h) de girinos de rã-touro a concentrações ambientalmente relevantes (1 ppm) da formulação Roundup Original[®] resultou em efeitos expressivos sobre a função cardíaca dos animais.

Além do Roundup Original[®], existem diversos tipos de herbicidas fabricados e comercializados no território brasileiro que levam o nome comercial Roundup[®], dentre eles estão: Roundup Transorb[®], Roundup WG[®], Roundup Ready[®], Roundup NA[®], Roundup Ultra[®] e Roundup Transorb R[®]. Tais formulações apresentam variações de sais de glifosato, bem como de surfactantes e componentes inertes, os quais não são especificados nos rótulos dos produtos por se tratarem de segredos industriais (Monsanto do Brasil Ltda).

De acordo com Gluszcak (2008), a disparidade entre os efeitos das diferentes formulações a base de glifosato é promovida conjuntamente pelas diferentes composições dos componentes inertes, que incluem não apenas os surfactantes, como também solventes, corantes e outras substâncias que conferem propriedades especiais ao herbicida. De acordo com Cox & Sorgan (2006), muitos destes ingredientes não poderiam ser considerados como inertes, podendo, inclusive, causar danos aos seres humanos e ao meio ambiente.

O Roundup Transorb R[®] é um dos herbicidas fabricados pela Monsanto que apresentam o registro mais recente no Brasil, sendo comercializado na forma de um concentrado solúvel em água, sendo descrito pelo fabricante com possuidor da tecnologia Transorb II uma combinação de sais de glifosato e surfactantes que promove uma rápida absorção do herbicida pela planta (Monsanto do Brasil Ltda). Além da diferente composição de surfactantes, tal formulação também difere do Roundup Original[®] quanto suas composições de sais de glifosato. Enquanto o Roundup Original[®] apresenta um sal de isopropilamina de glifosato na concentração de 480 g/L (360 g/L de equivalente ácido), a formulação do Roundup Transorb R[®] contém um sal de potássio de glifosato na concentração de 588 g/L (480 g/L de equivalente ácido) (Monsanto do Brasil Ltda, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária classifica a formulação de Roundup Original[®] como sendo medianamente tóxica (classificação toxicológica III) e a formulação do Roundup Transorb R[®] como altamente tóxica (classificação toxicológica II) (ANVISA, 2008). Tal diferença na classificação toxicológica está provavelmente associada não apenas às maiores concentrações do ingrediente ativo no Roundup Transorb R[®], mas também à diferente composição e concentração de ingredientes *inertes* entre as duas formulações.

Considerando-se as observações precedentes, optou-se no presente trabalho por utilizar concentrações ambientalmente relevantes do ingrediente ativo (glifosato) e duas diferentes formulações comerciais de Roundup[®] (Original[®] e Transorb R[®]) por meio da análise do possível efeito destas substâncias sobre biomarcadores morfológicos e fisiológicos. Além disso, enquanto vários estudos têm observado os aspectos negativos de pesticidas sobre o crescimento, desenvolvimento e comportamento de girinos de anuros (BRIDGES, 2000; CHRISTIN *et al.*, 2003; BROOMHALL, 2005), este estudo também se propõe a analisar os seus efeitos fisiológicos (função cardíaca e respiratória) e histológicos (avaliação de danos no tecido cutâneo), que correspondem a biomarcadores mais sensíveis à exposição a poluentes.

Ressalta-se que a utilização de diversos biomarcadores com múltiplos *endpoints* é imprescindível quando se objetiva utilizar ferramentas efetivamente preditivas para a proteção dos ambientes ocupados por populações de anuros ameaçadas. Além disso, a capacidade de prever os efeitos dos poluentes sobre os organismos e de extrapolar os efeitos tóxicos encontrados em laboratório para populações e comunidades naturais vem se tornando um fator de grande interesse e importância. Para tanto, indicadores biológicos podem ajudar na identificação de problemas ambientais antes que a saúde dos sistemas aquáticos se torne seriamente alterada (JIMENEZ & STEGEMAN, 1990).

1.1 Breves Considerações sobre o Grupo dos Anfíbios

De acordo com Frost (2009) a classe formada pelos anfíbios modernos (Classe Amphibia) apresenta uma grande diversidade de espécies (6.433), agrupados em apenas três ordens: Anura, Caudata e Gymnophiona. Dentre estas, a mais numerosa é a Anura (com 5.679 espécies), seguida pela Caudata (580 espécies) e Gymnophiona (174 espécies). Além da grande diversidade, os anfíbios exibem uma enorme variedade de adaptações fisiológicas e desempenham uma ampla variedade de funções ecológicas (MURPHY *et al.*, 2000).

Além dessa grande diversidade, os anfíbios possuem certas características que os tornam especialmente sensíveis a perturbações ambientais tanto de origem natural quanto antrópica. Dentre tais características, pode-se citar a extrema permeabilidade e vascularização do tegumento, necessárias para a respiração cutânea que, em contrapartida, os tornam extremamente vulneráveis a desequilíbrios hidroeletrolíticos, a danos ocasionados pela radiação solar intensa e também à contaminação por poluentes (ROWE *et al.*, 2003).

Em adição, a grande maioria das espécies de anfíbios apresenta um ciclo de vida extremamente complexo, onde o desenvolvimento primário é totalmente dependente do meio aquático. Após o término do estágio embrionário, muitas espécies atravessam um estágio larval também muito dependente do meio aquático (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Perante sua complexidade, tal estágio não pode ser considerado simplesmente uma extensão do ciclo embrionário (McDIARMID *et al.*, 1999). Durante o estágio pré-metamórfico, os indivíduos, ou também denominados girinos, apresentam diversas características singulares (VIERTAL *et al.*, 1999). Ainda segundo esses autores, o girino apresenta órgãos em transformação (e.g. fígado), que estão em processo de desaparecimento ao decorrer da metamorfose (e.g., brânquias), que ainda não se

encontram funcionalmente ativos (e.g. pulmões) ou que se mantêm ativos ao longo de ambos os estágios (e.g. o sistema coração).

1.2 Breves Considerações sobre a Espécie Estudada

A rã- touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) pode medir de 9,5 a 12,5cm de comprimento durante a maturidade (BRUNEAU & MAGNIN, 1980). Sua maturidade sexual se dá com cerca de 1 a 2 anos para os machos e 2 a 3 anos para as fêmeas, sendo que, em ambientes naturais, esta espécie pode viver até 10 anos (BRUNEAU & MAGNIN, 1980). Sua reprodução ocorre em corpos d'água permanentes sendo que a postura de ovos se dá em águas rasas durante o período de primavera e início do verão, em seu hábitat original (PRYOR, 2003). Segundo Schwalbe & Rosen (1999) a rã-touro se mostra uma espécie extremamente prolífica, sendo que cada fêmea produz cerca de 20.000 ovos por desova e o número de descendentes originados por casal gira em torno de 5.000 em uma estação reprodutiva (HOWARD, 1978). Os ovos eclodem em um período que varia entre 3 e 5 dias dando início desenvolvimento larval dos animais, onde adotam hábitos fossoriais e se alimentam de algas e restos de animais (PRYOR, 2003). A morfologia de um girino em estágio 25 de Gossner, com aproximadamente 3 meses de idade, está representada na Figura 1. A metamorfose dos indivíduos não é sincronizada e pode variar de 3 a 6 meses, em ambientes naturais, e os juvenis (Figura 2) tendem a colonizar lagoas distintas à quais se desenvolveram (MEROVICH & HOWARD, 2000).

Tal espécie apresenta naturalmente grande distribuição na América do Norte, ocorrendo desde o sul da Flórida até o norte do México. No entanto, devido ao interesse culinário, a rã-touro foi introduzida não apenas em outras regiões dos Estados Unidos, como também no Canadá, Havaí, Ásia e América do Sul. Tal espécie chegou ao Brasil em 1935, juntamente com a introdução da ranicultura, e representa atualmente a

principal espécie de rã cultivada no Brasil para fins alimentícios (RODRIGUES-SERNA *et al.*,1996).



Figura 1- Morfologia externa de um exemplar de girino de rã-touro no estágio 25 de Gosner.

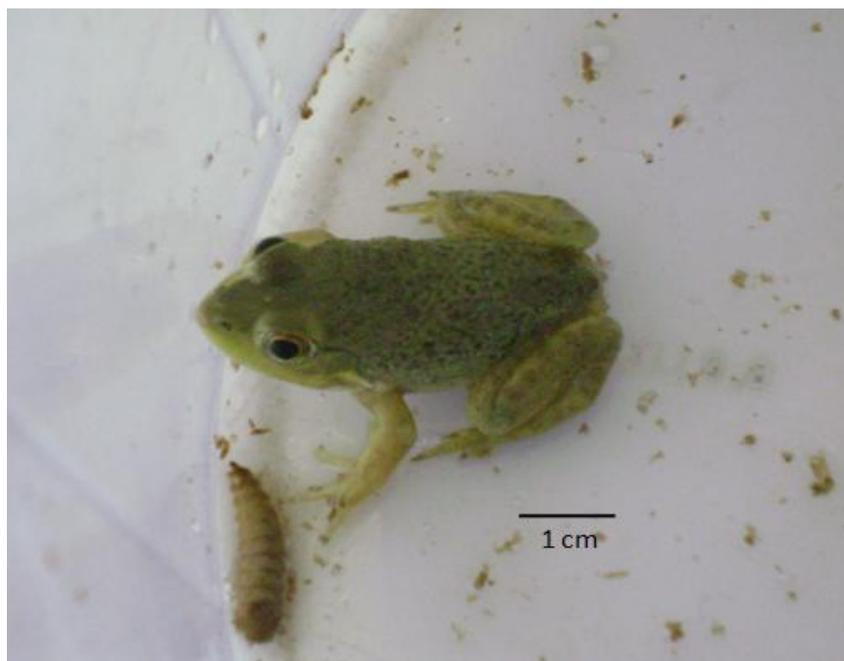


Figura 2- Morfologia externa de um indivíduo juvenil de rã-touro.

Devido à distribuição em ambientes diversos bem como pela criação e soltura desordenada, a rã-touro, por ser uma espécie resistente, generalista e de grande porte, comumente se torna uma espécie invasora, podendo prejudicar grandemente as espécies nativas de anfíbios dos ambientes e a dinâmica dos ecossistemas que invadem (FEIO, 1997; BORGES-MARTINS *et al.*, 2002; ROCHA-MIRANDA *et al.*, 2006).

1.2.1 Posição Sistemática da Espécie

Segundo Frost (2011), a rã-touro ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: AMPHIBIA

Ordem: ANURA

Família: RANIDAE

Gênero: *Lithobates*

Espécie: *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802)

1.3 Morfologia e Fisiologia Cardíaca de Anfíbios

1.3.1 Miócitos de Anfíbios

Segundo Driedzic & Gesser (1994), os mecanismos contráteis, ou seja, a interação actomiosínica e sua regulação pelo Ca^{2+} parecem ser similares nos diferentes grupos de vertebrados (para uma revisão completa, ver BERS, 2001). Porém, distinções anatômicas e estruturais existentes no coração da maioria dos vertebrados basais (peixes, anfíbios e répteis), como um retículo sarco(endo)plasmático (RS) esparso e pouco desenvolvido anatomicamente (FORBES & SPERELAKIS, 1971; HELLE, 1983; LEKNES, 1984; DRIEDZIC & GESSER, 1988, 1994; TOTA, 1989; MAYLIE & MORAD, 1995; CHUGUN *et al.*, 1996), ausência de túbulos transversos (túbulos-T)

(KEEN *et al.*, 1992; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; DRIEDZIC & GESSER, 1994), miócitos de tamanho relativamente reduzido (JENSEN, 1965; HELLE, 1983; FARRELL & JONES, 1992; KEEN *et al.*, 1992; DRIEDZIC & GESSER, 1994; VORNANEN, 1997, 1998), bem como miofibrilas periféricamente arranjadas (SANTER & COBB, 1972; BOSSEN & SOMMER, 1984; VORNANEN, 1997), são base para importantes diferenças fisiológicas, particularmente sobre a origem do Ca^{2+} a ser utilizado pelo aparato contrátil (TIBBITS *et al.*, 1991). A morfologia dos miócitos de alguns exemplares de anfíbios está representada na Figura 3.

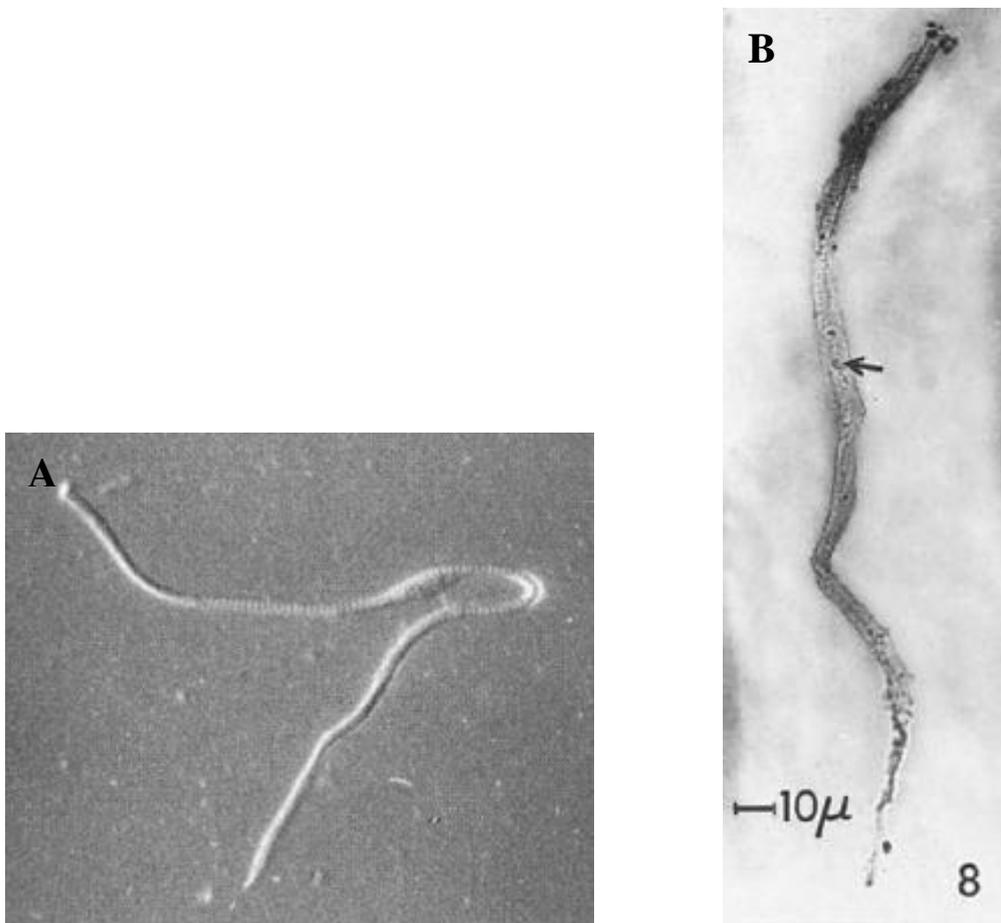


Figura 3- Fotomicrografia eletrônica de um miócito isolado de: A: *Rana esculenta* (COLOMO *et al.*, 1997); e, B: *Rana pipiens* (BARR *et al.*, 1965) (aumento de 12.000 vezes). Notar o pequeno diâmetro dos miócitos ($5,78 \pm 0,11 \mu\text{m}$).

A sequência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração muscular é denominada acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C). Um esquema geral do acoplamento E-C cardíaco é mostrado na Figura 4, que compara o modelo desenvolvido por mamíferos (Figura 4A) àquele conhecido até o momento para peixes teleósteos (Figura 4B), mas que supostamente é bastante similar àquele descrito para os demais vertebrados ectotérmicos.

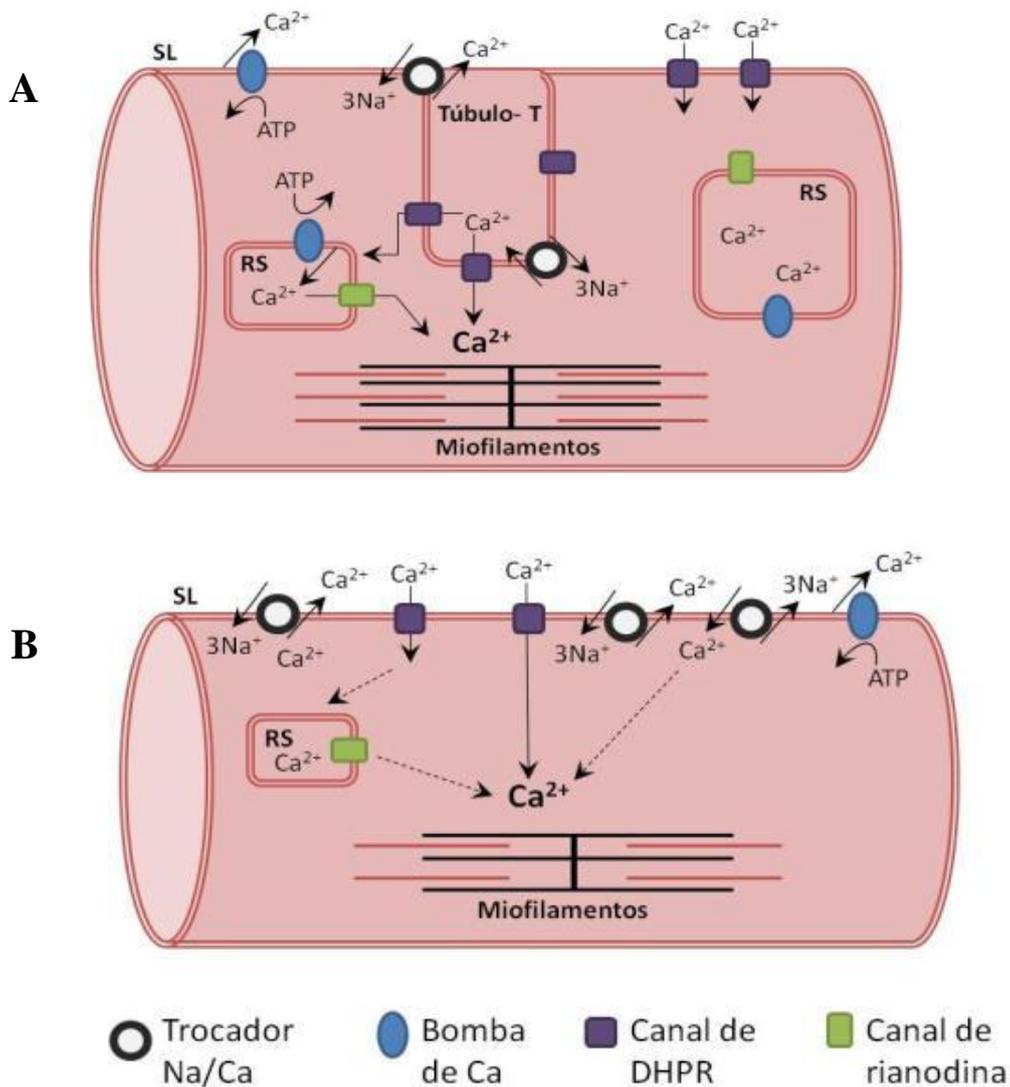


Figura 4.- Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco, comparando o modelo existente em mamíferos. (A) com o proposto para vertebrados basais (B). A figura também ilustra algumas diferenças entre a estrutura dos miócitos de vertebrados basais e mamíferos, como variações no diâmetro das células, distribuição e abundância do RS e existência de túbulos-T. As linhas pontilhadas sugerem um possível papel das fontes de Ca²⁺. DHPR: canal de dihidropiridina (ou canal L); SL: sarcômero; RS: retículo sarco(endo)plasmático (modificado de TIBBITS *et al.*, 1992).

É bem estabelecido na literatura (RINGER, 1883 apud BERS, 2001) que o Ca^{2+} extracelular é essencial à contração miocárdica. Tem sido mostrado que um influxo de Ca^{2+} pela sarcolema (SL) (BERS *et al.*, 2009), através da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e de canais voltagem-dependentes tipo L (lentos), sensíveis às dihidropiridinas (DHP), desempenha um papel crítico na regulação da contratilidade (MIKAMI *et al.*, 1989; ROMANIN *et al.*, 1992; NAKAI *et al.*, 1997). Fabiato (1983) propôs que em mamíferos este influxo transsarcolemal de Ca^{2+} dispara a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS, através de canais de Ca^{2+} denominados canais de rianodina (BERS, 2009), mecanismo denominado liberação de cálcio cálcio-induzida.

Apesar da magnitude do influxo de Ca^{2+} através dos canais L da SL ser variável entre as espécies de mamíferos (BERS, 2009), a maioria dos estudos indica que esta entrada transsarcolemal de Ca^{2+} é insuficiente para suportar a contração (CHAPMAN, 1983; DRIEDZIC & GESSER, 1994; BASSANI *et al.*, 1994, 1995). Assim, o Ca^{2+} liberado do RS constitui-se na fonte principal deste íon para a contração no coração de todos os mamíferos estudados (BERS, 1985; WIER, 1990; GWATHMEY & MORGAN, 1991; McCALL & ORCHARD, 1991; BASSANI *et al.*, 1992; 1993; 1994; KLAUTZ *et al.*, 1997; BERS *et al.*, 2009), com exceção dos indivíduos neonatos, nos quais a participação desta organela para o desenvolvimento de força é reduzida nos estágios iniciais do desenvolvimento ontogenético (AHO & VORNANEN, 1998; TIBBITS *et al.*, 2002).

Por outro lado, no coração dos vertebrados basais a situação parece ser muito diferente. Tibbits *et al.* (1991) sugeriram que, no miocárdio de anfíbios, o Ca^{2+} liberado do RS não é significativo para a contração, além de ter sido contestada a ocorrência de liberação de cálcio cálcio-induzida no ventrículo destes animais (FABIATO & FABIATO, 1978; FABIATO, 1983). A contração ventricular tanto em anfíbios

(MORAD & ORKAND, 1971; BERS, 1985; GWATHMEY & MORGAN, 1991; MILL *et al.*, 1992) quanto na maioria dos peixes (DRIEDZIC & GESSER, 1988; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; GESSER, 1996; RANTIN *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000) parece ser relativamente insensível à rianodina mesmo em concentrações que comprovadamente bloqueiam a liberação de Ca^{2+} do RS (SUTKO & AIREY, 1996) em experimentos conduzidos utilizando-se frequências de estimulação e temperaturas dentro da faixa fisiológica.

Devido a essas observações, associadas à existência de uma maior razão superfície/volume – a qual também proporciona uma maior densidade de receptores de DHPR (THOMAS *et al.*, 1996) – é de se esperar que no coração de vertebrados basais o transporte transarcolema de Ca^{2+} seja suficiente para permitir a contração (FORBES & SPERELAKIS, 1971; SHEPHERD & KAVALER, 1986; VORNANEN, 1997), a menos que outra organela – como a mitocôndria – contribua com a regulação batida-a-batida da concentração intracelular de Ca^{2+} . Deve-se assinalar que esta possível contribuição direta da mitocôndria para o acoplamento E-C tem sido descartada para o coração de mamíferos baseada em uma variedade de argumentos cinéticos e farmacológicos (FABIATO, 1983; DRIEDZIC & GESSER, 1994; BASSANI *et al.*, 1996). Contudo, a validade destes argumentos ainda necessita ser verificada em anfíbios. Pelos motivos anteriormente mencionados, o papel do RS na geração da tensão pelo coração de vertebrados basais normalmente é desconsiderado (TIBBITS *et al.*, 1990; GWATHMEY & MORGAN, 1991; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; HOVE-MADSEN & TORT, 1998).

Tibbits *et al.* (1992) destacam que, tanto em mamíferos como em vertebrados basais, o relaxamento cardíaco ocorre mediante uma redução da concentração citosólica de Ca^{2+} até o nível diastólico de cerca de 100 nM. Teoricamente, a diminuição do Ca^{2+}

livre pode ser obtida por sistemas de transporte localizados em 3 diferentes compartimentos celulares (MISQUITTA *et al.*, 1999): 1) a bomba de Ca^{2+} ou Ca^{2+} -ATPase (SERCA) do RS; 2) o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e a bomba de Ca^{2+} na SL; e, 3) a mitocôndria.

No coração de mamíferos, a SERCA e o NCX da SL são os principais mecanismos para reduzir a concentração citosólica de Ca^{2+} a fim de promover o relaxamento máximo. De acordo com Bers (2009), sob condições normais, cerca de 70% do Ca^{2+} citosólico é removido pelo RS através da SERCA e o restante pelo NCX sarcolemal, o qual se constitui no principal meio de efluxo deste íon da célula. Além disso, a bomba de Ca^{2+} da SL e a tomada mitocondrial de Ca^{2+} aparentemente desempenham um papel muito reduzido no relaxamento cardíaco de mamíferos (BASSANI *et al.*, 1996; MARENGO *et al.*, 1997).

Os vertebrados ectotérmicos, por sua vez, também diferem dos mamíferos em relação à contribuição relativa dos canais envolvidos na retirada do Ca^{2+} necessária para o relaxamento cardíaco, uma vez que apresentam um RS menos funcional e fibras musculares com uma maior razão superfície/volume. Em função disso, o influxo transsarcolemal de Ca^{2+} é removido do citosol através do NCX e da bomba de Ca^{2+} sarcolemais (TIBBITS *et al.*, 1991; THOMAS *et al.*, 1996; XUE *et al.*, 1999), onde o primeiro constitui o principal mecanismo (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Portanto, durante o ciclo cardíaco da maioria dos vertebrados ectotérmicos podemos observar uma menor importância do RS tanto como fornecedor quanto como armazenador de Ca^{2+} , o oposto ocorrendo com a SL (MORAD & ORKAND, 1971).

No presente contexto, é relevante avaliar os possíveis efeitos de xenobióticos (como herbicidas a base de glifosato) sobre a ciclagem do cálcio em girinos de rã-touro, uma vez que como sugerido por Costa *et al.* (2008) xenobióticos liberados no ambiente

por atividades antrópicas podem alterar direta ou indiretamente diversos mecanismos de transporte responsáveis pelo manejo de cálcio para o acoplamento E-C e relaxamento cardíaco. Tais respostas podem constituir-se em importantes marcadores fisiológicos desses estressores ambientais.

O conhecimento de tais respostas proporcionará o melhor entendimento acerca da fisiologia destes animais e como o estresse provocado pela exposição ao xenobiótico podem modificar as funções do organismo. Desta forma, tais dados podem contribuir para a geração de propostas mais adequadas e eficazes para a conservação de anuros, permitindo também identificar as possíveis estratégias adaptativas e/ou evolutivas determinantes para sua sobrevivência em habitats impactados pela presença de herbicidas à base de glifosato.

1.3.2 Manejo de Cálcio no Coração de Anfíbios

Tibbits *et al.* (1992) enfatizam que a importância relativa do fluxo de cálcio através da SL pode também ser indicada por um PA mais duradouro – resultante de uma fase platô mais pronunciada – em anfíbios (723 ± 106 ms à temperatura ambiente) e na maioria dos peixes investigados até o momento (e.g. 556 ± 56 ms a 20°C , em carpa cruciana, *Carassius carassius*, LINNAEUS, 1758 (VORNANEN, 1989). Isso contrasta com os resultados obtidos para mamíferos, nos quais até mesmo espécies que apresentem um PA de duração relativamente longa (e.g. 372 ± 14 ms a 23°C , em coelhos), sua duração não chega a atingir a metade do valor observado em anfíbios (Figura 5).

Segundo Driedzic & Gesser (1994), um PA mais duradouro resulta na manutenção de um potencial de membrana positivo e, conseqüentemente, na maior permanência dos canais de cálcio voltagem-dependentes no estado aberto, além de

favorecer um possível influxo de cálcio através do NCX (TIBBITS *et al.*, 1992). Isso sugere que a duração e a amplitude da contração sejam fortemente determinadas pela despolarização da membrana nos ventrículos de vertebrados ectotérmicos.

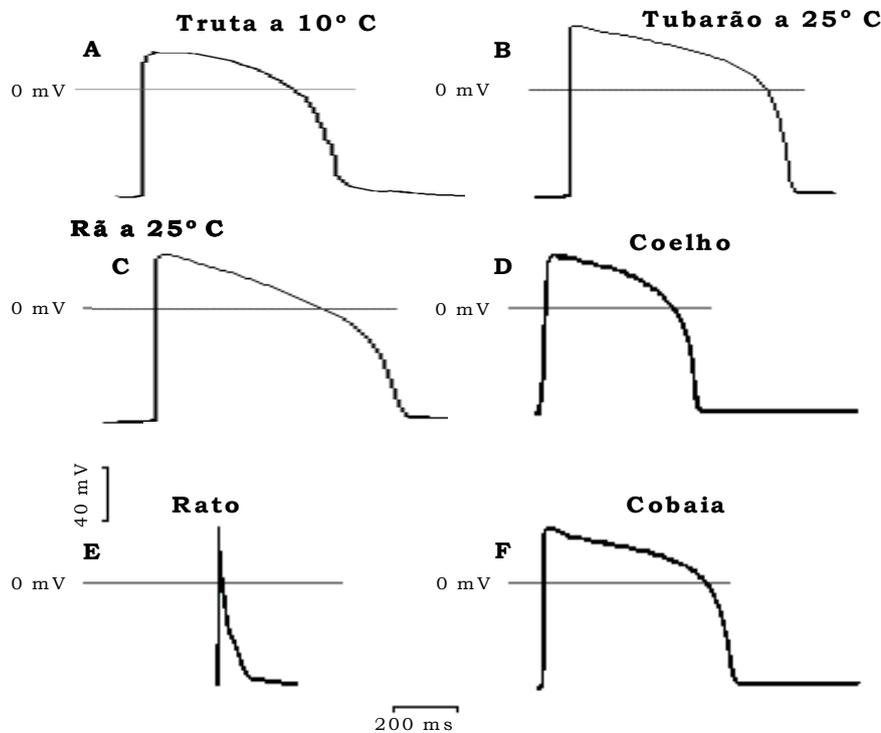


Figura 5 - Registros representativos dos potenciais de ação do miocárdio ventricular de diferentes espécies (A: MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; B-C: MITRA & MORAD, 1985; D-F: VARRÓ *et al.*, 1993).

1.4 Parâmetros respiratórios em anfíbios

1.4.1 Mecanismos respiratórios de anuros

Uma das principais características utilizadas para a definição do grupo *Amphibia* (gr.*amphi*= duas+ *bios* = vidas) é a notável distinção morfológica e de nicho ecológico entre os estágios larval (aquático) e adulto (terrestre/semi-aquático), proporcionada pela metamorfose que ocorre no decorrer do período de maturação (GARGAGLIONI, 2006). Dentre as características que possibilitam a conquista dos diferentes habitats, o desenvolvimento de um mecanismo respiratório especializado para a realização de trocas gasosas nos diferentes ambientes é primordial para garantir a sobrevivência dos

animais que sofrem grandes alterações morfológicas durante o desenvolvimento (KARDONG *et al.*, 2005).

Nos estágios larvais, os anuros exibem um aparato branquial adaptado para a realização de trocas gasosas em ambiente aquático, um ambiente de maior viscosidade e menor concentração de O₂ em comparação ao ambiente aéreo (ZUG *et al.*, 2001), dispondo, também, de pulmões que possibilitam respirações aéreas ocasionais (CROWDER *et al.*, 1998) Entretanto, no decorrer de seu desenvolvimento, as estruturas respiratórias variam desde brânquiais externas (ou transitórias), presentes dos o estágio 19 à 24 de Gosner, que se tornam gradualmente internalizadas (sendo denominadas persistentes) nos estágios larvais posteriores, 25 à 42, até serem completamente substituídas por pulmões ao final da metamorfose (BRUNELLI *et al.*, 2004). Deve-se ressaltar que, na grande maioria dos membros da subclasse Lissamphibia, a pele também atua como um importante ou até principal órgão respiratório em todos os níveis de desenvolvimento, possibilitando, portanto, trocas gasosas tanto em ambiente aquático quanto terrestre (KARDONG *et al.*, 2005).

1.4.2 Estruturas respiratórias em girinos de rã-touro

Em conformidade com a explanação precedente, girinos de *Lithobates catesbeianus* em estágio 25 de Gosner apresentam as brânquias permanentes e a pele como estruturas respiratórias (GRAWELL, 1970). Nesse estágio, as brânquias, que já se encontram totalmente internalizadas, são responsáveis não apenas pela respiração em ambiente aquático, como citado anteriormente, mas também desempenham papéis essenciais nos processos de regulação iônica e alimentação (BRUNELLI *et al.*, 2004).

As estruturas branquiais internas são divididas em duas porções morfológica e funcionalmente distintas: os filtros branquiais e tufos branquiais (BRUNELLI *et al.*, 2004). Os filtros branquiais estão situados no seguimento dorsal da estrutura branquial

e, como implícito em sua denominação, exercem a função de um filtro especializado em reter partículas, desempenhando um papel na alimentação (VIERTAL, 1985). Em tal estrutura existe uma camada de muco, produzido por células epiteliais presentes na cavidade bucal, que tem a função de facilitar a adesão do alimento nas vilosidades da estrutura. O conjunto desses filtros origina uma estrutura denominada placa filtradora (VIERTAL & RICHTER, 1999).

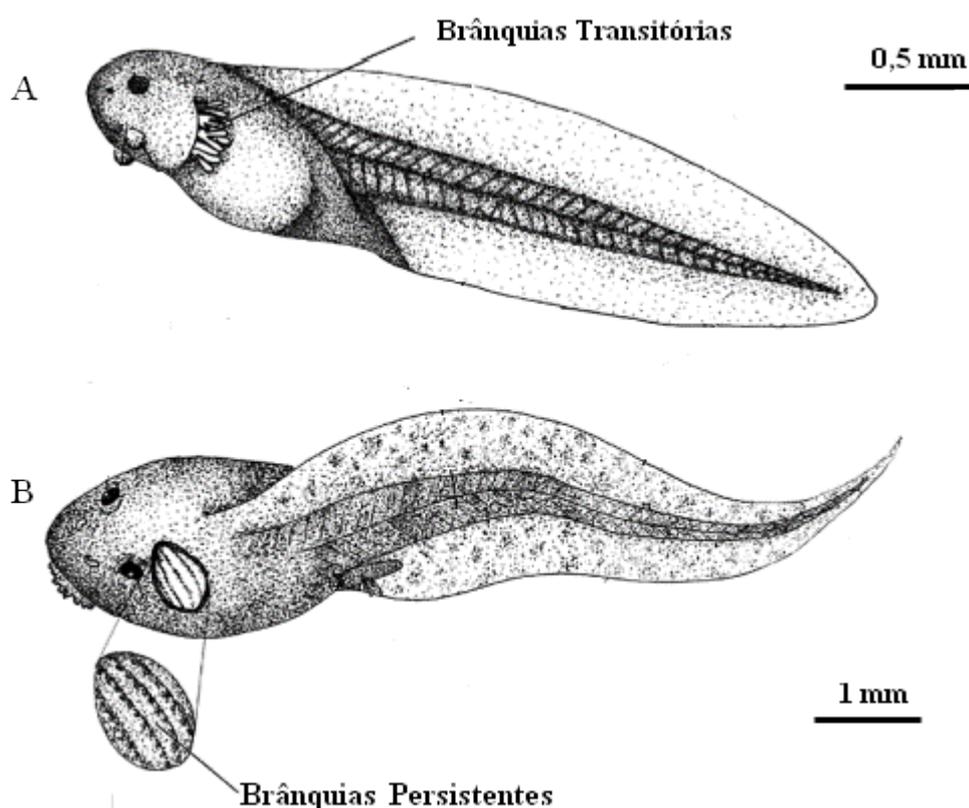


Figura 6 - Representação gráfica de diferentes estágios larvais de *Rana dalmatina*. A- Destaque das brânquias transientes, externas, de um exemplar em estágio 22 de Gosner. B- Destaque das brânquias persistentes, já internalizadas, de um exemplar em estágio 30 de Gosner. As barras horizontais representam a escala. Adaptado de BRUNELLI *et al.*, (2004).

As funções respiratórias e de troca iônica são desempenhadas pelos tufos branquiais, situados na porção ventral (BRUNELLI *et al.*, 2004). Tais estruturas apresentam numerosos filamentos irrigados, denominados tufos, que se encontram aderidos em uma dobra de pele, o opérculo (ZUG *et al.*, 2001). A base de cada tufo,

região inserida no opérculo, é constituída por um tecido conjuntivo e a região distal, em contraste, é revestida por uma fina camada epidérmica. A análise da ultraestrutura da região distal revela um grande número de ramificações laterais delgadas, que apresentam a espessura comparável à de um capilar. Na fina epiderme de tais projeções existem sítios com grandes quantidades de mitocôndrias, o que dá indícios para se atribuir a função de transporte iônico a essas porções (BOONKOO & ALVARAD, 1971; BRUNELLI *et al.*, 2004).

Os tufos branquiais são cortados por quatro arcos aórticos (ou arcos branquiais). O arco branquial aferente, que recebe sangue do coração, penetra na região branquial e sofre grau máximo de anastomose nas ramificações dos tufos branquiais. Ainda em tais ramificações, os capilares aferentes se unem por pontes de ligação aos capilares eferentes, que, por sua vez, desembocam em três diferentes arcos caudais eferentes que se projetam para a circulação sistêmica (MCINDOE & SMITH, 1984). Tal disposição estrutural dos tufos promove um grande aumento tanto da proximidade do fluido sanguíneo com a água quanto da superfície disponível para difusão, o que permite o livre trânsito de gases e, conseqüentemente, a adequada liberação de CO₂ e captação de O₂ pelos eritrócitos. Segundo West & Burggren (1982), em condições de normóxia (141 ± 1 mmHg), a capacidade de extração de O₂ por ciclo respiratório em girinos de rã-touro ainda com respiração branquial se mantém em cerca de 45%.

No entanto, embora a estrutura das brânquias seja eficiente no desempenho de trocas gasosas, os coeficientes de O₂ no ambiente aquático são extremamente baixos em comparação ao aéreo (PROSSER, 1973), fazendo com que os girinos, em semelhança aos peixes teleósteos, necessitem manter um fluxo de água unidirecional e constante pelas brânquias, que garante a troca adequada de gases. Assim, a água flui inicialmente pela cavidade bucal, atravessa as brânquias e desemboca em um orifício único presente

na porção medial lateral esquerda dos animais, o espiráculo (ALTIG, 2007). A geração de tal fluxo ocorre por meio de um processo de impulsão de água, gerado pelas bombas bucal e faringiana (KARDONG *et al.*, 2005).

Como descrito por Gargaglioni (2006), tal processo é possível pela existência de uma válvula, denominada velum, que permite a existência de duas cavidades distintas: a bucal e a faringiana (onde estão alojadas as brânquias). Na cavidade bucal existem orifícios que se conectam ao ambiente externo, a boca e as narinas, que têm a abertura regulada, respectivamente, pelas válvulas oral e nasais internas. Tais válvulas são abertas com a expansão da cavidade bucal e se fecham mediante sua contração. Com a expansão da cavidade bucal, ocorre uma diminuição da pressão no interior dessa câmara e, como as válvulas oral e nasal se encontram abertas, ocorre um fluxo de água para seu interior. Durante esta entrada de água, o velum permanece fechado, impedindo sua passagem para a cavidade faringiana. Após a cavidade bucal se encontrar preenchida por água, ocorre uma constrição da cavidade faringiana, o que mantém o velum fechado e expela a água que estava previamente sobre as brânquias, já com grande quantidade de CO₂, em direção ao espiráculo. Em seguida, a cavidade bucal se contrai, fechando as válvulas oral e nasal interna, o que empurra o velum e pressiona a água para o interior da cavidade faringiana. Em sincronia com a contração da cavidade bucal, a cavidade faringiana, até então contraída, se expande e é preenchida novamente com a água rica em O₂ proveniente da cavidade bucal.

O padrão respiratório de girinos é marcado por uma alta frequência e baixa amplitude de movimentos respiratórios (GDOVIN *et al.*, 1999). Para o melhor rendimento das trocas gasosas, a frequência de bombeamentos bucais pode ser modulada conforme a disponibilidade de O₂ no ambiente, sendo intensificada em condições de hipóxia ou reduzida em hiperóxia (WEST & BURGGREN, 1982).

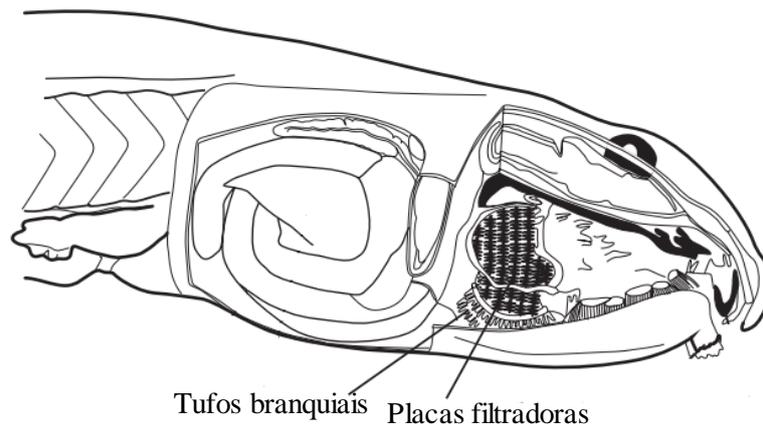


Figura 7 - Seção longitudinal de um girino demonstrando a posição dos tufos branquiais e das placas filtradoras. Adaptado de VIERTAL & RICHTER, 1999.

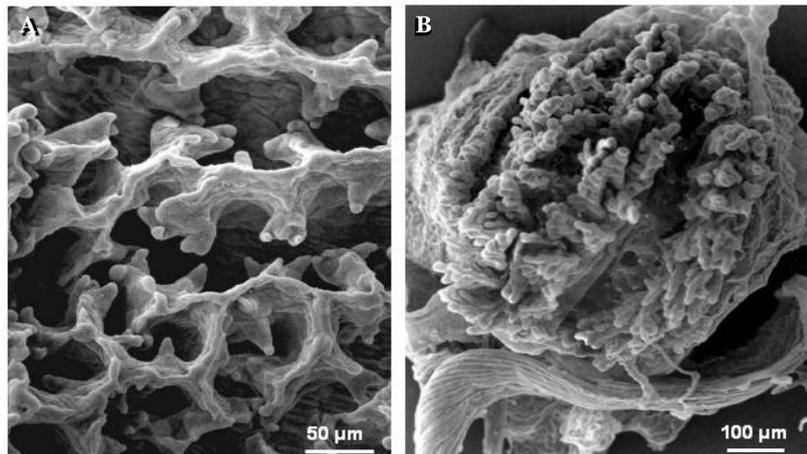


Figura 8 - Micrografia eletrônica das estruturas branquiais de girinos de *Rana dalmatina* (estágio 28 de CAMBAR & MARROT). **A**- filtro branquial. **B**- Tufo branquial. Adaptado de BRUNELLI *et al.*,(2004).

Entretanto, embora as brânquias desempenhem um papel importante nas trocas gasosas, a pele representa o principal órgão respiratório tanto no estágio larval quanto adulto de rã touro (KARDONG, 2005), permitindo a difusão de gases entre o ambiente externo, seja aquático ou aéreo, e a rede de capilares que irriga a epiderme.

Durante o estágio larval, como citado, a epiderme que reveste a cabeça, região dorsal e caudal do animal é irrigada por uma rede delgada de capilares e, por ser pouco

queratinizada, úmida e permeável, promove uma grande superfície para troca difusional de gases (DE SAINT-AUBAIN, 1982). Como demonstrado na Figura 9, existe uma grande diferença entre as proporções de captação de O₂ e liberação de CO₂ pela pele nos estágios larval e adulto. Enquanto em girinos a maior parte das trocas gasosas ocorre na pele, com cerca de 70% do total de O₂ captado e 60% do CO₂ excretado, durante a fase adulta a pele atua em um grau reduzido na tomada de O₂, captando cerca de 20% do total deste gás e, em contraste, realiza uma parcela mais representativa da excreção de CO₂, cerca de 80% do total (ZUG *et al.*, 2001). Além do aumento da ventilação branquial em situações de hipóxia, os girinos parecem adotar estratégias comportamentais para o aumento da captação de O₂ pela pele, como a natação pela coluna d'água, a qual permitiria um maior contato com o O₂ dissolvido (observação pessoal).

Embora não apresente função aparente na captação de O₂, a respiração aérea também é exercida por girinos servindo, possivelmente, para a indução do desenvolvimento pulmonar, impedimento do colapso pulmonar ou prevenção do acúmulo de fluido nos pulmões (CROWDER *et al.*, 1998).

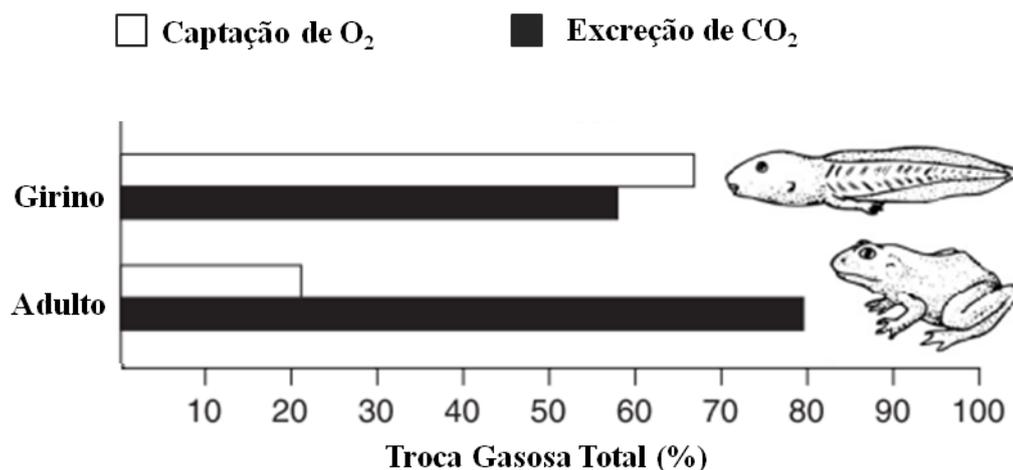


Figura 9 - Esquema demonstrando a percentagem de trocas gasosas através da pele em indivíduos em estágio larval e adulto de *L.catesbeianus*. As barras brancas representam a quantidade de O₂ captado e as negras a de CO₂ excretado através da pele (Adaptado de KARDONG, 2008).

1.4.3 Ritmogênese respiratória de girinos

Como citado anteriormente, a função primordial dos músculos respiratórios é originar movimentos coordenados que possibilitem a geração de um fluxo d'água rítmico (porém não necessariamente contínuo) pelas brânquias, capaz de suprir o organismo com O₂ frente às mais variadas condições de hipóxia ou hiperóxia (KINKEAD, 2009). Para tanto, é necessário que circuitos neurais gerem, inicialmente, potenciais de ação rítmicos capazes de desencadear os movimentos coordenados tanto da bomba bucal quanto de suas válvulas (FELDMAN & MCCRISMMON, 2003). Desta forma, a gênese do fluxo promovido pela bomba bucal requer um complexo acoplamento entre neurônios presentes no tronco encefálico (geradores de ritmo), neurônios motores e a musculatura respiratória (MILSOM, 2008).

Os músculos da cavidade bucal e faringiana, que representam os órgãos efetores, são inervados por grupos distintos de neurônios motores. A cavidade bucal é inervada pelos nervos trigêmeo (V nervo craniano) e facial (VII nervo craniano), enquanto que os arcos faringianos são inervados pelos nervos glossofaríngeo (IX nervo craniano) e vago (X nervo craniano) (KINKEAD, 2009). Tais nervos são responsáveis pela propagação

de potenciais de ação gerados por duas subpopulações de neurônios dispostas bilateralmente no tronco encefálico que compreendem o complexo pré- Bötzinger (preBötzc), região que apresenta papel-chave na inspiração e, conseqüentemente, na geração do ritmo respiratório (FELDMAN & DEL NEGRO, 2006). Inicialmente descrito em roedores neonatais, o preBötzc vem sendo utilizado como ponto de referência para estudos enfocando a geração do ritmo respiratório em diversos grupos de vertebrados (KINKEAD, 2009). Em tal região, existe um grupo específico de neurônios que expressam receptores de neuroquinina-1 (NK₁R), sendo descritos como os responsáveis pela gênese do processo inspiratório. Sugere-se que tais neurônios são os responsáveis, através de um processo dependente de uma corrente intrínseca de Na⁺, pela geração de um padrão rudimentar de potenciais de ação que desencadeiam a atividade inspiratória (SMITH *et al.*, 2000).

Embora haja consenso na literatura a respeito do protagonismo do preBötzc, outro grupo neuronal do tronco encefálico, a região respiratória parafacial, também vem sendo apontada como detentora de uma importante função na geração do ritmo respiratório por meio de um potencial papel modulador desta região sobre a expiração, embora sua função ainda não tenha sido completamente elucidada (ONIMARU *et al.*, 2006).

Em girinos de rã-touro, o padrão respiratório que caracteriza a ventilação branquial é produzido por movimentos de baixa amplitude e alta frequência, enquanto que, em indivíduos adultos, o padrão respiratório é formado por movimentos de alta amplitude e baixa frequência (GALANTE *et al.*, 1996). Curiosamente, indivíduos adultos também podem apresentar um padrão ventilatório de baixa amplitude e alta frequência, embora tais movimentos não apresentem função respiratória, tendo sido

sugerido que desempenhem papel na olfação e/ou no resfriamento do ar para posterior entrada nos pulmões (BRAINERD & OWERKOWICZ, 2006).

Estudos apontam que existe uma diferença significativa entre a localização dos centros ritmogênicos no decorrer do desenvolvimento. Durante o estágio pré-metamórfico, os circuitos que geram a ventilação pulmonar se localizam na região caudal do nervo vago e durante a maturação, entretanto, tais estruturas são realocadas para uma região mais rostral do tronco encefálico, situando-se entre os nervos trigêmeo e vago (TORGERSON *et al.*, 2001). Os centros de geração da ventilação branquial possivelmente estão localizados em uma região mais caudal, na raiz do nervo vago (WILSON *et al.*, 2002).

Os mecanismos neuronais de geração e modulação de ritmo respiratório em vertebrados ainda estão sendo intensamente debatidos na literatura e, conseqüentemente, diversos modelos são sugeridos, sendo que tais modelos podem variar tanto ontogenética quanto filogeneticamente (KINKEAD, 2009). Modelos de rede incluem grupos de neurônios respiratórios interconectados por sinapses de neurônios inibitórios (mediados por GABA ou glicina), disposição que permite que apenas um centro controlador de ritmo atue de cada vez, ou seja, enquanto o centro que regula a inspiração é ativado o centro regulador da expiração é inibido e vice-versa (RICHTER *et al.*, 2001; FELDMAN & MCCRIMMON, 2003). A geração de impulso para iniciação do sistema se dá através de potenciais de ação tônicos originários de quimiorreceptores centrais e periféricos, sendo que a inibição recíproca garante que apenas um centro excitado atue por vez. Portanto, a fase de transição ocorre quando a atividade de uma população neuronal começa a decrescer e, simultaneamente, diminui a influência inibitória sobre a outra (FELDMAN & MCCRIMMON, 2003). Outro modelo proposto aponta a existência de neurônios com atividade marca-passo capazes de gerar

espontaneamente potenciais de ação, mesmo na ausência de um comando sináptico. Desta forma, mesmo estando incrustados em uma rede neural, propõe-se que neurônios com atividade marca-passo sejam essenciais para a geração do ritmo (SMITH *et al.*, 2000; RAMIREZ & VIEMARI, 2005). Uma última hipótese propõe a existência de uma interação entre neurônios com propriedade marca-passo e neurônios que não apresentam tal propriedade, existindo uma influência mútua na geração dos movimentos inspiratórios (FELDMAN *et al.*, 2006).

Estudos com girinos de rã-touro descreveram que nesta espécie existem dois mecanismos ritmogênicos, cada um associado a funções respiratórias específicas. Em preparações *in-vitro* de neurônios da região do tronco encefálico, Galante *et al.* (1996) aboliram o padrão associado à ventilação branquial adicionando tanto pequenas concentrações de GABA e glicina (0,5 a 2,5 mM) quanto aumentando a concentração de Cl⁻ livre no meio, fornecendo fortes evidências de que tal ritmo esteja associado à modulação inibitória mediada por Cl⁻. Em contraste, esses mesmos autores descobriram que em baixas concentrações de GABA e glicina (0,05 a 0,5 mM) existe um aumento da frequência de disparos que caracteriza os movimentos respiratórios pulmonares em células neuronais de girinos, sugerindo uma mudança da influência destes neurotransmissores sobre tais centros durante a ontogenia (GALANTE *et al.*, 1996). Adicionalmente, em preparações neuronais de tronco encefálico de girinos, a elevação dos níveis de K⁺ estimulou tanto o aumento da frequência de disparos branquiais quanto pulmonares, o que sugere que os ritmos gerados são dependentes da atividade de células marca-passo voltagem-dependentes (KINKEAD, 2009).

1.4.4 Consumo de O₂ e metabolismo de girinos

Como descrito por Ultsch *et al.* (1999), entre os vertebrados de respiração aquática, dentro de limites fisiológicos, é frequente a manutenção de uma taxa

metabólica ($\dot{V}O_2$) relativamente constante independente da pressão de O_2 apresentada pelo ambiente (PO_2), que pode apresentar oscilações relevantes em um curto período de tempo. Em contraste, existem animais que apresentam uma influência direta entre a PO_2 e a $\dot{V}O_2$, apresentando uma redução da $\dot{V}O_2$ associada à redução da PO_2 .

Os animais capazes de manter a $\dot{V}O_2$ constante frente a variações ambientais são denominados reguladores metabólicos de O_2 ou oxirreguladores e os que apresentam variações metabólicas frente a variações ambientais de O_2 são denominados conformistas metabólicos de O_2 ou oxiconformistas (HUGHES, 1973). Entre os oxirreguladores, a faixa de PO_2 em que os animais são capazes de manter a $\dot{V}O_2$ constante reflete o grau de adaptação que cada espécie apresenta frente à hipóxia. A PO_2 na qual os animais não podem mais desempenhar a oxirregulação é denominada pressão crítica de O_2 (P_c). Via de regra, espécies que apresentam baixos valores de P_c são mais adaptadas à situação de hipóxia por serem capazes de manter a $\dot{V}O_2$ constante mesmo em condições de baixa concentração O_2 . Entretanto, em condições onde a PO_2 se encontra abaixo da P_c , a relação entre a $\dot{V}O_2$ e a PO_2 é aproximadamente linear, em um padrão semelhante ao apresentado por animais oxiconformistas (ULTSCH *et al*, 1999)

A curva dessa relação linear entre a $\dot{V}O_2$ e a PO_2 , em uma situação onde a pressão parcial de O_2 se encontra a baixo da P_c , é determinada pela capacidade de transporte de O_2 (BERCKENBACH, 1975) ou pela condutância de O_2 por todo o corpo (Duke & Ultsch, 1990). Desta forma, mudanças na taxa de condutância de O_2 pelo corpo podem alterar os valores da P_c . Ao considerar, por exemplo, um animal oxirregulador que apresente uma dada taxa metabólica basal e uma P_c de 100 mmHg, ao dobrar-se a condutância total de O_2 do organismo a P_c irá diminuir pela metade (50 mmHg) sem que a taxa metabólica basal seja alterada. Alternativamente, se o animal for

capaz de reduzir sua taxa metabólica basal pela metade, a P_c também será reduzida pela metade (50 mmHg), mesmo que a condutância não seja alterada. Portanto, se o animal for capaz de reduzir sua taxa metabólica basal pela metade e, simultaneamente, dobrar a condutância de O_2 o resultado será, então, a diminuição da P_c em um fator de 4 (25 mmHg). Assumindo que esses sejam os ajustes máximos na taxa metabólica basal e na condutância de O_2 , a faixa de ajustes resultantes de todas as combinações está demonstrada na figura 10.

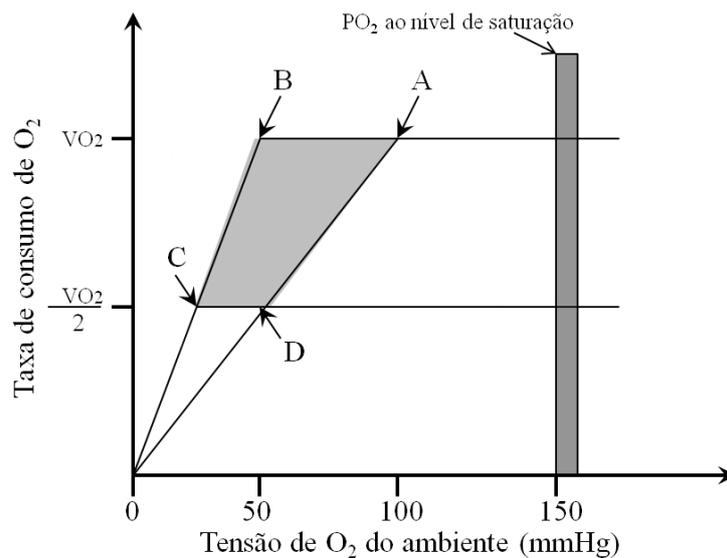


Figura 10 - Esquema demonstrando os efeitos teóricos da mudança na taxa metabólica basal ($\dot{V}O_2$ expressa como consumo de O_2) e da condutância total de O_2 do corpo sobre a tensão crítica de O_2 (P_c) em um organismo oxirregulador. Uma dada P_c pode ser afetada por mudanças na taxa metabólica basal e no CO_2 . Por exemplo, P_c em 100 mmHg (A)- pode ser reduzida para 50 mmHg tanto pela (D)- divisão da VO_2 pela metade quanto pela (B)- multiplicação da CO_2 por 2; uma diminuição ainda maior pode ser observada com a (C)- atuação dos dois efeitos simultaneamente. Adaptado de MCDIRMIT & RONALD (1999).

Reduções na taxa metabólica basal (depressão metabólica) de vertebrados ectotérmicos aquáticos podem ser induzidas por fatores como a diminuição da temperatura, torpor, hipóxia e anóxia (ULTSCH, 1999). Segundo Hochachk & Somero

(1984), tais depressões podem ser promovidas por limitações da ação enzimática. Existem evidências indicando que a depressão metabólica pode ocorrer em girinos submetidos a baixas temperaturas, embora tal resposta seja possivelmente uma adaptação de espécies de clima temperado para a sobrevivência em corpos d'água congelados.

A capacidade de girinos em aumentar a condutância total de O₂ ainda não está bem estabelecida na literatura. Entretanto, existem relatos de estratégias adotadas em curto e longo prazo como, por exemplo, mudanças adaptativas nas brânquias e na pele, incluindo um aumento do recrutamento capilar pela pele, e modificações na afinidade da hemoglobina pelo O₂ (FERDER & BURGGREN, 1985).

1.4.5 Demandas metabólicas durante a metamorfose e contaminação ambiental

Um dos intuitos primordiais da atividade respiratória em animais de respiração aeróbia é a aquisição do O₂ necessário para a geração de ATP, a partir da degradação dos alimentos, que será posteriormente oxidado, gerando as calorias necessárias para ocorrência de diversas reações químicas ordenadas que possibilitem o metabolismo celular e, em níveis mais elevados, a realização das funções vitais dos organismos (ZUG *et al.*, 2001). Em girinos em estágio pré-metamórfico, existe uma intensa atividade metabólica em decorrência das grandes mudanças associadas à metamorfose o que, conseqüentemente, gera uma elevada demanda de O₂. Desta forma, para que tanto a metamorfose quanto das funções vegetativas dos organismos ocorram de forma adequada é necessário que, durante o estágio larval, os animais acumulem uma quantidade de energia e estejam aptos para a tomada de O₂ (ORLOFSKE & HOPKINS, 2009).

Portanto, o estudo dos efeitos da contaminação ambiental sobre a demanda metabólica de girinos é de especial relevância, uma vez que a exposição a xenobióticos pode acarretar severas alterações tanto na dinâmica metabólica, tanto por desviar muita

energia para a depuração do organismo, quanto por acarretar danos diretos na estrutura de órgãos respiratórios como as brânquias e a pele, dificultando a aquisição de O₂ (ROWE *et al.*, 1997). Tais alterações acarretam um aumento no custo energético individual que, como sugerido por Calow & Sibly (1990), podem vir a alterar direta ou indiretamente o desenvolvimento e posterior reprodução dos animais.

1.5 Características morfológicas e funcionais da pele de anuros

Além das características já discutidas, o tegumento de anuros apresenta características singulares que podem variar grandemente entre as espécies (ELKAN, 1968). Além de seu papel na respiração, outras importantes funções também são desempenhadas pela pele de anfíbios tais como: proteção mecânica (FAQUAHAR & PALADE, 1965); defesa química (DELFINO *et al.*, 1995); percepção sensorial (KOYAMA *et al.*, 2001); transporte iônico (SULLIVAN *et al.*, 2000); controle hídrico (AZEVEDO *et al.*, 2007) e reserva de cálcio (AZEVEDO *et al.*, 2005). Tais funções refletem tanto uma complexidade morfológica (DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005) quanto fisiológica dos componentes do tegumento (GREVEN *et al.*, 1995).

O tegumento de anuros é um mosaico complexo formado pela epiderme, camada que constitui um epitélio estratificado pouco queratinizado, e pela derme, a qual é subdividida em duas regiões: a derme logo abaixo do epitélio, constituída de tecido conjuntivo frouxo, a derme esponjosa, e abaixo desta, a derme compacta, constituída de tecido conjuntivo com fibras de colágeno organizadas. Abaixo da derme há a hipoderme, pouco desenvolvida na maioria das espécies, constituindo-se de um tecido conjuntivo muito fino, rico em vasos sanguíneos com raros adipócitos visíveis (SCHWINGER *et al.*, 2001; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005)

Como citado, o epitélio apresenta a constituição muito delgada, apresentando no máximo 10 camadas de células, o que pode variar entre as espécies. A derme fina facilita as trocas gasosas por difusão e o acúmulo de água em sua camada esponjosa, a qual sustenta tanto vasos sanguíneos quanto uma grande variedade de glândulas tegumentares (SCHWINGER *et al.*, 2001; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005). A derme compacta garante grande resistência à pele por possuir fibras colágenas altamente organizadas sendo, entretanto, cortada por canais que possibilitam a entrada de água e gases até às camadas mais profundas do tegumento (SCHWINGER *et al.*, 2001; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a elevada vulnerabilidade de anfíbios a herbicidas, o uso indiscriminado do glifosato na aquicultura e o fato de que os danos morfofisiológicos podem ser os principais mecanismos da toxicidade de poluentes, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar as respostas cardiorrespiratórias e a morfologia do epitélio cutâneo de girinos de rã touro, *Lithobates catesbeianus*, em condições controle e após exposição a concentrações ambientalmente relevantes (1 ppm) de glifosato (ingrediente ativo), e concentrações equivalentes do princípio ativo nas formulações comerciais Roundup Original[®] (a mais utilizada e com efeitos tóxicos mais conhecidos) e Roundup Transorb R[®] (a mais recentemente comercializada e com efeitos ainda pouco conhecidos) por 96 horas. Para tanto, pretendeu-se especificamente:

- a. Avaliar um possível efeito das exposições sobre o nível de atividade dos girinos;
- b. Averiguar a existência de possíveis alterações morfológicas no tecido cutâneo.
- c. Determinar os possíveis efeitos ocasionados pela exposição aos diferentes herbicidas sobre a taxa metabólica em normóxia (140 mmHg) e hipóxia gradual (120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg);
- d. Comparar a frequência cardíaca *in loco* de girinos dos diferentes grupos experimentais;
- e. Verificar a ocorrência de possíveis alterações na massa ventricular relativa;
- f. Verificar possíveis alterações no manejo de cálcio no coração dos girinos através de registros da força de contração isométrica, dos tempos para o pico de tensão e metade do relaxamento das tiras ventriculares em diferentes condições (frequências de estimulação e presença de adrenalina).

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Reagentes e Drogas

No presente estudo foram utilizados os herbicidas a base de glifosato Roundup Original[®] (360 g/L de equivalente ácido de glifosato) e Roundup Transorb R[®] (480 g/L de equivalente ácido de glifosato), produzidos pela empresa Monsanto (Monsanto Company- Saint Louis , MO, EUA), cedidos pela revendedora Agrofito, São Carlos-SP. O sal de glifosato (N-fosfometil-glicina) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2 Coleta dos animais e manutenção em laboratório

Girinos recém-eclodidos de rãs-touro, *L. catesbeianus*, foram fornecidos pelo ranário Santa Rosa (Santa Bárbara d'Oeste-SP) e imediatamente transportados para o Laboratório de Fisiologia da Conservação da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* de Sorocaba, onde foram conduzidos os experimentos de função cardíaca e microscopia, e para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparada da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* São Carlos, onde foram realizados os experimentos de respirometria. Ambos os Laboratórios estão vinculados ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fisiologia Comparada (INCT-FisC), o que possibilitou o intercâmbio de informações e inserção deste projeto em uma linha maior de investigações nesta área.

Em ambos os laboratórios, os animais foram acondicionados em aquários de 50 L dotados de circulação contínua de água (1,2 L/h), aeração constante, temperatura controlada ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo natural (\cong 12h claro: 12h escuro) até atingirem o estágio 25 de Gosner (1960), o que ocorre aproximadamente 10 dias após a eclosão dos ovos. Tal período também é necessário para recuperação do estresse decorrente da

coleta e transporte bem como para aclimatação às condições laboratoriais, após o qual são realizados os ensaios ecotoxicológicos. Os girinos foram alimentadas *ad libitum* com ração comercial farelada para peixes (Oscar Sticks, Alcon), contendo 35 a 40% de proteína bruta, a qual foi suspensa 48h antes do início dos experimentos.

3.3. Delineamento experimental para os ensaios ecotoxicológicos

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo exposto ao Glifosato (GLI - 1 ppm; n = 10), ao Roundup Original[®] (RO, 1 ppm do equivalente ácido; n = 10) e ao Roundup Transorb R[®] (RTR, 1 ppm do equivalente ácido; n = 10) , sendo que os experimentos com cada grupo foram realizados simultaneamente a um grupo controle (CT, n=10), que recebeu uma dose de água destilada equivalente à dose de herbicida aplicada ao seu respectivo grupo contaminado.

A concentração de 1 ppm foi definida com base nas concentrações do herbicida Roundup[®] encontradas em afluentes próximos a áreas destinadas a agricultura no território brasileiro (de 0,38 à 2,16 mg.L⁻¹), como relatado por Rodrigues e Almeida (2005). O tempo de exposição foi definido para garantir que não haja decréscimo significativo do ingrediente ativo ao decorrer do ensaio experimental, uma vez que a meia-vida do herbicida Roundup[®] no ambiente é de 7-14 dias para águas superficiais (GIESY et al., 2000). Cada tratamento foi ensaiado em triplicata em aquários de 10 L com em temperatura controlada ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e aeração constante ($> 6,0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), sendo cobertos por plásticos opacos para evitar distúrbios externos.

Os animais pertencentes aos grupos GLI, RO e RTR, bem como seus respectivos grupos CT permaneceram nessas condições por 96 h em sistema estático, durante as quais o nível de atividade foi monitorado diariamente, de acordo com a metodologia proposta por Fraker & Smith (2004) para girinos de *Rana pipiens*. Brevemente, a atividade foi definida como o constante movimento pelo aquário, enquanto que, a

inatividade foi definida como o estado estacionário no fundo do aquário ou o de flutuar passivamente (sem movimento). O número de animais ativos foi determinado 3 vezes ao dia e a proporção de animais ativos em relação ao número total de animais foi estimado (em %) para cada grupo experimental.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela American Society for Testing and Materials - ASTM (2000) e da Comissões de Ética em Experimentação Animal e de Ética Ambiental da UFSCar.

3.4. Análise morfológica por microscopia de luz convencional (MO)

Foram coletadas amostras de pele dorsal de 5 exemplares de cada grupo (CT, GLI, RO, RTR) no mesmo momento em que o protocolo de função cardíaca foi realizado. Após o sacrifício e retirada do coração, a pele foi dissecada e fixada em paraformaldeído 4% e fixador Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de Sódio, pH 7,2) para análise da morfologia geral. Os fragmentos de pele foram cuidadosamente distendidos em um papel de filtro dentro da placa de Petri com os fixadores, para que a pele não se enrolasse ou deformasse durante a fixação.

Os tecidos foram fixados durante 48h a 4°C e, posteriormente, lavados no tampão do fixador. Após a fixação, fragmentos menores foram extraídos da amostra, desidratados numa série alcóolica de concentrações crescentes (70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) por 15 minutos cada. Após a desidratação, o material permaneceu em historresina de embebição (Leica®) por 24h para ser, então, emblocado em formas próprias para este fim em resina de embebição acrescida de “hardener” (conforme instruções do fabricante). O material emblocado foi seccionado em micrótomo (Leica RM2255) a 2 µm de espessura. Foram preparadas 15 lâminas histológicas do tecido cutâneo de cada grupo experimental. Posteriormente, 4 lâminas pertencentes a

diferentes animais de cada grupo foram separadas para serem coradas com Hematoxilina e Eosina. As lâminas histológicas permanentes contendo os cortes do material foram examinadas e o material fotografado em fotomicroscópio (Leica DM1000)

3.5. Determinação da Função Respiratória

Durante todo o período experimental, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados nos 4 grupos experimentais (CT, GLI, RO e RTR) e foram mantidos aproximadamente constantes, com os seguintes valores: pH 7,0 a 7,5; oxigênio dissolvido 6,5 a 7,3 mg.L⁻¹, dureza 48 a 56 mg.L⁻¹ (como CaCO₃); alcalinidade 40 a 43 mg.L⁻¹ (como CaCO₃); amônia 0,1 mg.L⁻¹; cloreto 42 mg.L⁻¹; condutividade 110 μS.cm¹.

Cada girino foi introduzido em um respirômetro de fluxo constante (Figura 11) e imediatamente transferido para uma câmara experimental, mantida a 25 °C, onde permaneceu pelo período de 12 horas para a recuperação do estresse de manuseio e restabelecimento das condições metabólicas de rotina (Figura 12).

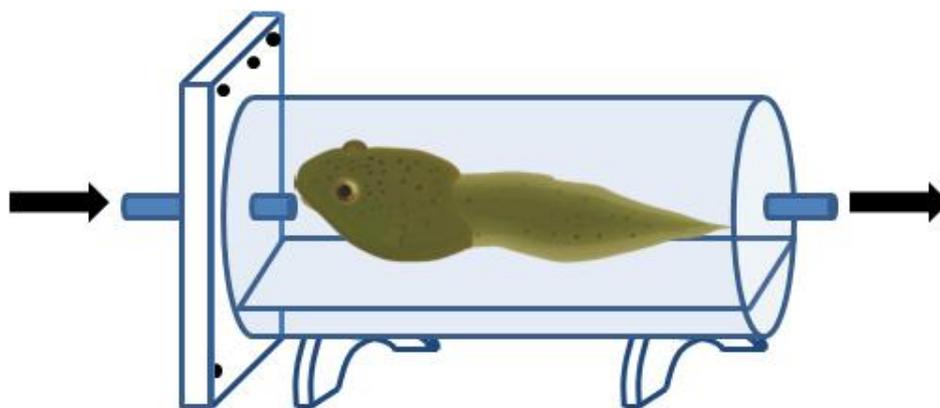


Figura 11 - Esquema do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos *in vivo*. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro.

A determinação dos parâmetros respiratórios foi realizada em normóxia (140 mmHg) e nas tensões de O₂ (PO₂) hipóxicas de 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg, obtidas borbulhando-se quantidades controladas de N₂ e ar comprimido no interior da

câmara experimental. A temperatura experimental foi mantida constante ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Após a estabilização, cada PO_2 foi mantida por 40 minutos antes de cada medição de consumo de O_2 .

As tensões de O_2 (mmHg) da água de entrada (P_{inO_2} - mmHg) e de saída (P_{outO_2} - mmHg) do respirômetro foram continuamente monitoradas por meio de um analisador de O_2 (FAC-204A, FAC, São Carlos, SP). A tomada de O_2 total ($\dot{V}\text{O}_2$) em cada uma das tensões de O_2 experimentais foi determinada por meio da equação proposta por Hughes *et al.* (1983):

$$\dot{V}\text{O}_2 = [(P_{\text{inO}_2} - P_{\text{outO}_2}) \cdot \alpha_{\text{O}_2} \cdot V_R] \cdot Wt^{-1}, \text{ onde:}$$

α_{O_2} é o coeficiente de solubilidade do O_2 na água ($\text{mlO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$), V_R é o fluxo de água através do respirômetro ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$) e Wt é o peso fresco do animal (Kg). Os valores de $\dot{V}\text{O}_2$ assim obtidos foram expressos em $\text{mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. O α_{O_2} foi calculado no início de cada experimento a partir da temperatura e pressão barométrica diárias. O V_R foi padronizado experimentalmente em $20 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, fluxo que, além de permitir a completa renovação de água no interior do respirômetro dentro de 7 minutos, também permitiu o registro adequado da $\dot{V}\text{O}_2$ e, segundo observações experimentais, não provocou deformações no espiráculo dos animais.

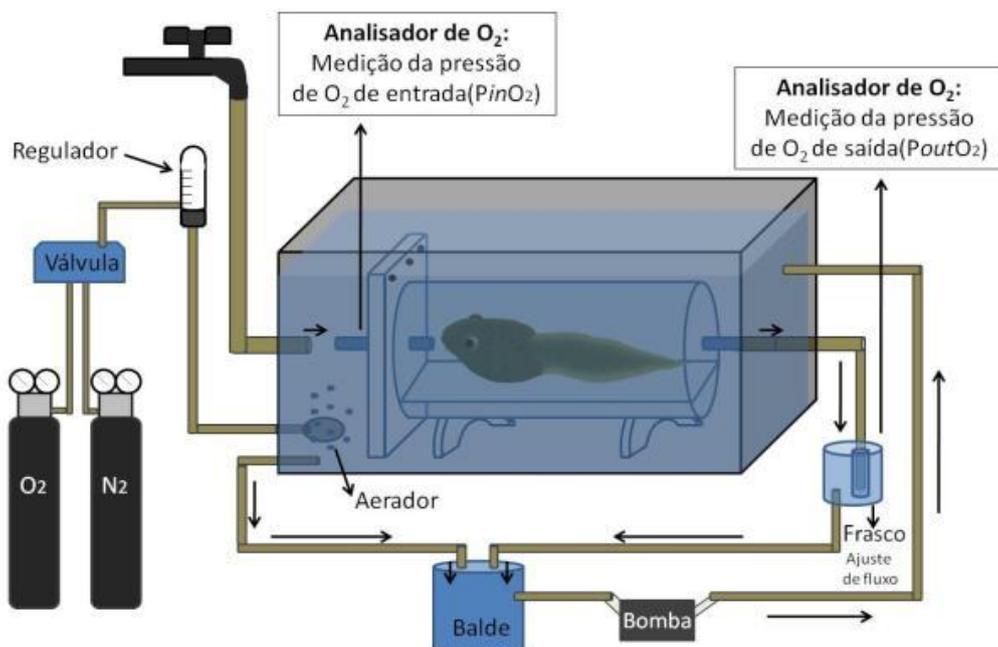


Figura 12 - Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos *in vivo*.

3.6. Estudo da Função Cardíaca

3.6.1. Determinação da frequência cardíaca “*in vivo*”

Após o período de exposição, cada indivíduo foi sacrificado por concussão cefálica segundo as normas de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMS, 2001), que consiste na realização de uma fratura crânio-cervical. A seguir, foi feita uma incisão na região ventral do animal no sentido craniocaudal para a exposição do pericárdio e a contagem visual dos batimentos cardíacos para a determinação da frequência cardíaca (f_H - bpm). Este método de determinação da f_H mostra-se adequado por fornecer a frequência cardíaca basal, sem a interferência de possíveis efeitos β -adrenérgicos oriundos do estresse imposto pela implantação transcutânea de eletrodos de ECG (WASSERSUG *et al.*, 1981; BURGGREN *et al.*, 1983, FEDER, 1983).

3.6.2 Estudo da função cardíaca “*in vitro*”

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com a metodologia desenvolvida por Costa *et al.* (2008). O coração foi retirado e imerso em solução fisiológica gelada própria para anfíbios, previamente borbulhada com uma mistura carbogênica (98% O₂ e 2 % CO₂), com a seguinte composição (mM) 115 NaCl, 5 KCl, 30 NaHCO₃, 0,94 MgSO₄, 2,5 CaCl₂, e 5 glicose.

Para registro da contração isométrica, cada tira foi preparada com um ventrículo inteiro. Duas espirais metálicas de 5,7 mm (argolas split ring, Fishtex) foram presas nas extremidades do ventrículo, sendo que uma das espirais foi previamente fixada a uma haste metálica (0,05 mm de diâmetro e 14 cm de comprimento), enquanto que a outra permaneceu livre. A seguir, as tiras foram transferidas para cubetas de 20 mL, termostatizadas à 25 °C e já contendo solução fisiológica própria para anfíbios, borbulhada com a mistura carbogênica descrita anteriormente (pH de ~7.4 a 25 °C). A representação dos componentes citados acima consta na Figura 13.

Em seguida as tiras ventriculares foram suspensas pela haste metálica, a qual foi fixada a um transdutor de força LETICA (Letica Corporation, USA), previamente conectado a um amplificador AECAD 04 (AVS, Solução Integrada Ltda., Brasil) (Figura 9), e a um sistema de aquisição e tratamento de dados ANCAD (AVS, Solução Integrada, Ltda, Brasil). A espiral metálica da outra extremidade da tira foi fixada a um gancho presente no interior da cubeta. Também no interior da cubeta, dois eletrodos de platina conectados a um estimulador AVS 100C4 (Solução Integrada Ltda., Brasil) geraram pulsos elétricos quadrados com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior ao limiar de contração, com o intuito de garantir uma estimulação máxima ao longo de todo o experimento. As preparações foram estiradas até a obtenção de uma relação constante entre o comprimento da preparação e a força de contração desenvolvida. Este

pequeno estiramento é feito numa tentativa de diminuir o impacto da orientação celular indefinida da preparação (GESSER, 1996). Por fim, as preparações foram estabilizadas por um período mínimo de 40 min à frequência de estimulação de 0,2 Hz (12 bpm) antes da realização dos diferentes protocolos experimentais.

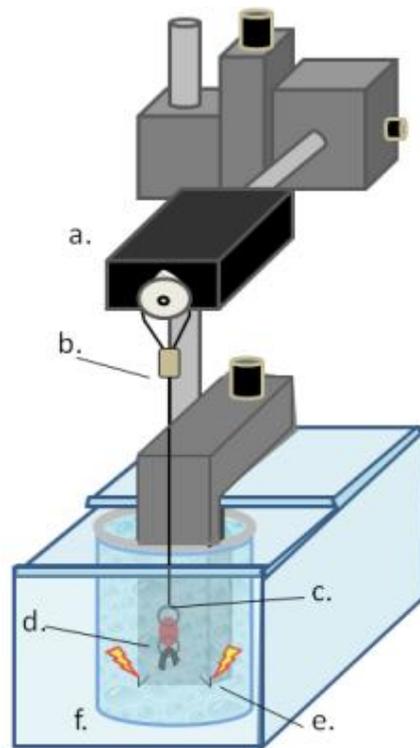


Figura 13 - Esquema representando o equipamento de geração e registro de contrações isométricas. a.) transdutor de força (b.) acoplado a uma das extremidades da preparação. (c.) Outra extremidade da preparação presa ao gancho imerso em (d.) solução fisiológica. (e.) O eletrodo de platina responsável pela transmissão dos impulsos elétricos para a solução presente no interior da (f.) cubeta.



Figura 14 - Método de encaixe das tiras ventriculares entre o transdutor de força e o eletrodo de platina. Notar: 1- Transdutor de força; 2- Cubeta de 20 mL; 3- Amplificador.

3.6.3 Protocolos Experimentais

Os protocolos descritos a seguir foram aplicados aos grupos experimentais GLI, RO e RTR, bem como seus respectivos grupos CT.

Protocolo 1. Após o período de estabilização, a força de contração ($F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$), o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) e o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares foram registrados ininterruptamente por um período de 40 min à frequência de estimulação subfisiológica de 0,2 Hz. Utilizando tal protocolo, pode-se avaliar a possível ocorrência de deterioração da força de contração isométrica no decorrer do período experimental a qual, se presente, implicaria na necessidade de uma correção dos valores de força obtidos nos demais protocolos;

Protocolo 2. A frequência de estimulação foi elevada a partir de 0,2 Hz até a frequência na qual as tiras ventriculares não fossem mais capazes de se contrair regularmente. A frequência máxima de estimulação obtida para cada grupo experimental foi considerada aquela na qual pelo menos 80% das tiras foram capazes de se contrair regularmente. Em toda a faixa de frequências utilizadas, foram feitas análises da F_c , TPT, THR, bem como

de possíveis variações da tensão de repouso (RT - % Fc a 0,2 Hz). Ademais, a fim de se obter uma perspectiva mais integrativa dos possíveis efeitos dos herbicidas sobre a função cardíaca dos girinos de rã-touro, a capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$), produto entre a frequência de estimulação e a força de contração (MATIKAINEN & VORNANEN, 1992), foi calculada. O mesmo protocolo foi repetido após a adição de uma concentração aguda (10^{-6} M) de adrenalina a fim de verificar se a estimulação β -adrenérgica compensaria uma possível deterioração de força promovida pelos herbicidas.

3.7. Forma de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram expressos em média \pm 1 erro padrão da média (E.P.M.) e representados da seguinte forma:

- Nível de Atividade: porcentagem de animais ativos em relação ao número total de animais (% n);
- Secções histológicas: avaliadas qualitativa e comparativamente segundo a presença de alterações ou danos teciduais.
- Taxa metabólica ($\dot{V}O_2$): consumo de O_2 por Kg de peso corpóreo por hora ($\text{mLO}_2\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
- Frequência Cardíaca (f_H): batimentos por minuto (bpm);
- Massa Ventricular Relativa (RVM): expressa como porcentagem da massa corpórea (RVM - % of Wb);

- Força de Contração (Fc) expressa em $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$; Tempo para Pico de Tensão (TPT) expresso em milissegundos e Tempo para 50% do relaxamento (THR) expresso em milissegundos.

3.8. Procedimentos Estatísticos

Os parâmetros quantitativos foram analisados por ANOVA, após teste de Bartlett para homogeneidade de variância. Os testes T unipareado, para comparação entre grupos isoladamente, e Dunnett, para comparação entre múltiplos grupos, foram realizados para comparações entre as médias dos diferentes grupos experimentais com o controle (GraphPad InStat version 3.00, GraphPad Software, USA).

Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Exposição ao Glifosato

4.1.1. Nível de Atividade, Massa Ventricular Relativa e Frequência Cardíaca

Os valores médios do nível de atividade (NA - % do total de indivíduos), ventricular relativa (MRV - % massa corpórea) e (f_H - bpm) dos girinos de rã-touro, *L. catesbeianus*, são apresentados na Tabela 1.

Os valores de NA do grupo exposto à 1ppm de Glifosato (GLI; n = 30) foram significativamente superiores ($P < 0,05$) aos do grupo Controle (CT_{GLI} ; n = 30). Apesar disso, a f_H mensurada após concussão cefálica dos girinos não variou significativamente entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Ademais, a MRV do grupo GLI foi significativamente inferior a apresentada pelo grupo CT_{GLI} ($P < 0,05$).

Tabela 1- Valores de nível de atividade (NA, n=30), massa ventricular relativa (MVR, n=6) e frequência cardíaca (f_H , n=30) do grupo Controle (CT_{GLI}) e do grupo exposto ao Glifosato (GLI) por 96 horas. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os valores em negrito denotam diferença estatística entre o mesmo parâmetro dos diferentes grupos experimentais ($P < 0,05$).

CONTROLE		
NA (%)	MVR (%)	f_H (bpm)
37\pm 5,5	0,08\pm 0,01	81,3 \pm 1,3
GLIFOSATO		
NA (%)	MVR (%)	f_H (bpm)
53\pm 8	0,04\pm 0,01	85,7 \pm 2

4.1.2. Respostas In Vitro

4.1.2.1. Força de Contração e Dinâmica Cardíaca em “Steady-State”

Os valores médios da força de contração (F_c - % dos valores inicialmente observados após a estabilização) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) apresentados pelas tiras ventriculares dos girinos de rã-touro do grupo CT (valores médios

± 1 E.P.M.; $n = 16$) e do grupo GLI (valores médios ± 1 E.P.M.; $n = 16$) após 40 min de estimulação ininterrupta à frequência de 0,2 Hz na temperatura de 25 °C são apresentados na Tabela 2 e representados graficamente na Figura 15.

A análise estatística dos resultados indica que não houve uma deterioração da força ao longo de todo o período experimental (40 min) para nenhum dos 2 grupos experimentais ($P > 0,05$), tampouco alteração nos valores de TPT e THR no período em questão (figura 10). Além disso, não houve diferença estatística entre os valores observados para os diferentes grupos experimentais para nenhum dos parâmetros analisados, considerando-se os mesmos períodos de exposição.

Tabela 2 – Valores de força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares ($n = 16$) de girinos de rã-touro no grupo controle (CT_{GLI}; $n = 16$) e exposto por 96 horas ao Glifosato (GLI; $n = 16$) na temperatura de 25 °C durante 40 min de estimulação ininterrupta a 0,2 Hz. Valores médios ± 1 E.P.M.

Tempo (min)	CONTROLE		
	Fc (mN.mm ⁻²)	TPT (ms)	THR (ms)
0	1,5 \pm 0,3	433 \pm 13	268 \pm 23
10	1,3 \pm 0,3	437 \pm 18	236 \pm 11
20	1,3 \pm 0,3	428 \pm 17	227 \pm 11
30	1,3 \pm 0,25	410 \pm 17	232 \pm 10
40	1,2 \pm 0,23	417 \pm 22	230 \pm 12
Tempo (min)	GLIFOSATO		
	Fc (mN.mm ⁻²)	TPT (ms)	THR (ms)
0	1,3 \pm 0,26	412 \pm 17	205 \pm 13
10	1,2 \pm 0,22	413 \pm 17	215 \pm 13
20	1,2 \pm 0,19	422 \pm 14	215 \pm 9
30	1,3 \pm 0,2	455 \pm 13	234 \pm 9
40	1,2 \pm 0,19	451 \pm 17	239 \pm 11

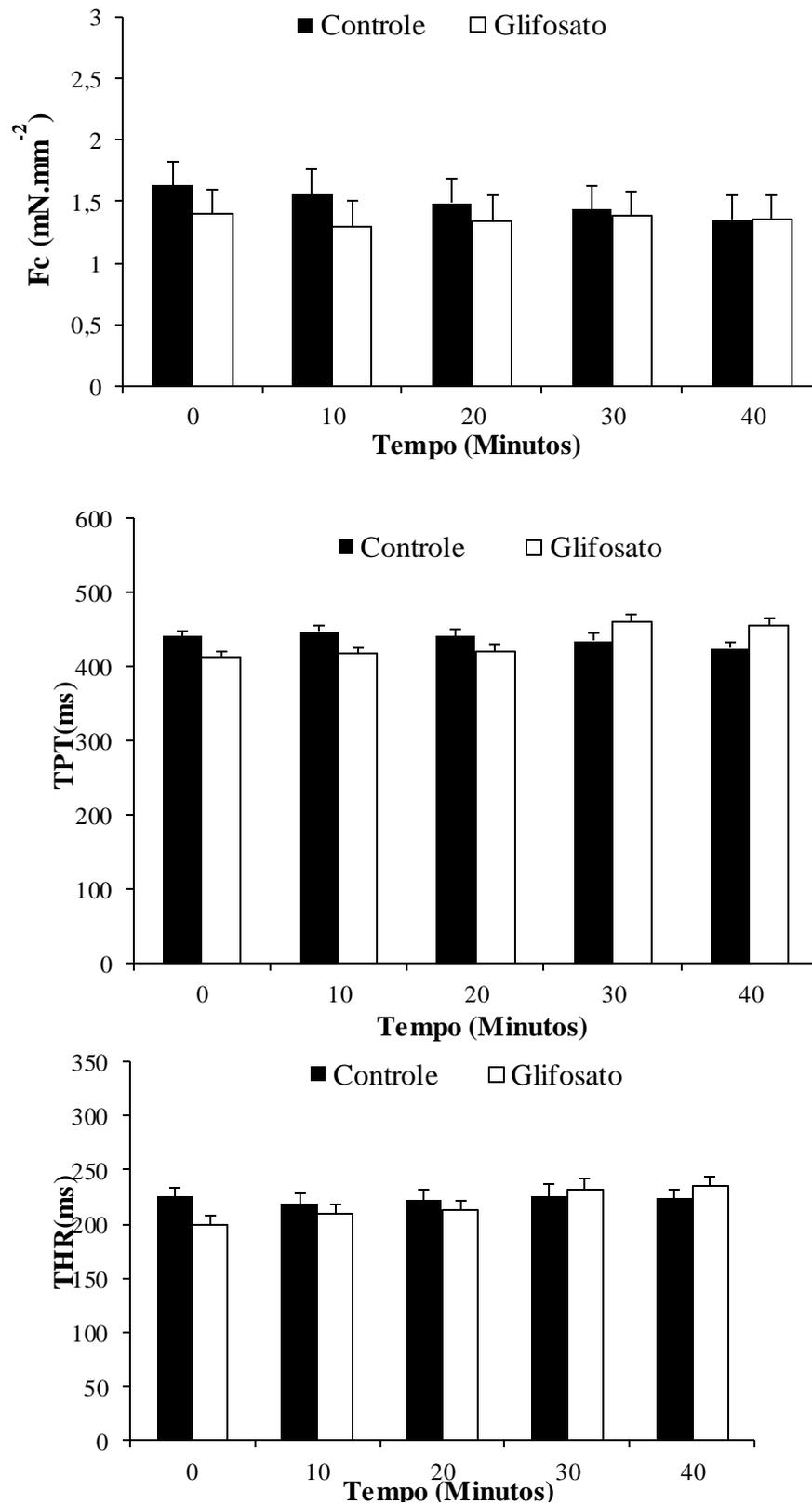


Figura 15 - Efeito do tempo de experimentação (40 min) sobre a força de contração (Fc – mN . mm⁻²), tempo para o pico de força (TPT – ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares (n = 16) dos grupos **Controle** e **Glifosato** na temperatura de 25 °C. As barras verticais representam os valores médios + 1 E.P.M.

4.1.2.2 Efeito de Aumentos da Frequência de Estimulação

Nos protocolos que se seguem foi verificado o efeito de incrementos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre a força de contração ($F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$) desenvolvida pelas tiras ventriculares ($n = 16$) de girinos de rã-touro do **Grupo Controle** e do **Grupo Exposto ao Glifosato** em 2 tratamentos (sem adição de adrenalina e em resposta à concentração de 10^{-6} M de Adrenalina).

Os valores médios da força de contração ($F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$) e da capacidade de bombeamento cardíaco ($\text{CBC} - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidas pelas tiras ventriculares dos girinos de rã-touro do grupo **Controle** e do grupo **Glifosato** ($n = 16$) frente a incrementos da frequência de estimulação (Hz) estão apresentados na Tabela 3, onde são comparados em relação aos valores iniciais (0,2 Hz) e também entre os diferentes protocolos (sem adição adrenalina - 0 Adr; após a adição de 10^{-6} M de adrenalina) numa mesma frequência de estimulação. Na Figura 16 pode-se observar a representação gráfica dos valores médios de F_c em ambos os protocolos (sem adrenalina e com a adição de 10^{-6} M de adrenalina). Da mesma forma, na Figura 17, são apresentados os valores médios de CBC para os diferentes protocolos. Os valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) constam na Tabela 4 e a representação gráfica destes parâmetros consta, respectivamente, nas Figuras 18, 19 e 20.

Tabela 3 – Valores da força de contração (Fc – mN/mm²) e da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mN . mm⁻² . min⁻¹) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Glifosato) e daqueles expostos ao Glifosato por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina – 10⁻⁶ M). Valores médios ± 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa (P < 0,05) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz). Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística (P < 0,05) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Glifosato) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio.

f _{EST}	Zero Adrenalina			
	Controle		Glifosato	
	Fc	CBC	Fc	CBC
0,2	1,2 ±0,2	0,3 ±0,04	1,3 ±0,15	0,3 ±0,05
0,4	1,2 ±0,2	0,5 ±0,1 ¹	1,3 ±0,16	0,5 ±0,1 ¹
0,6	1,3 ±0,2	0,8 ±0,1 ¹	1,4 ±0,2	0,8 ±0,1 ¹
0,8	1,3 ±0,2	1,1 ±0,2 ¹	1,5 ±0,2	1,1 ±0,2 ¹
1	1,4 ±0,2	1,4 ±0,2 ¹	1,4 ±0,2	1,4 ±0,2 ¹
1,2	1,4 ±0,3	1,7 ±0,3 ¹	1,4 ±0,2	1,7 ±0,3 ¹
1,4	1,4 ±0,2	2,0 ±0,4 ¹	1,4 ±0,2	1,9 ±0,4 ¹
1,6	1,3 ±0,2	2,0 ±0,4 ¹	1,2 ±0,2	2,0 ±0,4 ¹
1,8	1,3 ±0,3	2,4 ±0,5 ¹	1,0 ±0,2	2,4 ±0,5 ¹
2	1,2 ±0,3	2,5 ±0,6 ¹	0,7 ±0,02	2,5 ±0,6 ¹
f _{EST}	Adrenalina (10 ⁻⁶ M)			
	Controle		Glifosato	
	Fc	CBC	Fc	CBC
0,2	1,4 ±0,3	0,2 ±0,05	1,4 ±0,2	0,3 ±0,04
0,4	1,5 ±0,3	0,5 ±0,1 ¹	1,4 ±0,2	0,6 ±0,1 ¹
0,6	1,5 ±0,3	0,7 ±0,2 ¹	1,5 ±0,2	0,9 ±0,2 ¹
0,8	1,5 ±0,3	1,0 ±0,2 ¹	1,5 ±0,2	1,2 ±0,2 ¹
1	1,5 ±0,3	1,2 ±0,2 ¹	1,5 ±0,2	1,5 ±0,3 ¹
1,2	1,6 ±0,4	1,5 ±0,3 ¹	1,4 ±0,2	1,7 ±0,4 ¹
1,4	1,3 ±0,3	1,7 ±0,4 ¹	1,3 ±0,2	2,0 ±0,4 ¹
1,6	1,2 ±0,2	1,7 ±0,4 ¹	1,2 ±0,2	2,0 ±0,4 ¹
1,8	1,1 ±0,3	1,8 ±0,4 ¹	1,0 ±0,2	2,0 ±0,4 ¹
2	0,8 ±0,3	1,8 ±0,6 ¹	0,6 ±0,09	1,3 ±0,2 ¹

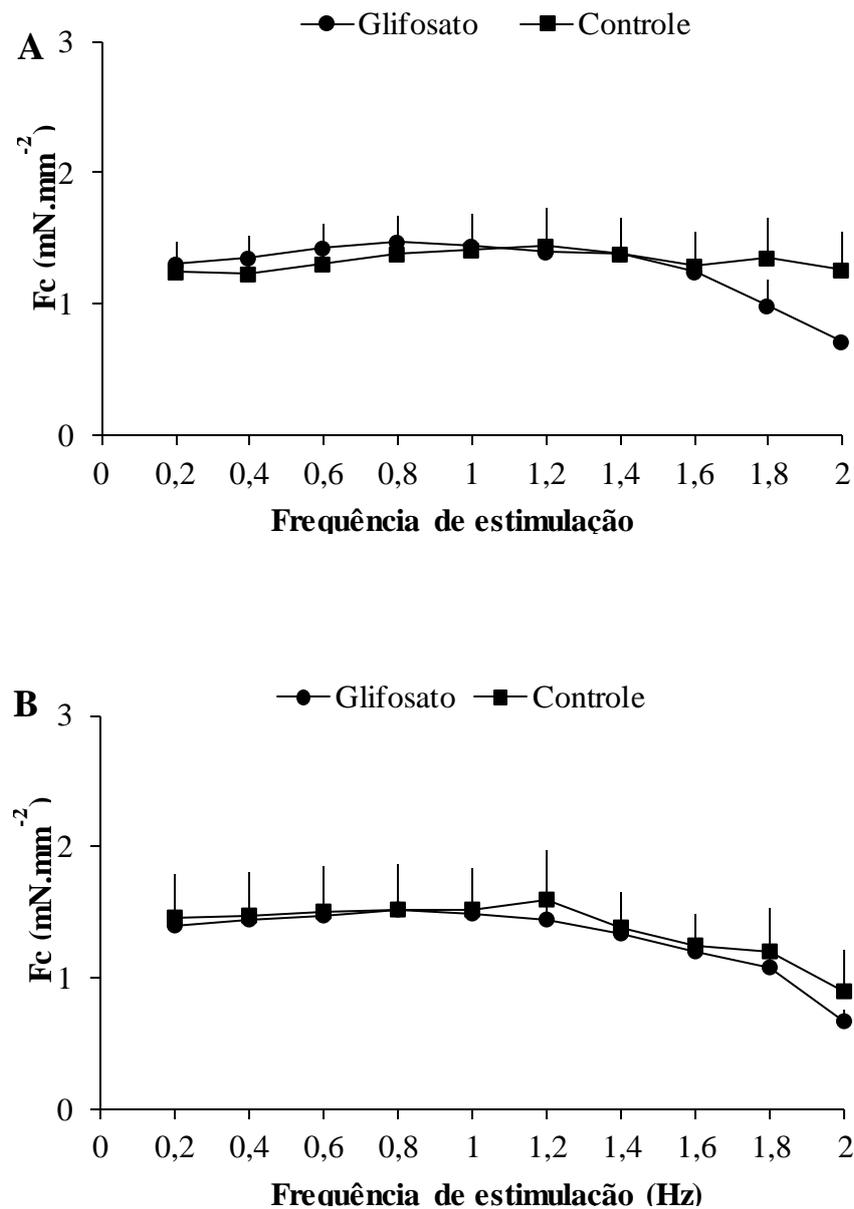


Figura 16 - Valores da força de contração (F_c – mN/mm²) desenvolvidas pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver tabela 3.

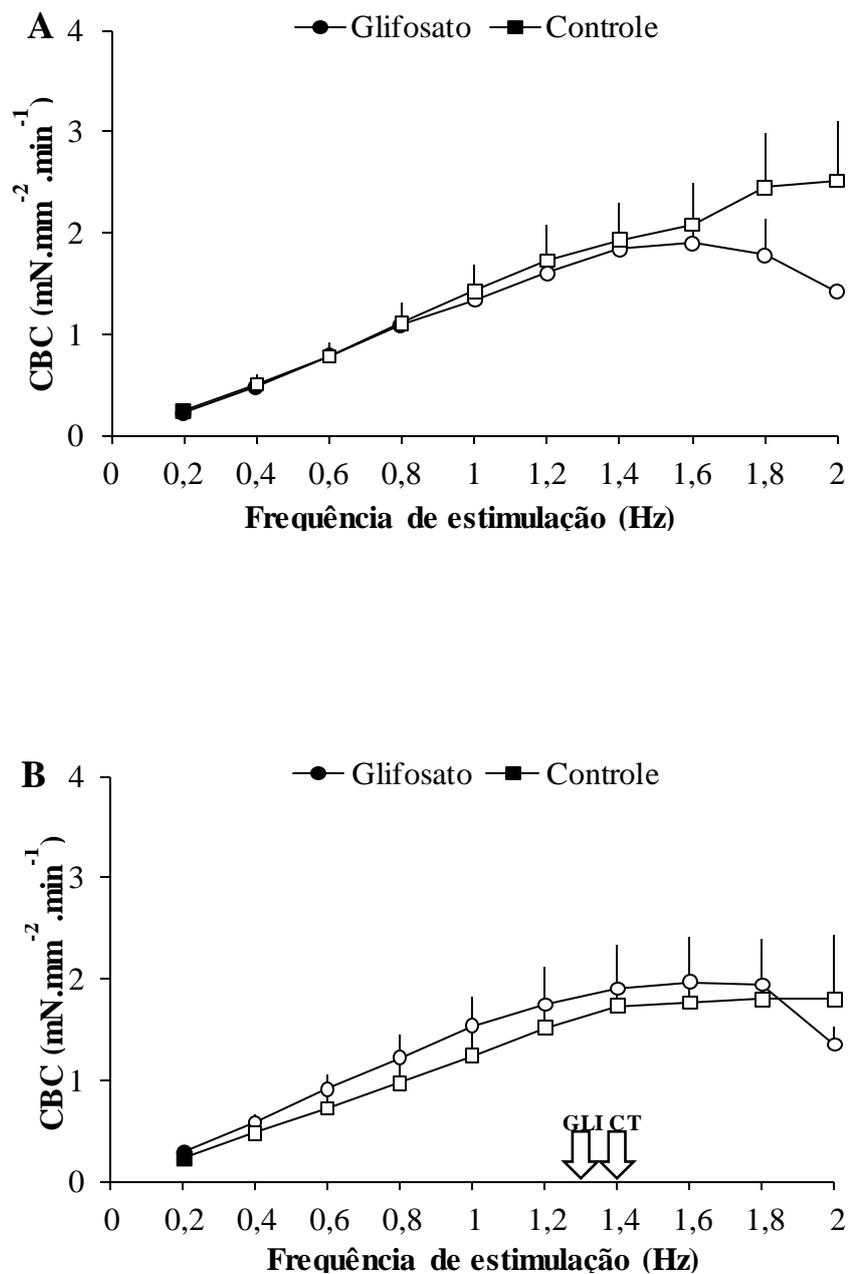


Figura 17 - Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos **Controle** e grupo exposto ao **Glifosato** por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M.

Tabela 4 – Valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Glifosato) e daqueles expostos ao Glifosato por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina - 10^{-6} M). Valores médios \pm 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para os parâmetros TPT ou THR. Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Glifosato) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio.

f_{EST}	Zero Adrenalina					
	Controle			Glifosato		
	TPT	THR	RT	TPT	THR	RT
0,2	397 \pm 17	211 \pm 9	0	440 \pm 27	238 \pm 13	0
0,4	413 \pm 21	118 \pm 14	1,7 \pm 0,0	424 \pm 27	229 \pm 10	3,2 \pm 1
0,6	374 \pm 17	212 \pm 11	1,6 \pm 0,5	415 \pm 27	220 \pm 10	3,8 \pm 1,5
0,8	351 \pm 17 ¹	217 \pm 8 ¹	3,1 \pm 0,5	400 \pm 27 ¹	216 \pm 7 ¹	3 \pm 1,3
1	321 \pm 12 ¹	196 \pm 6 ¹	2,3 \pm 0,5	340 \pm 15 ¹	195 \pm 5 ¹	5 \pm 1,6
1,2	302 \pm 12 ¹	181 \pm 7 ¹	3,2 \pm 1,1	317 \pm 9 ¹	170 \pm 7 ¹	5,6 \pm 2,3
1,4	268 \pm 10 ¹	166 \pm 7 ¹	5 \pm 1,6	287 \pm 7 ¹	169 \pm 4 ¹	5,1 \pm 2,5
1,6	236 \pm 10 ¹	162 \pm 5 ¹	6,6 \pm 1,2	261 \pm 11 ¹	152 \pm 5 ¹	5,6 \pm 2,5
1,8	220 \pm 10 ¹	144 \pm 7 ¹	13 \pm 6	263 \pm 31 ¹	142 \pm 3 ¹	13 \pm 3,8
2	222 \pm 25 ¹	136 \pm 6 ¹	23 \pm 8,7	267 \pm 37 ¹	145 \pm 7 ¹	13 \pm 2,8
f_{EST}	Adrenalina (10^{-6} M)					
	Controle			Glifosato		
	TPT	THR	RT	TPT	THR	RT
0,2	450 \pm 30	225 \pm 11	0	450 \pm 30	222 \pm 10	0
0,4	416 \pm 28	224 \pm 13	3 \pm 2,2	419 \pm 28	224 \pm 8	0,4 \pm 2,6
0,6	386 \pm 27	218 \pm 10	3,6 \pm 1,3	386 \pm 27	215 \pm 13	9,3 \pm 1,7
0,8	363 \pm 13 ¹	202 \pm 10 ¹	4,2 \pm 2,5	363 \pm 13	193 \pm 7 ¹	4,4 \pm 1,1
1	350 \pm 14 ¹	182 \pm 7,3 ¹	2,9 \pm 1,2	350 \pm 14	189 \pm 6 ¹	5,3 \pm 1,6
1,2	303 \pm 10 ¹	175 \pm 8,2 ¹	3,4 \pm 1,5	303 \pm 10	171 \pm 3 ¹	7,7 \pm 1,8
1,4	264 \pm 7 ¹	162 \pm 6,5 ¹	4,4 \pm 1,1	264 \pm 7,5	164 \pm 7 ¹	10 \pm 2,4
1,6	247 \pm 4 ¹	142 \pm 6,5 ¹	5,2 \pm 1,9	247 \pm 5	145 \pm 5 ¹	9,4 \pm 3
1,8	220 \pm 5 ¹	143 \pm 5,9 ¹	6,1 \pm 2,9	220 \pm 5	135 \pm 5 ¹	9,3 \pm 2
2	234 \pm 22 ¹	140 \pm 9 ¹	9,3 \pm 0,4	234 \pm 22	144 \pm 11 ¹	7,4 \pm 0,8

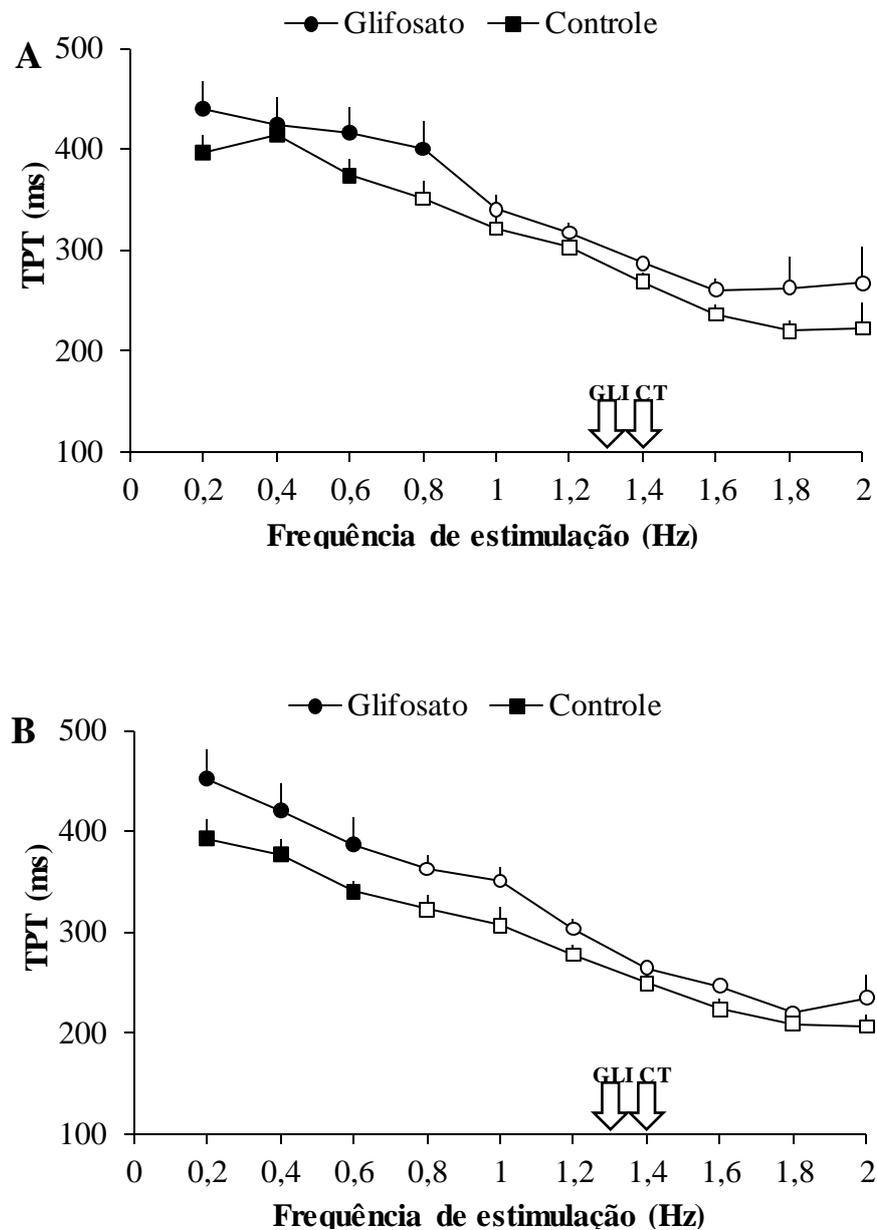


Figura 18 - Valores dos tempos para o pico de tensão (TPT – ms), das tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (∇) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de $Fc \pm 1$ E.P.M.

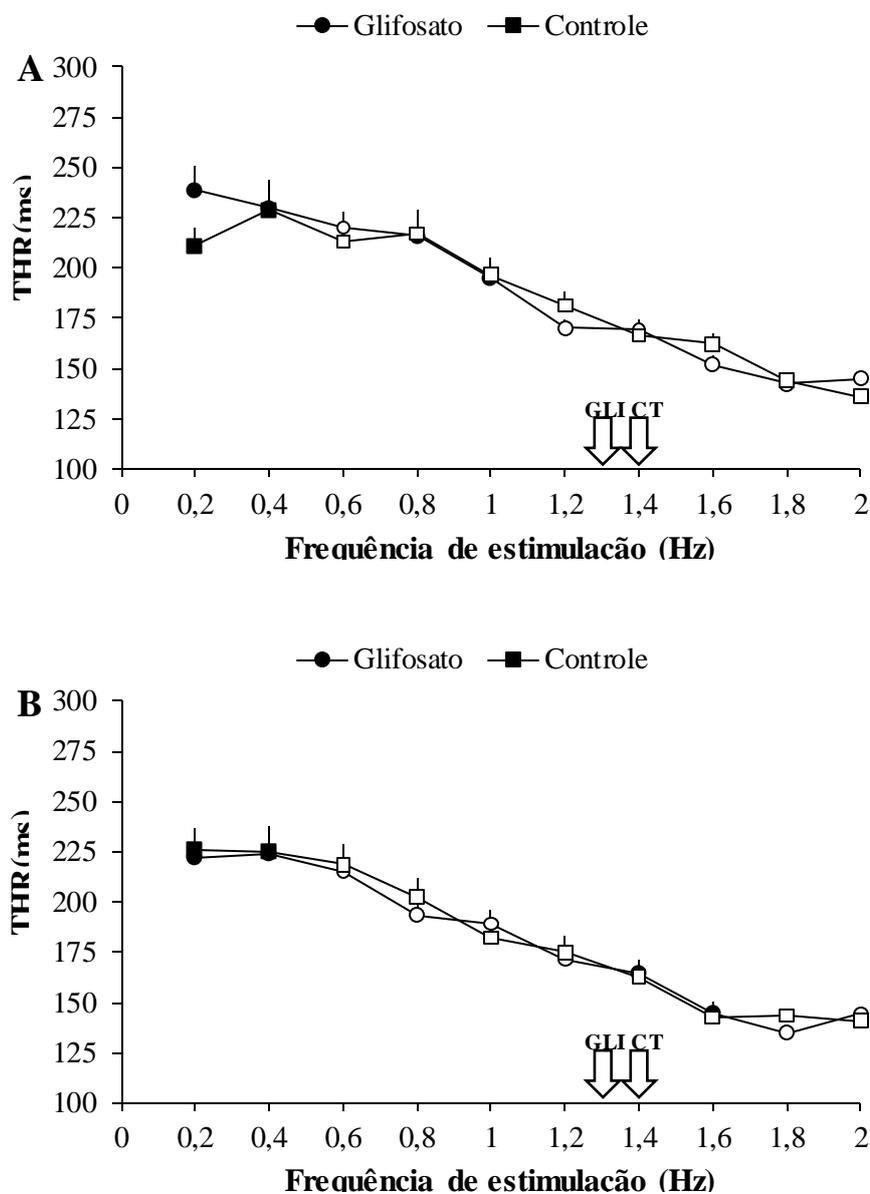


Figura 19 - Valores dos tempos para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares, n = 16) dos grupos Controle e grupo exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na freqüência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as freqüências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de $Fc \pm 1$ E.P.M.

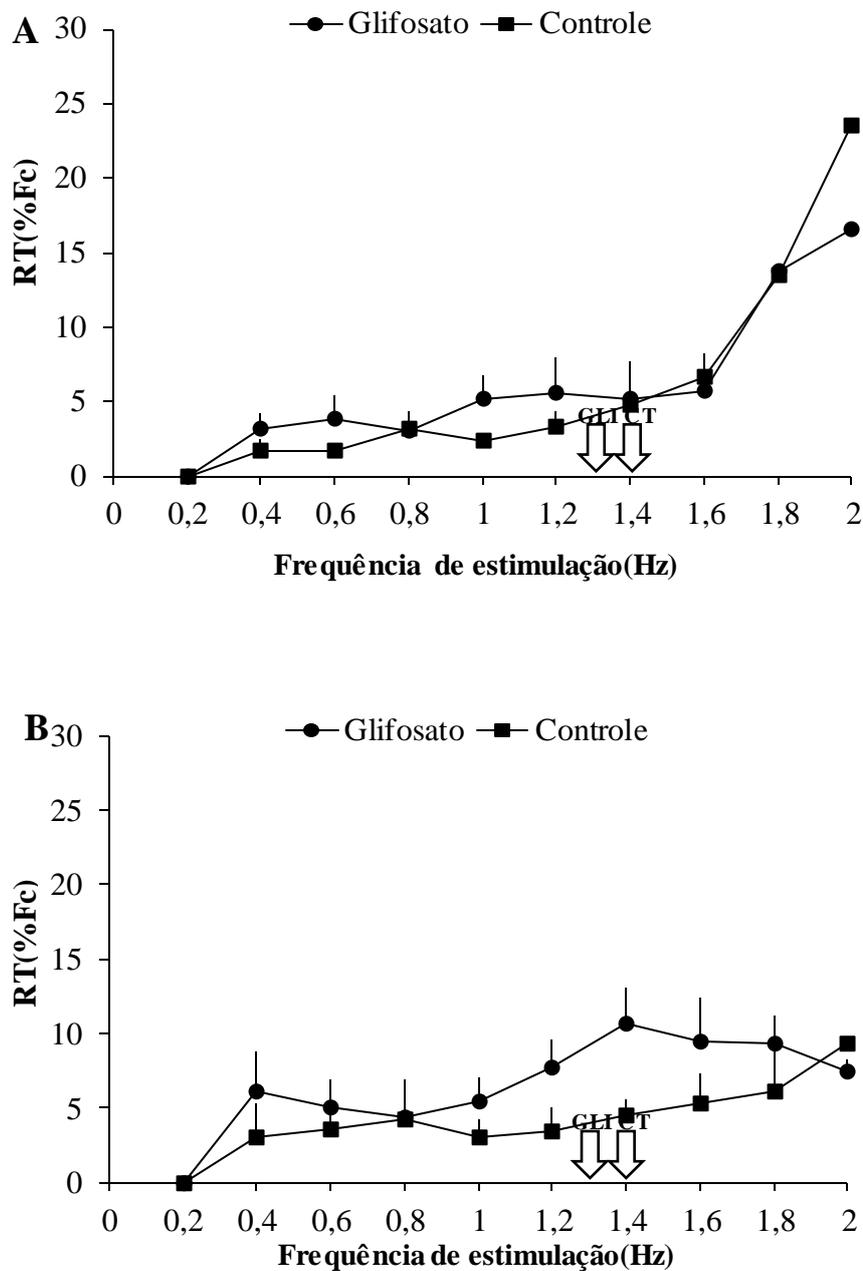


Figura 20 - Valores dos tempos para tensão de repouso (RT - % da Fc desenvolvida a 0,2 Hz) das tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e grupo exposto ao Glifosato por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{GLI}) e Glifosato (GLI). Cada ponto representa o valor médio de Fc \pm 1 E.P.M.

4.2. Exposição ao Roundup Original®

4.2.1. Nível de Atividade, Massa Ventricular Relativa Frequência Cardíaca

Os valores médios do nível de atividade (NA - % do total de indivíduos), ventricular relativa (MRV - % massa corpórea) e (f_H - bpm) dos girinos de rã-touro, *L. catesbeianus*, são apresentados na Tabela 5.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os valores de NA dos grupos RO ($n = 30$) e CT_{RO} ($n = 30$). A f_H mensurada após concussão cefálica dos girinos não variou significativamente entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Ademais, a MRV do grupo RO não diferiu significativamente da apresentada pelo grupo CT_{RO} ($P > 0,05$).

Tabela 5 - Valores de nível de atividade (NA, $n=30$), massa ventricular relativa (MVR, $n=6$) e frequência cardíaca ($f_H, n=30$) do grupo Controle (CT_{RO}) e do grupo exposto ao Roundup Original® (RO) por 96 horas. Valores médios ± 1 E.P.M.

CONTROLE		
NA (%)	MVR (%)	f_H (bpm)
45,7 \pm 3,4	0,09 \pm 0,05	75,3 \pm 1,3
ROUNDUP ORIGINAL		
NA (%)	MVR (%)	f_H (bpm)
61,7 \pm 7	0,07 \pm 0,01	71,7 \pm 1

4.2.2. Respostas In Vitro

4.2.2.1. Força de Contração e Dinâmica Cardíaca em Steady-State

Os valores médios da força de contração (F_c – % dos valores inicialmente observados após a estabilização) desenvolvida pelas tiras ventriculares dos girinos de rã-touro do grupo **Controle** (CT_{RO} ; $n = 16$) e do grupo exposto ao **Roundup Original**[®] (RO; $n = 16$) após 40 min de estimulação ininterrupta à frequência de 0,2 Hz na temperatura de 25 °C podem ser observados na Tabela 6. A representação gráfica dos valores médios obtidos (F_c , TPT e THR) consta na Figura 21. A análise estatística dos resultados indica que não houve uma deterioração da força ao longo de todo o período experimental (40 min) para nenhum dos 2 grupos experimentais ($P > 0,05$), tampouco alteração significativa nos valores de TPT e THR no período em questão (Figura 21). Ademais, não houve diferença estatística entre os valores observados nos grupos CT_{RO} e RO em nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 6 – Valores de força de contração (F_c), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares ($n = 16$) de girinos de rã-touro no grupo Controle ($n = 16$) e exposto por 96 horas ao Roundup Original ($n = 16$) na temperatura de 25 °C durante 40 min de estimulação ininterrupta a 0,2 Hz. Valores médios ± 1 E.P.M.

Tempo (min)	CONTROLE		
	F_c (mN.mm ⁻²)	TPT (ms)	THR (ms)
0	1,16 \pm 0.2	442 \pm 14	211 \pm 7
10	1,12 \pm 0.2	454 \pm 13	211 \pm 9,3
20	1,0 \pm 0.2	443 \pm 14	225 \pm 10
30	1,0 \pm 0.2	443 \pm 14	231 \pm 11
40	1,0 \pm 0.2	432 \pm 16	225 \pm 7
Tempo (min)	ROUNDUP ORIGINAL		
	F_c (mN.mm ⁻²)	TPT (ms)	THR (ms)
0	1,5 \pm 0.2	441 \pm 17	205 \pm 13
10	1,5 \pm 0.2	428 \pm 17	215 \pm 13
20	1,4 \pm 0.2	442 \pm 14	215 \pm 9
30	1,4 \pm 0.2	434 \pm 13	234 \pm 9
40	1,3 \pm 0.2	427 \pm 17	239 \pm 11

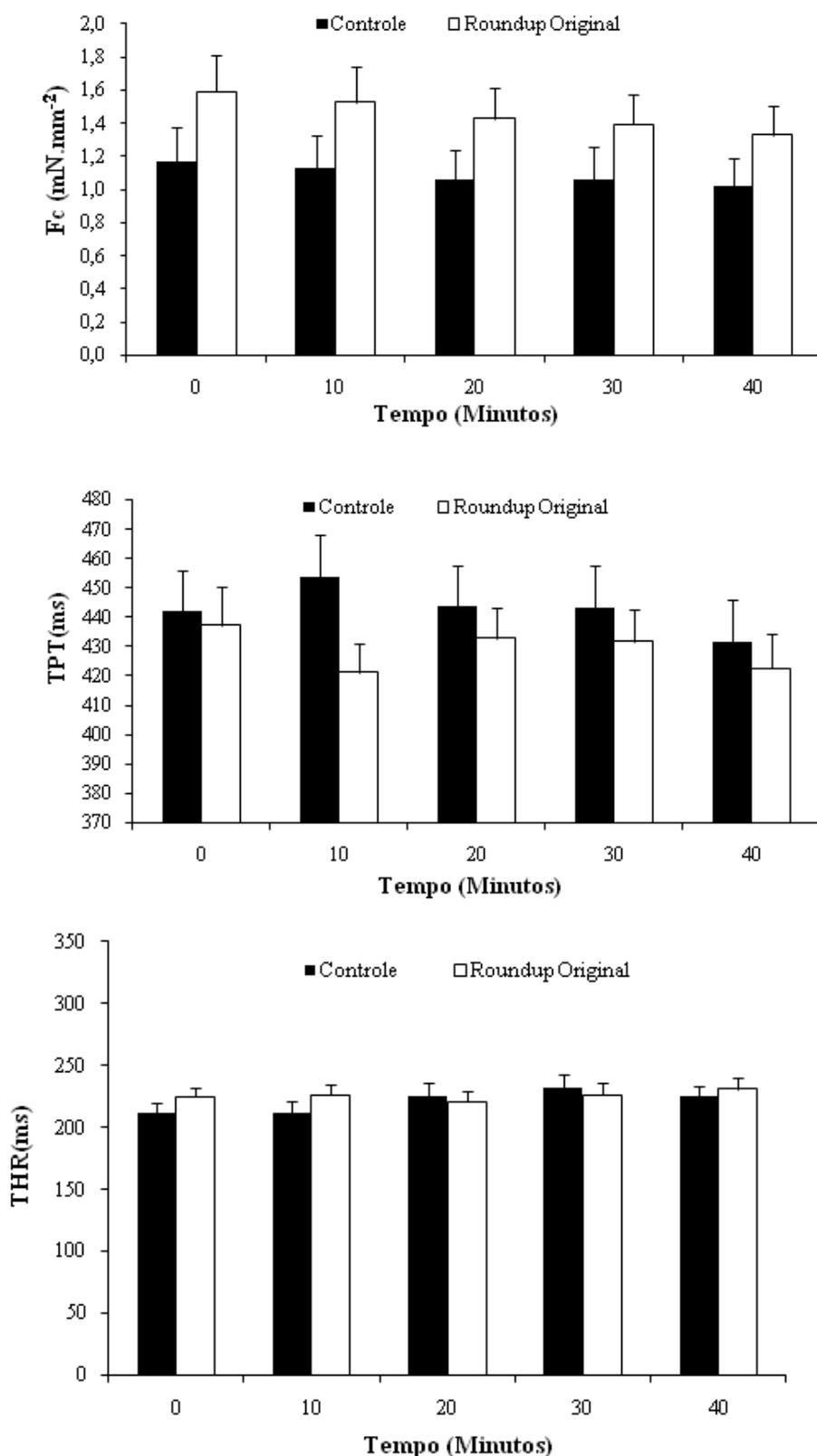


Figura 21 - Efeito do tempo de experimentação (40 min) sobre a força de contração (F_c – $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$), sobre o tempo para o pico de força (TPT – ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos **Controle** e **Roundup Original** na temperatura de 25°C . As barras verticais representam os valores médios + 1 E.P.M.

4.2.2.2 Efeito de Aumentos da Frequência de Estimulação

Nos protocolos que se seguem foi verificado o efeito de incrementos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre a força de contração ($F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$) desenvolvida pelas tiras ventriculares de girinos de rã-touro do **Grupo Controle** (CT_{RO} , $n=16$) e do **Grupo Exposto ao Roundup Original** (RO, $n=16$) em 2 tratamentos (sem adição de adrenalina e em resposta à concentração de 10^{-6} M de Adrenalina).

Os valores médios da força de contração ($F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$) e da capacidade de bombeamento cardíaco ($CBC - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidas pelas tiras ventriculares dos girinos de rã-touro do grupo CT_{RO} e do grupo RO frente a incrementos da frequência de estimulação (Hz) estão apresentados na Tabela 7, onde são comparados em relação aos valores iniciais (0,2 Hz) e também entre os diferentes protocolos (sem adição adrenalina - 0 Adr; sob a exposição da concentração de 10^{-6} M adrenalina) numa mesma frequência de estimulação. Na Figura 22 pode-se observar a representação gráfica dos valores médios de F_c em ambos os protocolos (sem adrenalina e com a adição de 10^{-6} M de adrenalina). Da mesma forma, na Figura 23, são apresentados os valores médios de CBC para os diferentes protocolos. Os valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) constam na Tabela 8 e a representação gráfica destes parâmetros consta, respectivamente, nas figuras 24, 25 e 26.

Tabela 7 – Valores da força de contração (F_c – mN/mm^2) e da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC – $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Original®) e daqueles expostos ao Roundup Original® por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina – 10^{-6} M). Valores médios \pm 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para aquele parâmetro (F_c ou CBC). Os números em negrito indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Roundup Original) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio.

f_{EST}	Zero Adrenalina			
	Controle		Roundup Original	
	F_c	CBC	F_c	CBC
0,2	0,9 \pm 0,1	0,2 \pm 0,03	1,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,03
0,4	1,0 \pm 0,1	0,4 \pm 0,06 ¹	1,6 \pm 0,2	0,7 \pm 0,08 ¹
0,6	1,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1 ¹	1,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1 ¹
0,8	1,0\pm0,1	0,8\pm0,2¹	1,8\pm0,2	1,5\pm0,2¹
1	1,0\pm0,1	1,0\pm0,2¹	1,9\pm0,2	1,9\pm0,2¹
1,2	1,0\pm0,1	1,2\pm0,2¹	1,8\pm0,2	2,2\pm0,2¹
1,4	0,9\pm0,1	1,2\pm0,2¹	1,7\pm0,2	2,4\pm0,2¹
1,6	0,8\pm0,1	1,3\pm0,2¹	1,6\pm0,1	2,3\pm0,3¹
1,8	0,8\pm0,2	1,4\pm0,3¹	1,3\pm0,1	2,4\pm0,3¹
2	I	I	I	I
f_{EST}	Adrenalina (10^{-6} M)			
	Controle		Roundup Original	
	F_c	CBC	F_c	CBC
0,2	1,0 \pm 0,2	0,2 \pm 0,03	1,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1
0,4	1,0 \pm 0,2	0,4 \pm 0,01 ¹	1,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1 ¹
0,6	1,0 \pm 0,2	0,6 \pm 0,02 ¹	1,5 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2 ¹
0,8	1,1 \pm 0,2	0,8 \pm 0,04 ¹	1,5 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2 ¹
1	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,05 ¹	1,5 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3 ¹
1,2	1,0\pm0,1	1,1\pm0,05¹	1,4\pm0,3	1,7\pm0,5¹
1,4	0,9\pm0,1	1,3\pm0,05¹	1,3\pm0,2	2,0\pm0,5¹
1,6	0,8\pm0,1	1,3\pm0,05¹	1,3\pm0,2	2,1\pm0,5¹
1,8	0,7\pm0,1	1,2\pm0,1¹	1,2\pm0,3	2,3\pm0,6¹
2	I	I	I	I

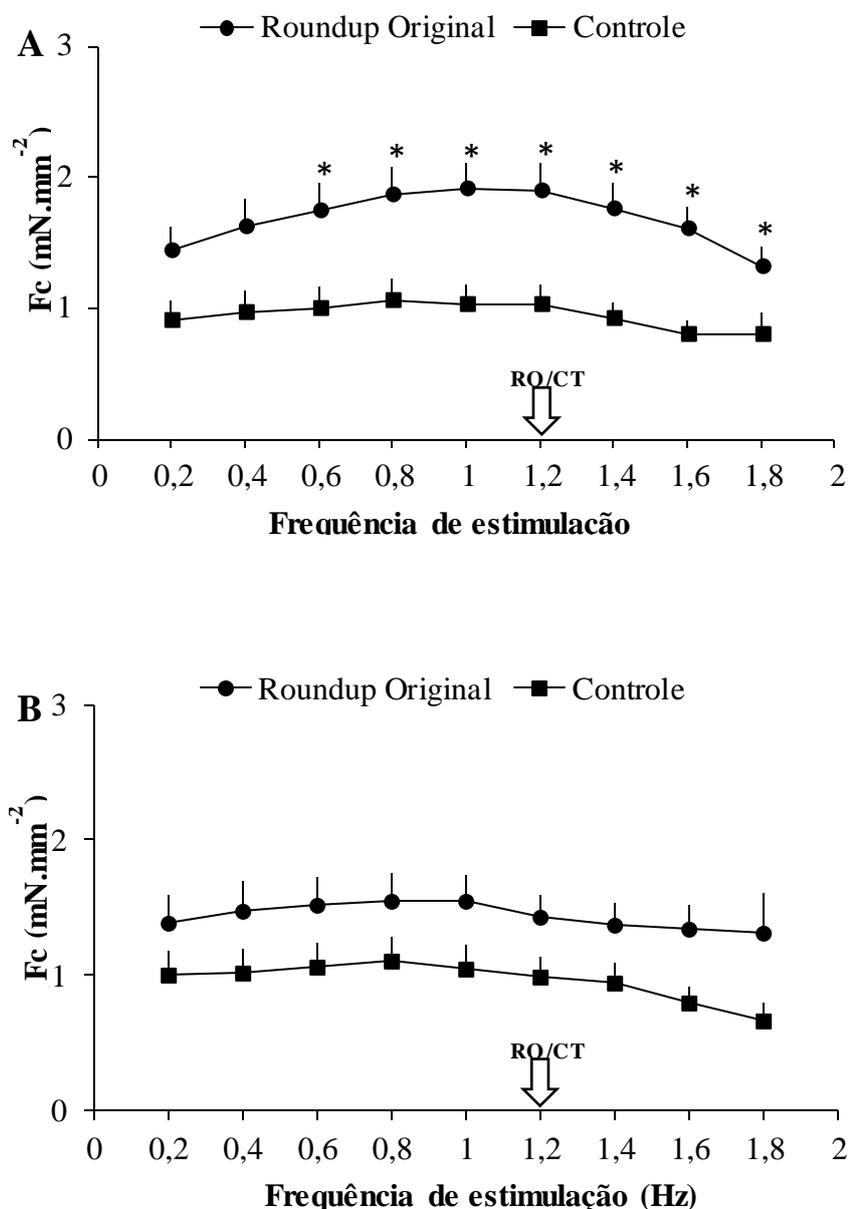


Figura 22 - Valores da força de contração (Fc – mN/mm²) desenvolvidas pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e Roundup Original por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (⇩) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RO} e RO. Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatística entre os grupos CT_{RO} e RO (P < 0,05). Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver Tabela 7.

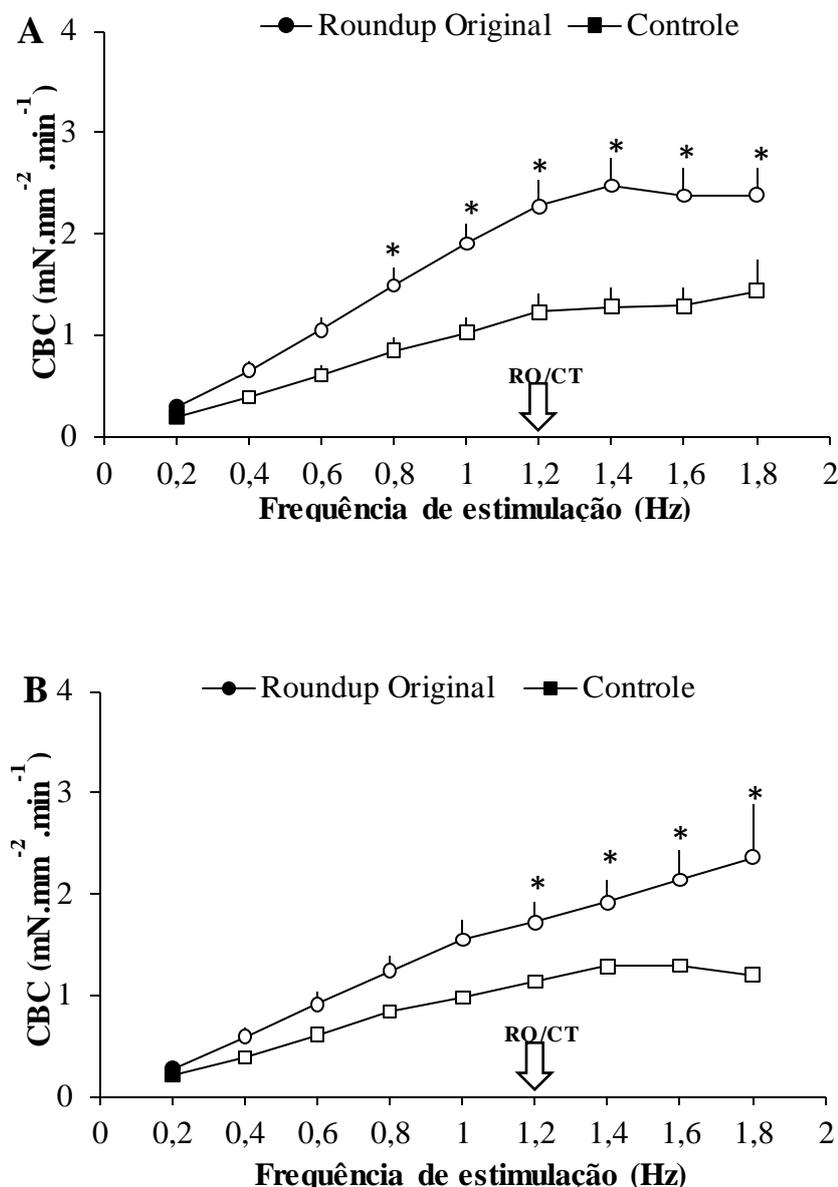


Figura 23 - Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Original® por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RO} e RO. Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatística entre os grupos CT_{RO} e RO ($P < 0,05$). Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver Tabela 7.

Tabela 8 – Valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Original®) e daqueles expostos ao Roundup Original® por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina - 10^{-6} M). Valores médios \pm 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para os parâmetros TPT ou THR. Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Roundup Original®) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio.

f_{EST}	Zero Adrenalina					
	Controle			Roundup Original		
	TPT	THR	RT	TPT	THR	RT
0,2	409 \pm 18	247\pm9	0	431 \pm 18	205\pm8	0
0,4	402 \pm 17	238\pm6	4,8 \pm 1,1	420 \pm 15	201\pm8	2,55 \pm 1
0,6	397 \pm 29	226\pm1	4,8 \pm 1	389 \pm 10	201\pm5	2,2 \pm 0,4
0,8	371 \pm 14	217 \pm 7 ¹	4,2 \pm 1	385 \pm 15	200 \pm 5 ¹	3,7 \pm 1
1	343 \pm 12	191 \pm 4 ¹	5,9 \pm 0,7	337 \pm 12	185 \pm 5 ¹	3,4 \pm 0,4
1,2	316 \pm 12	182 \pm 6 ¹	6,4 \pm 1	304 \pm 10	165 \pm 4 ¹	6,1 \pm 1
1,4	287 \pm 9	164 \pm 5 ¹	8 \pm 3,2	270 \pm 9,4	158 \pm 5 ¹	7,8 \pm 1,3
1,6	264 \pm 11	157 \pm 4 ¹	7,7 \pm 0,5	242 \pm 6	140 \pm 3 ¹	7,3 \pm 1
1,8	252 \pm 19	153 \pm 10 ¹	7,7 \pm 2	234 \pm 10	139 \pm 7 ¹	7,1 \pm 1,2
2	I	I	I	I	I	I
f_{EST}	Adrenalina (10^{-6} M)					
	Controle			Roundup Original		
	TPT	THR	RT	TPT	THR	RT
0,2	416 \pm 13	250 \pm 7	0	420 \pm 14	224 \pm 14	0
0,4	405 \pm 14	238 \pm 6	2,7 \pm 1,2	390 \pm 11	219 \pm 12	4 \pm 0,3
0,6	397 \pm 18	232 \pm 5	1 \pm 0,3	367 \pm 11	212 \pm 14	2 \pm 0,3
0,8	368 \pm 12	216 \pm 5 ¹	1,2 \pm 0,3	324 \pm 11	214 \pm 8 ¹	5,4 \pm 0,7
1	340 \pm 13	200 \pm 8 ¹	6,3 \pm 2,1	321 \pm 10	184 \pm 9 ¹	4,6 \pm 0,7
1,2	315 \pm 11	183 \pm 8 ¹	6,3 \pm 1	285 \pm 8	165 \pm 8 ¹	8 \pm 1,4
1,4	219 \pm 14	171 \pm 6 ¹	9,3 \pm 1,6	253 \pm 8	154 \pm 7 ¹	8 \pm 1,6
1,6	248 \pm 8	150 \pm 4 ¹	10 \pm 2,4	241 \pm 6	144 \pm 8 ¹	8 \pm 1,6
1,8	224 \pm 10	136 \pm 3 ¹	13 \pm 2	235 \pm 9	139 \pm 13 ¹	8,2 \pm 2
2	I	I	I	I	I	I

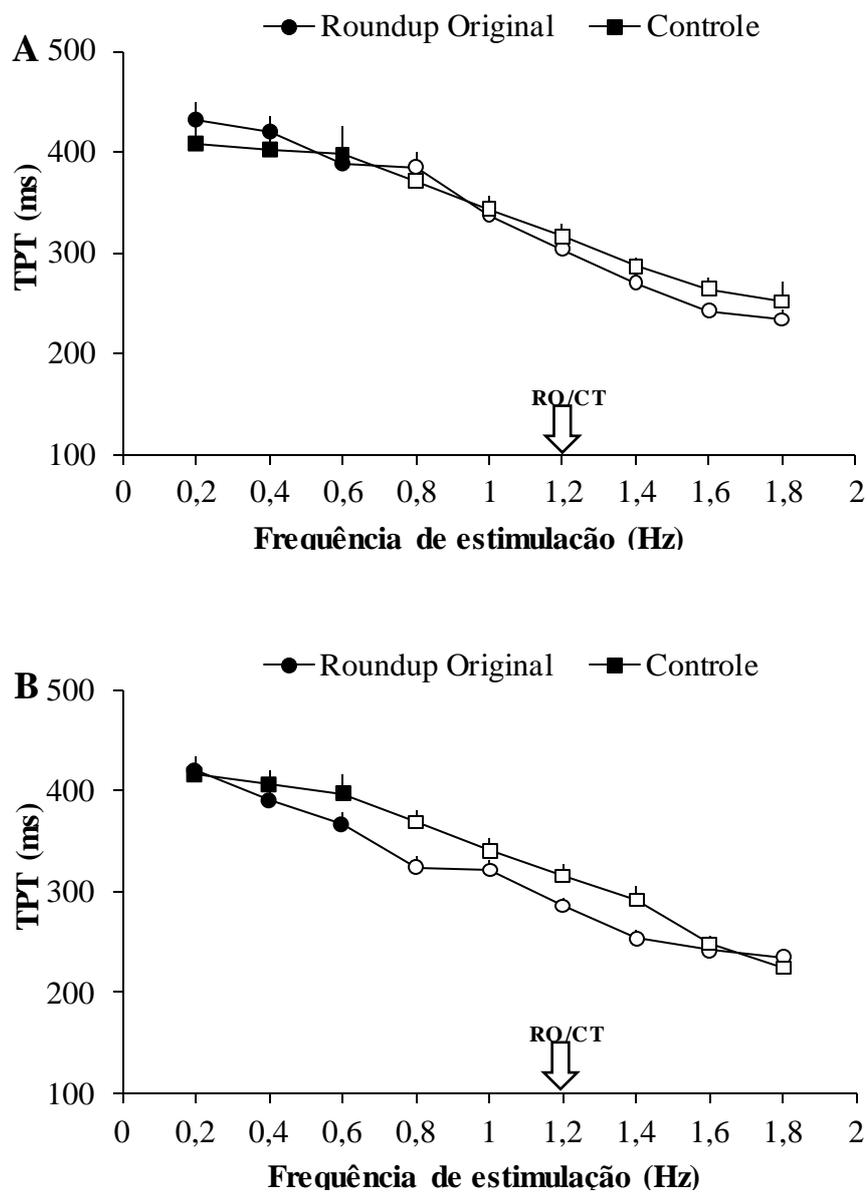


Figura 24 - Valores dos tempos para o pico de tensão (TPT – ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Original® por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RO}) e Roundup Original (RO). Cada ponto representa o valor médio de $Fc \pm 1$ E.P.M.

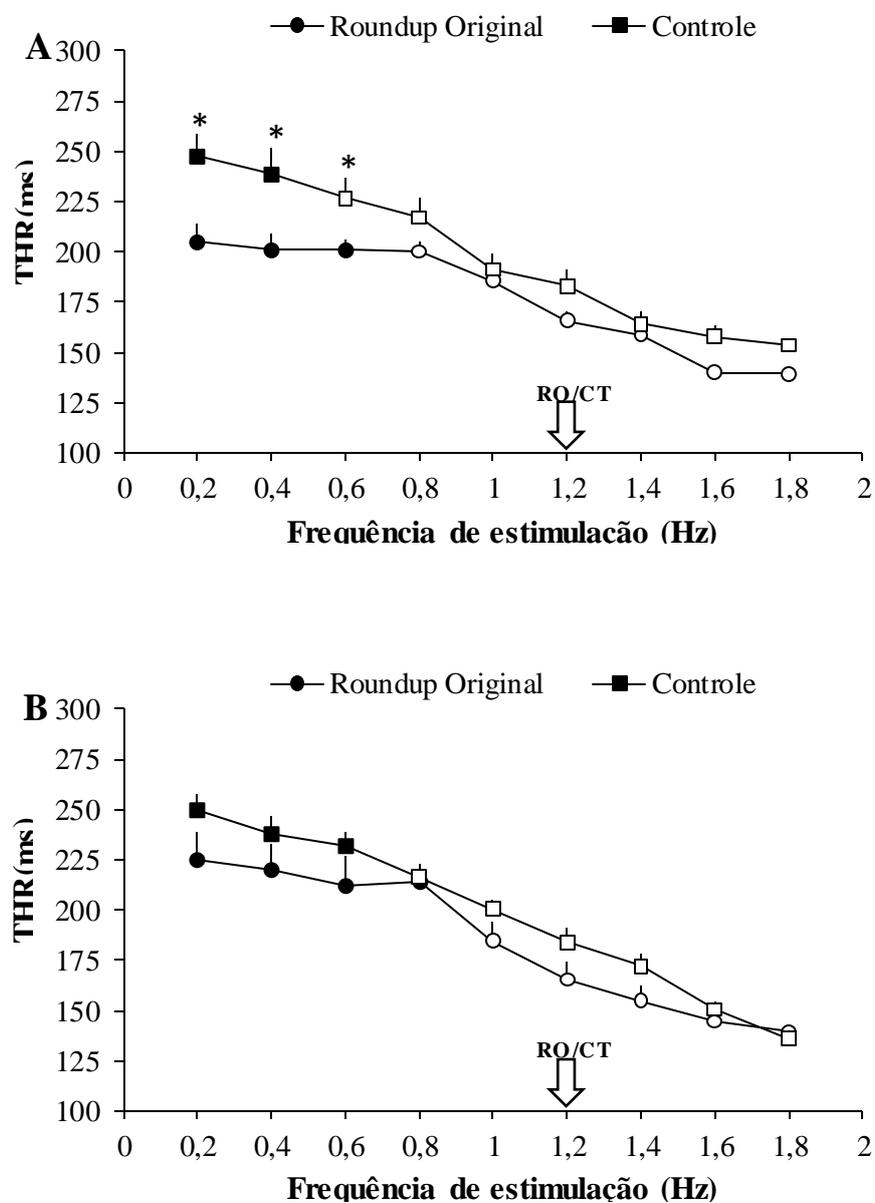


Figura 25 - Valores dos tempos, para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos **Controle** e grupo exposto ao **Roundup Original**[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (∇) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RO}) e Roundup Original (RO). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatística entre os grupos CT_{RO} e RO ($P < 0,05$). Para a comparação estatística entre os diferentes protocolos experimentais e também para cada protocolo em relação aos valores iniciais, ver Tabela 8.

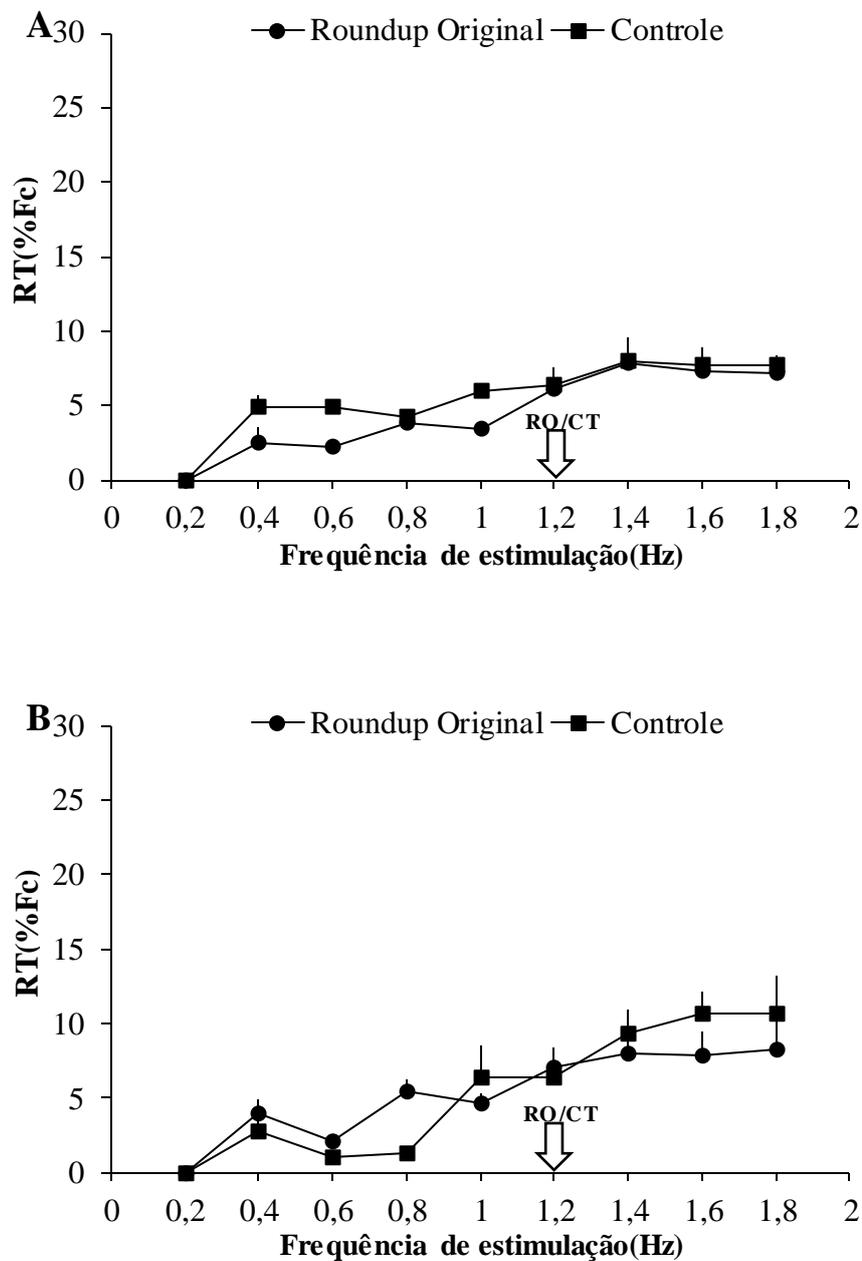


Figura 26 - Valores da tensão de repouso (RT - % da Fc desenvolvida a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos **Controle** e grupo exposto ao **Roundup Original**[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (∇) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RO}) e Roundup Original (RO). Cada ponto representa o valor médio de Fc \pm 1 E.P.M.

4.3. Exposição ao Roundup Transorb R®

4.3.1. Nível de Atividade, Massa Ventricular Relativa Frequência Cardíaca

Os valores médios do nível de atividade (NA - % do total de indivíduos), ventricular relativa (MRV - % massa corpórea) e (f_H - bpm) dos girinos de rã-touro, *L. catesbeianus*, são apresentados na Tabela 9.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os valores de NA dos grupos RTR ($n = 30$) e CT_{RTR} ($n = 30$). A f_H mensurada após concussão cefálica dos girinos foi significativamente menor no grupo RTR em relação ao grupo CT_{RTR} ($P < 0,05$). Além disso, a MRV do grupo RTR não diferiu estatisticamente da apresentada pelo grupo CT_{RTR} ($P > 0,05$).

Tabela 9 - Valores de nível de atividade (NA, $n=30$), massa ventricular relativa (MVR, $n=6$) e frequência cardíaca (f_H , $n=30$) do grupo Controle (CT_{RTR}) e do grupo exposto ao Roundup Transorb R® (RTR) por 96 horas. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito denotam diferença estatística entre o mesmo parâmetro dos diferentes grupos experimentais ($P < 0,05$).

CONTROLE		
NA (%)	MVR (%)	f_H (bpm)
29 \pm 9	0,07 \pm 0,005	89,4 \pm 1
ROUNDUP TRANSORB R		
NA (%)	MVR (%)	f_H (bpm)
22 \pm 8	0,05 \pm 0,008	80 \pm 2

4.3.2. Respostas In Vitro

4.3.2.1. Força de Contração e Dinâmica Cardíaca em “Steady-State”

Os valores médios da força de contração (F_c - % dos valores inicialmente observados após a estabilização) desenvolvida pelas tiras ventriculares dos girinos de rã-touro do grupo **Controle** (CT_{RTR}; $n = 16$) e do grupo exposto ao **Roundup Transorb R®** (RO; $n = 16$) após 40 min de estimulação ininterrupta à frequência de 0,2 Hz na temperatura de 25 °C podem ser observados na Tabela 9. A representação gráfica dos

valores médios obtidos (Fc, TPT e THR) consta na Figura 20. A análise estatística dos resultados indica que não houve uma deterioração da força ao longo de todo o período experimental (40 min) para nenhum dos 2 grupos experimentais ($P > 0,05$), tampouco alteração significativa nos valores de TPT e THR no período em questão (Figura 20). Ademais, não houve diferença estatística entre os valores observados nos grupos CT_{RTR} e RTR em nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 10 – Valores de força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares (n = 16) de girinos de rã-touro no grupo Controle (n = 16) e exposto por 96 horas ao Roundup Transorb R (n = 16) na temperatura de 25 °C durante 40 min de estimulação ininterrupta a 0,2 Hz. Valores médios \pm 1 E.P.M.

Tempo (min)	CONTROLE		
	Fc (mN.mm ⁻²)	TPT (ms)	THR (ms)
0	2,6 \pm 0,4	442 \pm 14	211 \pm 7
10	2,5 \pm 0,5	454 \pm 13	211 \pm 9,3
20	2,4 \pm 0,4	443 \pm 14	225 \pm 10
30	2,2 \pm 0,4	443 \pm 14	231 \pm 11
40	2,1 \pm 0,4	432 \pm 16	225 \pm 7
Tempo (min)	ROUNDUP TRANSOR R		
	Fc (mN.mm ⁻²)	TPT (ms)	THR (ms)
0	1,9 \pm 0,4	437 \pm 12	225 \pm 7
10	1,8 \pm 0,4	421 \pm 10	226 \pm 8
20	1,8 \pm 0,4	432 \pm 10	220 \pm 9
30	1,7 \pm 0,4	431 \pm 11	226 \pm 9
40	1,7 \pm 0,4	422 \pm 11	230 \pm 9

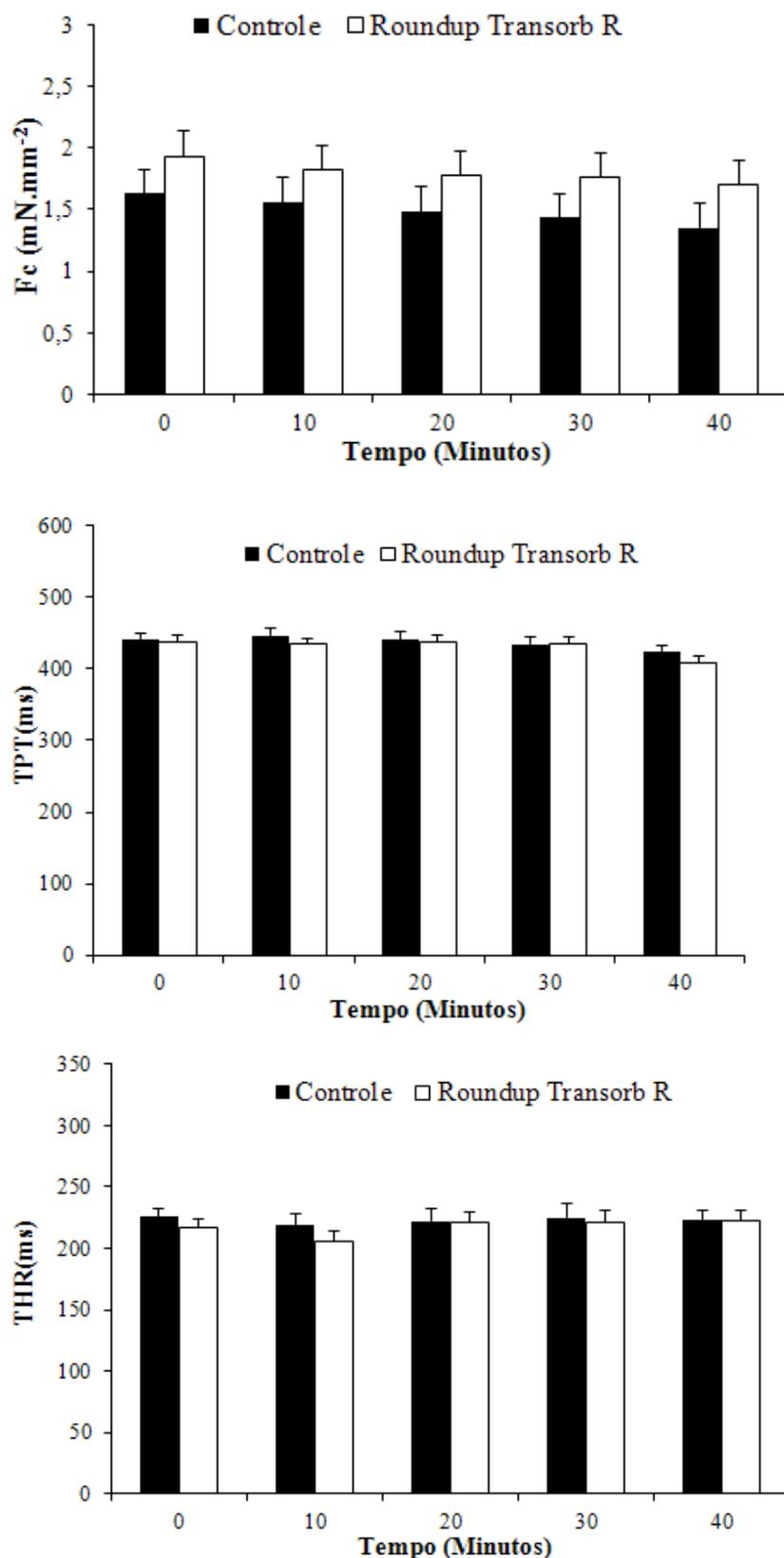


Figura 27 - Efeito do tempo de experimentação (40 min) sobre a força de contração (F_c – mN . mm⁻²), sobre o tempo para o pico de tensão (TPT – ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos **Controle** e **Roundup Transorb R** na temperatura de 25 °C. As barras verticais representam os valores médios + 1 E.P.M.

4.3.2.2 Efeito de Aumentos da Frequência de Estimulação

Nos protocolos que se seguem foi verificado o efeito de incrementos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre a força de contração ($F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$) desenvolvida pelas tiras ventriculares de girinos de rã-touro do **Grupo Controle** (CT_{RTR} , $n=16$) e do **Grupo Exposto ao Roundup Transorb R** (RTR , $n=16$) em 2 tratamentos (sem adição de adrenalina e em resposta à concentração de 10^{-6} M de Adrenalina).

Os valores médios da força de contração ($F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$) e da capacidade de bombeamento cardíaco ($CBC - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidas pelas tiras ventriculares dos girinos de rã-touro do grupo CT_{RTR} e do grupo RTR frente a incrementos da frequência de estimulação (Hz) estão apresentados na Tabela 11, onde são comparados em relação aos valores iniciais (0,2 Hz) e também entre os diferentes protocolos (sem adição adrenalina - 0 Adr; sob a exposição da concentração de 10^{-6} M adrenalina) numa mesma frequência de estimulação. Na Figura 28 pode-se observar a representação gráfica dos valores médios de F_c em ambos os protocolos (sem adrenalina e com a adição de 10^{-6} M de adrenalina). Da mesma forma, na Figura 29, são apresentados os valores médios de CBC para os diferentes protocolos. Os valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) constam na Tabela 12 e a representação gráfica destes parâmetros consta, respectivamente, nas figuras 30, 31 e 32.

Tabela 11 – Valores da força de contração (F_c – mN/mm^2) e da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC – $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Transorb R[®]) e daqueles expostos ao Roundup Transorb R[®] por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina – 10^{-6} M). Valores médios \pm 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para aquele parâmetro (F_c ou CBC).

f_{EST}	Zero Adrenalina			
	Controle		Roundup Transorb R	
	F_c	CBC	F_c	CBC
0,2	1,5 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	2,0 \pm 0,4	0,3 \pm 0,05
0,4	1,6 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1 ¹	1,9 \pm 0,4	0,7 \pm 0,1 ¹
0,6	1,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1 ¹	2,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2 ¹
0,8	1,8 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2 ¹	2,1 \pm 0,4	1,5 \pm 0,3 ¹
1	1,8 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2 ¹	2,1 \pm 0,4	1,9 \pm 0,3 ¹
1,2	1,8 \pm 0,2	2,1 \pm 0,3 ¹	2,2 \pm 0,4	2,4 \pm 0,5 ¹
1,4	1,8 \pm 0,2	2,4 \pm 0,4 ¹	2,1 \pm 0,4	2,7 \pm 0,6 ¹
1,6	1,6 \pm 0,2	2,3 \pm 0,4 ¹	2,0 \pm 0,3	2,7 \pm 0,6 ¹
1,8	1,5 \pm 0,2	2,6 \pm 0,4 ¹	1,5 \pm 0,4	2,8 \pm 0,7 ¹
2	1,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,4 ¹	1,6 \pm 0,5	1,7 \pm 0,7 ¹
f_{EST}	Adrenalina (10^{-6} M)			
	Controle		Roundup Transorb R	
	F_c	CBC	F_c	CBC
0,2	1,6 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	1,9 \pm 0,3	0,3 \pm 0,1
0,4	1,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1 ¹	1,8 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1 ¹
0,6	1,6 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1 ¹	1,9 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2 ¹
0,8	1,7 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1 ¹	2,0 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2 ¹
1	1,6 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1 ¹	1,9 \pm 0,3	1,8 \pm 0,3 ¹
1,2	1,7 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1 ¹	2,0 \pm 0,3	2,1 \pm 0,5 ¹
1,4	1,6 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1 ¹	1,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,5 ¹
1,6	1,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1 ¹	1,7 \pm 0,3	2,6 \pm 0,5 ¹
1,8	1,5 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1 ¹	1,6 \pm 0,3	2,7 \pm 0,6 ¹
2	1,6 \pm 0,3	2,4 \pm 0,1 ¹	1,4 \pm 0,3	2,7 \pm 0,4 ¹

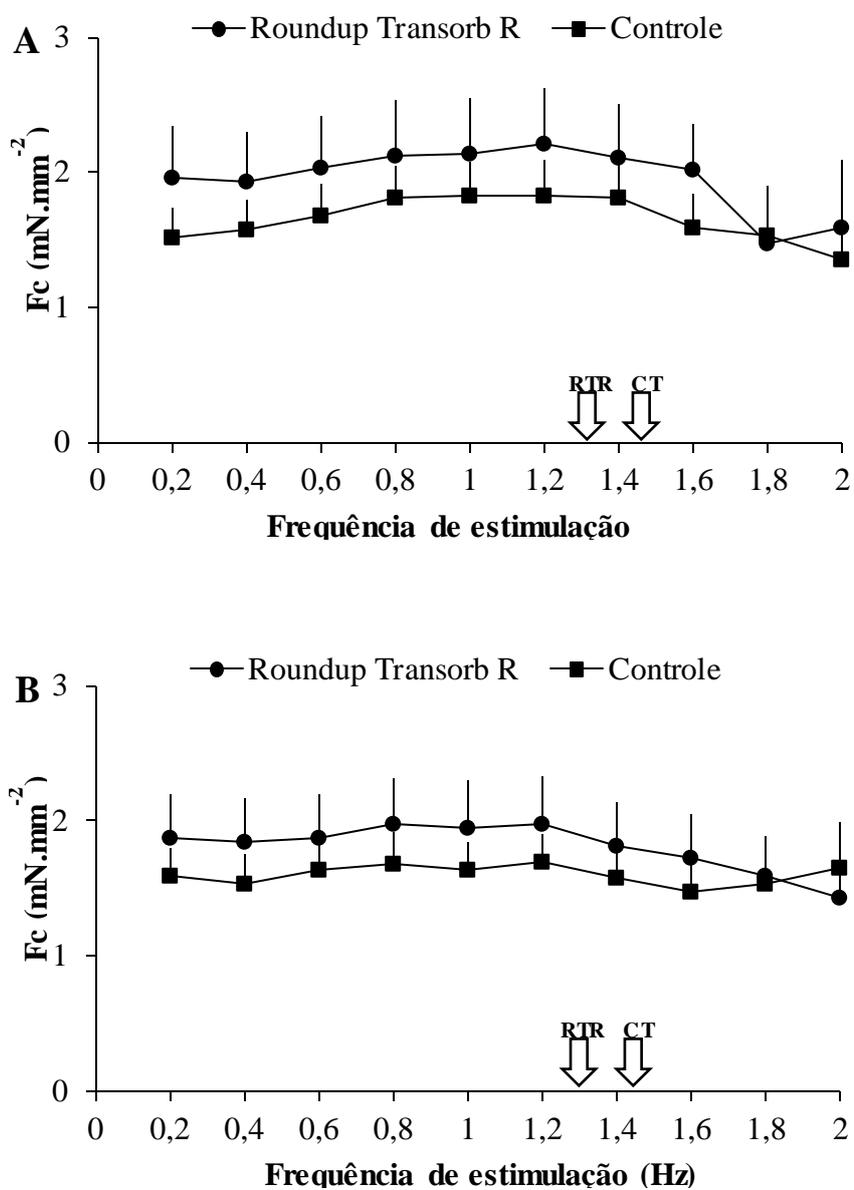


Figura 28- Valores da força de contração (Fc – mN/mm²) desenvolvidas pelas tiras ventriculares (n = 16) dos dos grupos Controle e exposto ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10⁻⁶ M de adrenalina (painel B). As setas verticais (↕) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RTR} e RTR. Cada ponto representa o valor médio de Fc ± 1 E.P.M.

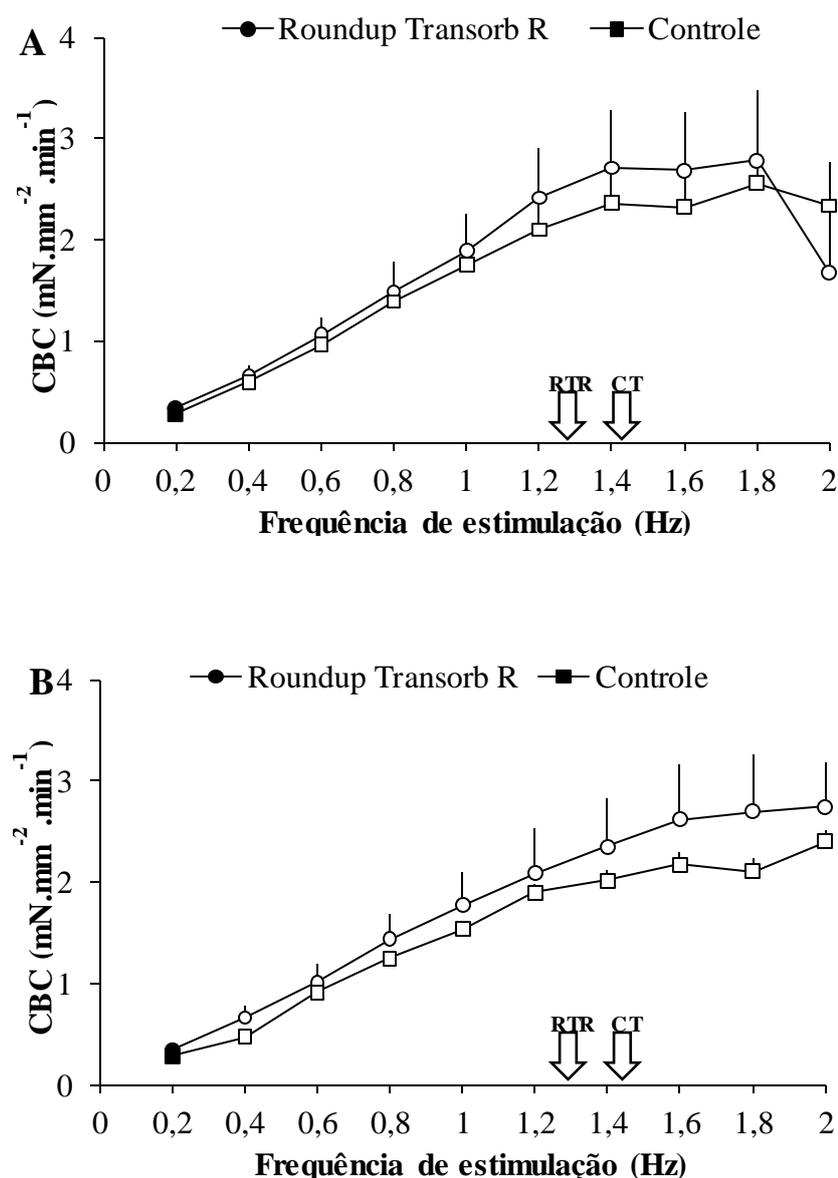


Figura 29 - Valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e exposto ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\Downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo CT_{RTR} e RTR. Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M.

Tabela 12 – Valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) e da tensão de repouso (RT - % da frequência a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos girinos de rã-touro do Grupo Controle (sem adição de Roundup Transorb R[®]) e daqueles expostos ao Roundup Transorb R[®] por 96 horas frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (Zero Adrenalina), com adrenalina (Adrenalina - 10^{-6} M). Valores médios \pm 1 E.P.M. I: registro irregular. O número 1 sobrescrito ao lado dos valores médios indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos valores inicialmente registrados (0,2 Hz) para os parâmetros TPT ou THR. Os números em negrito indicam a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 2 grupos experimentais (Controle e Roundup Transorb R[®]) para uma mesma frequência de estimulação e concentração de adrenalina no meio.

f_{EST}	Zero Adrenalina					
	Controle			Roundup Transorb R		
	TPT	THR	RT	TPT	THR	RT
0,2	408 \pm 14	215 \pm 7	0	428 \pm 13	202 \pm 13	0
0,4	391 \pm 13	205 \pm 10	2,92 \pm 0,5	378 \pm 17	219 \pm 10	1 \pm 0,4
0,6	362 \pm 12	194 \pm 9	2,81 \pm 0,5	375 \pm 15	199 \pm 10	3,6 \pm 1
0,8	323 \pm 10	185 \pm 10 ¹	3,33 \pm 0,4	311 \pm 16	189 \pm 7 ¹	3 \pm 1,2
1	300 \pm 9	167 \pm 8 ¹	3,7 \pm 0,7	291 \pm 16	172 \pm 5 ¹	4,9 \pm 2
1,2	283 \pm 7	158 \pm 4 ¹	5,11 \pm 1	279 \pm 9	158 \pm 7 ¹	4,1 \pm 1,7
1,4	255 \pm 7	143 \pm 6 ¹	6,7 \pm 1,2	253 \pm 11	142 \pm 4 ¹	4,4 \pm 3,3
1,6	221 \pm 10	129 \pm 3 ¹	9,42 \pm 2,4	220 \pm 13	121 \pm 5 ¹	6,6 \pm 4,6
1,8	211 \pm 6	123 \pm 4 ¹	13,3 \pm 2,5	201 \pm 11	122 \pm 3 ¹	6,3 \pm 4,3
2	204 \pm 9	120 \pm 4 ¹	15,6 \pm 3,1	188 \pm 10	114 \pm 7 ¹	7,7 \pm 4,3
f_{EST}	Adrenalina (10^{-6} M)					
	Controle			Roundup Transorb R		
	TPT	THR	RT	TPT	THR	RT
0,2	384,4 \pm 15	215 \pm 7	0	381 \pm 20,4	200 \pm 7	0
0,4	349,9 \pm 15	205 \pm 11	1 \pm 0,3	351 \pm 13,5	202 \pm 8	1 \pm 0,3
0,6	339,8 \pm 8	194 \pm 10	2,11 \pm 0,3	336 \pm 11,2	195 \pm 6	2,1 \pm 0,3
0,8	318,5 \pm 8 ¹	185 \pm 10 ¹	1,58 \pm 0,3	319 \pm 9,17	185 \pm 6 ¹	1,6 \pm 0,3
1	284 \pm 8 ¹	167 \pm 8 ¹	2,07 \pm 0,6	282 \pm 10,9	173 \pm 5 ¹	2,1 \pm 0,6
1,2	268,8 \pm 10 ¹	158 \pm 5 ¹	3,03 \pm 0,2	280 \pm 13,2	154 \pm 3 ¹	3 \pm 0,2
1,4	251,3 \pm 10 ¹	143 \pm 6 ¹	2,33 \pm 0,4	240 \pm 14,4	145 \pm 5 ¹	2,3 \pm 0,4
1,6	227,3 \pm 9 ¹	129 \pm 4 ¹	2,27 \pm 0,7	219 \pm 10,2	128 \pm 3 ¹	2,3 \pm 0,7
1,8	211,9 \pm 10 ¹	123 \pm 5 ¹	3,41 \pm 2	201 \pm 10,4	119 \pm 6 ¹	3,4 \pm 2
2	193,7 \pm 8 ¹	120 \pm 4 ¹	3,61 \pm 0,8	183 \pm 10,7	115 \pm 6 ¹	3,6 \pm 0,8

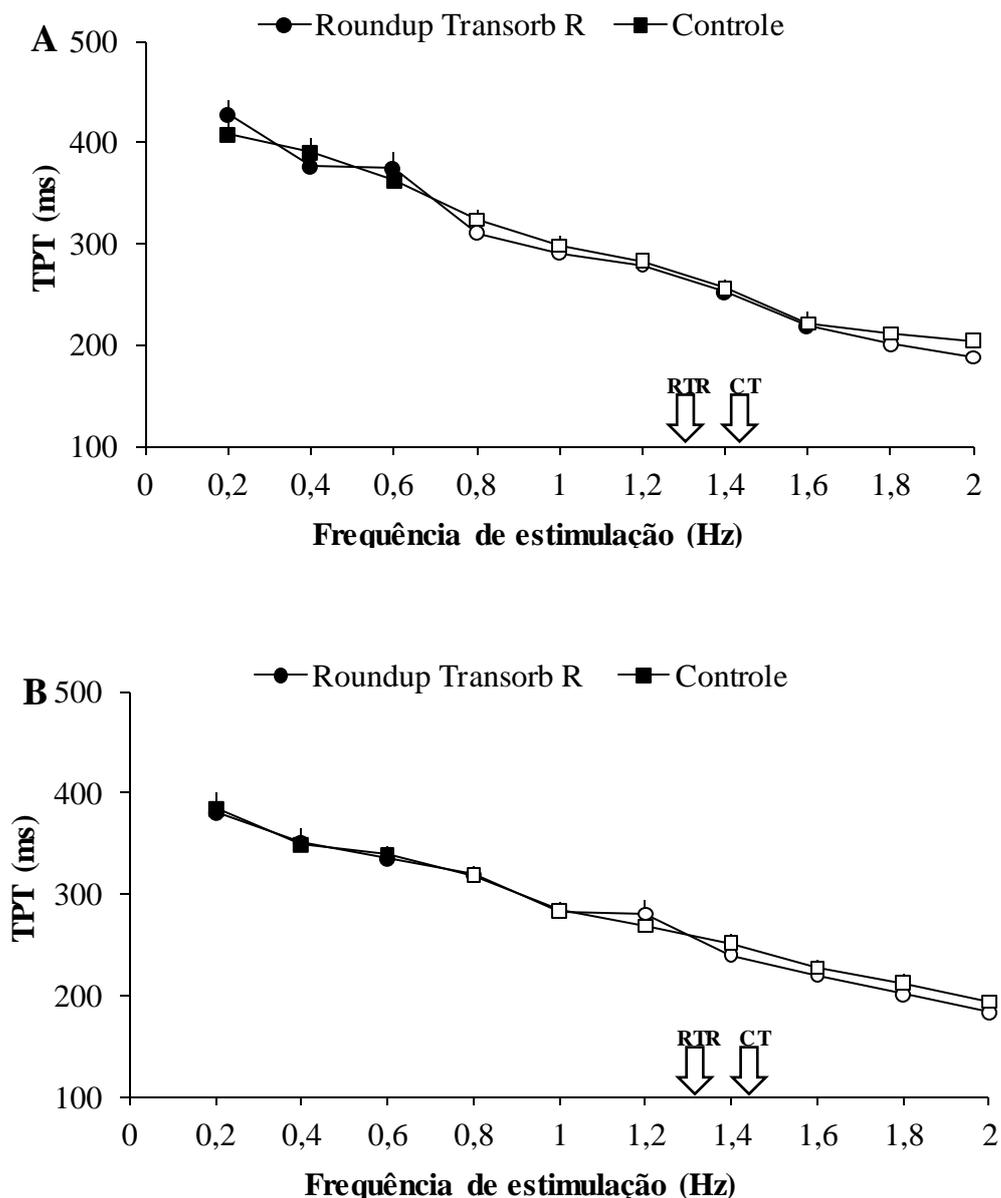


Figura 30 - Valores dos tempos para o pico de tensão (TPT – ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos **Controle** e grupo exposto ao **Roundup Transorb R**[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (∇) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RTR}) e Roundup Transorb R (RTR). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M.

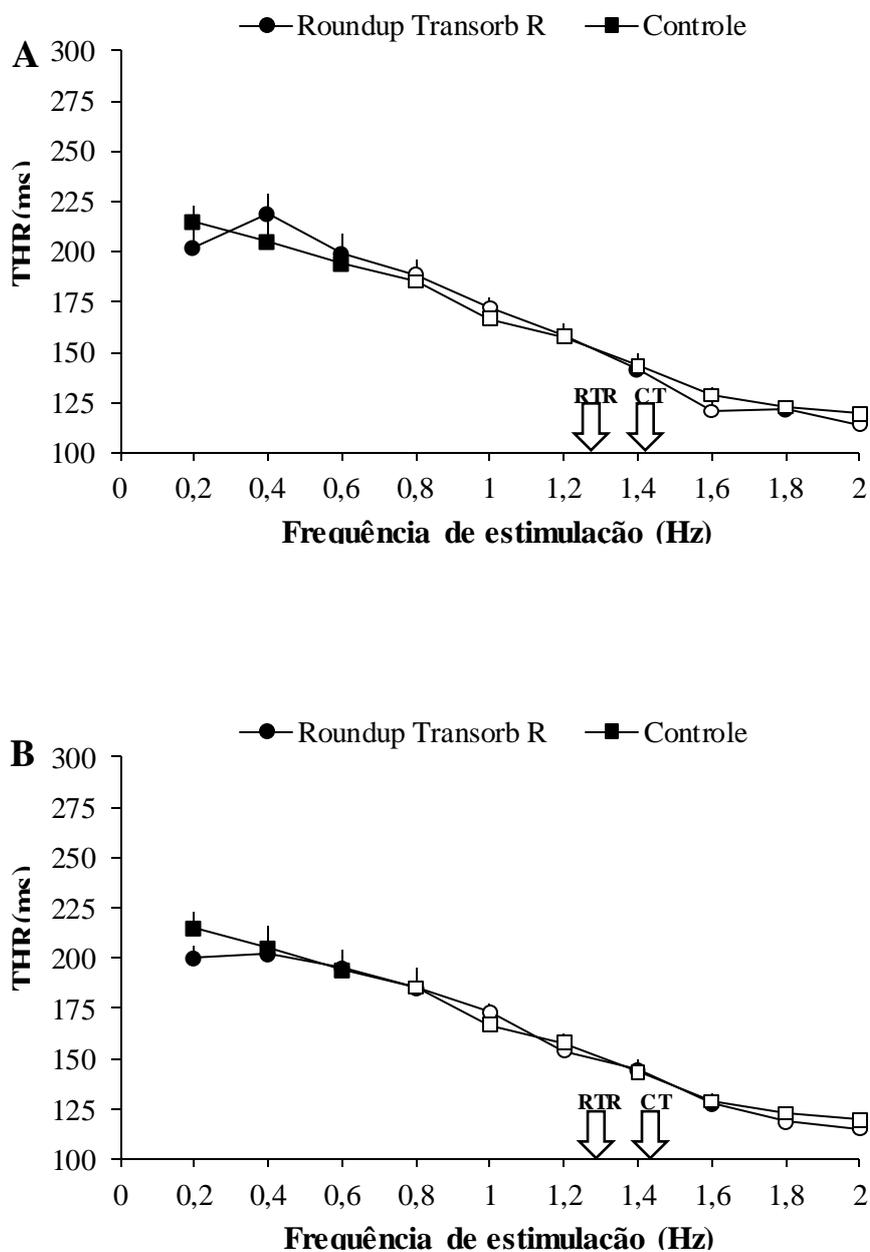


Figura 31 - Valores dos tempos para meio relaxamento (THR – ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares ($n = 16$) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Transorb R[®] por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (∇) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RTR}) e Roundup Transorb R (RTR). Cada ponto representa o valor médio de $F_c \pm 1$ E.P.M.

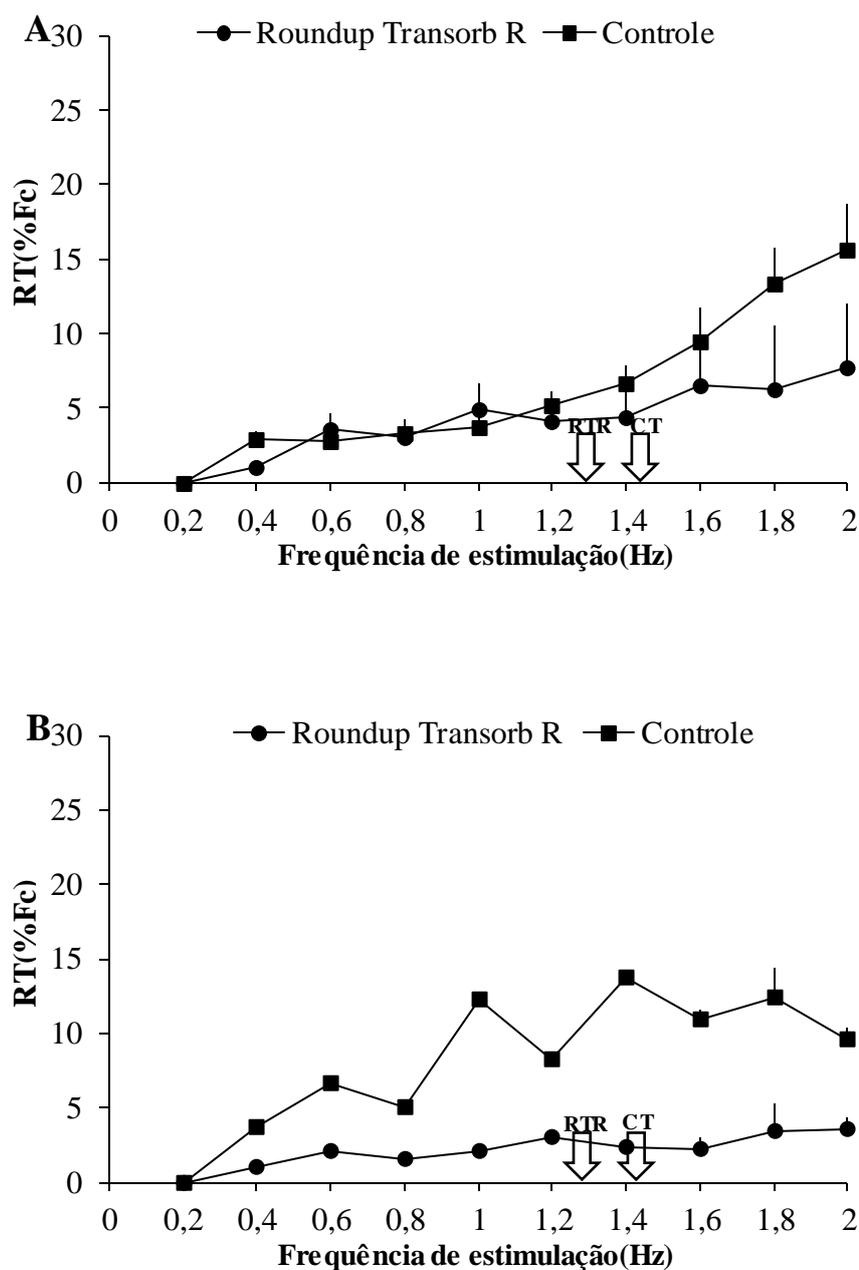


Figura 32 - Valores da tensão de repouso (RT - % da Fc desenvolvida a 0,2 Hz) desenvolvidos pelas tiras ventriculares (n = 16) dos grupos Controle e grupo exposto ao Roundup Transorb R® por 96h frente a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) em resposta a diferentes protocolos experimentais: sem adrenalina (painel A), e sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina (painel B). As setas verticais (\downarrow) representam as frequências cardíacas mensuradas *in loco* para o grupo Controle (CT_{RTR}) e Roundup Transorb R (RTR). Cada ponto representa o valor médio de Fc \pm 1 E.P.M.

4.4 Parâmetros respiratórios

4.4.1 Determinação da Função Respiratória

No protocolo que se segue foram analisados os efeitos da hipóxia gradual sobre os valores de taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ - $mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$) de girinos de rã-touro do grupo Controle (CT, n = 17) e dos animais expostos à concentração subletal de 1 ppm do equivalente ácido de glifosato presente nos herbicidas Glifosato (GLI, n = 10), Roundup Original[®] (RO, n = 10) e Roundup Transorb R[®] (RTR, n = 7) pelo período de 96 horas.

Quando comparados os valores de $\dot{V}O_2$ obtidos para cada tensão de O_2 do grupo CT não se constatou variações significativas entre a tensão normóxica de 140 mmHg ($42,2 \pm 4,4 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$) e a faixa de hipóxia de 120 a 40 mmHg observando-se, entretanto, uma diminuição ($p < 0,05$) entre os valores apresentados em normóxia e a tensão hipóxica de 20 mmHg ($13,9 \pm 3,1$). Os valores de $\dot{V}O_2$ registrados para o grupo GLI apresentaram diminuições significativas ($p < 0,05$) entre a tensão normóxica ($37,2 \pm 4,6 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$) e as tensões hipóxicas de 60 ($19,6 \pm 0,9 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$), 40 ($22,8 \pm 2,3 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$) e 20 mmHg ($20,7 \pm 1,31 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de $\dot{V}O_2$ apresentados pelo grupo RO em nenhuma das tensões de O_2 experimentais. No grupo RTR, contudo, a $\dot{V}O_2$ aumentou significativamente ($p < 0,05$) nas tensões hipóxicas de 80 ($73,0 \pm 1,9 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$) e 40 mmHg ($69,0 \pm 4,3 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$) em relação aos valores de normóxia ($51,8 \pm 4,8 mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$).

Comparando-se os resultados observados para cada grupo experimental na mesma tensão de O_2 com o grupo CT, ficou evidente que o glifosato ocasionou uma diminuição ($p < 0,05$) na $\dot{V}O_2$ nas tensões hipóxicas compreendidas entre 80 e 40 mmHg. Em contraste, a exposição dos girinos ao Roundup Original[®] não ocasionou alterações na $\dot{V}O_2$ ($P > 0,05$), enquanto a exposição ao Roundup Transorb R[®] tendeu a elevar a $\dot{V}O_2$ dos animais,

aumento este significativo ($P < 0,05$) nas tensões de 100 a 80 mmHg e de 40 mmHg. Tais resultados são apresentados na Tabela 12 e nas Figuras 33, 34, 35 e 36.

Tabela 13- Valores médios de consumo de O_2 (VO_2 - $mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$) de girinos de *Lithobates catesbeianus* dos grupos Controle (Ctrl, n=17) e expostos à 1ppm do equivalente ácido de glifosato dos compostos Glifosato (Gli, n=10), Roundup Original® (RO, n=10) e Roundup Transorb R® (RTR, n=7) por 96h. Os valores em negrito indicam diferença estatística significativa entre os grupos expostos e o grupo Controle em uma mesma tensão ($p < 0,05$). 1- representa diferença estatística significativa entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$).

Pin O_2 (mmHg)	VO_2 ($mLO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$)			
	Ctrl	Gli	RO	RTR
140	42,2±4,4	37,2±4,6	44,4±4,3	51,8±4,8
120	50,7±4,1	36,9±4,6	38,0±4,4	41,0±3,9
100	40,2±3,8	35,6±3,5	40,9±5,7	59,7±5,4
80	49,3±3,6	25,3±2,8	45,9±6,9	73,0±1,9¹
60	35,9±2,2	19,6±0,9¹	39,6±4,8	61,2±4,6
40	39,8±2,2	22,8±2,3¹	41,6±4,6	69,0±4,3¹
20	13,9±3,1 ¹	20,7±1,3 ¹	29,9±7,7	25,4±2,3 ¹

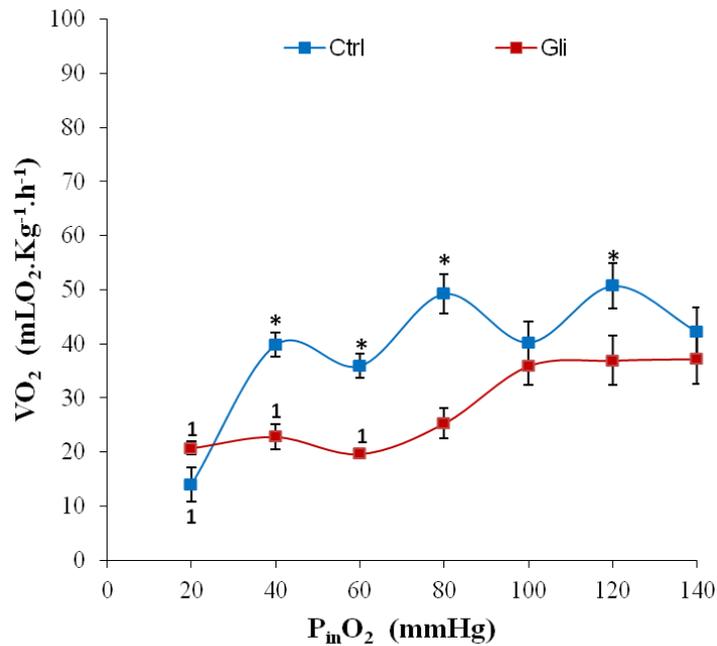


Figura 33 - Comparação entre o efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{in} O_2$ -mmHg) sobre a tomada de O_2 ($\dot{V}O_2 \text{ mL}O_2 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) dos grupos **Controle** e **Glifosato**. As linhas azuis representam o grupo Controle (Ctrl, n=17) e as linhas vermelhas o grupo exposto ao Glifosato (Gli, n=10). * indica diferença estatística entre o grupo Gli e o grupo Ctrl em uma mesma tensão ($p < 0,05$). I- representa diferença estatística entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$).

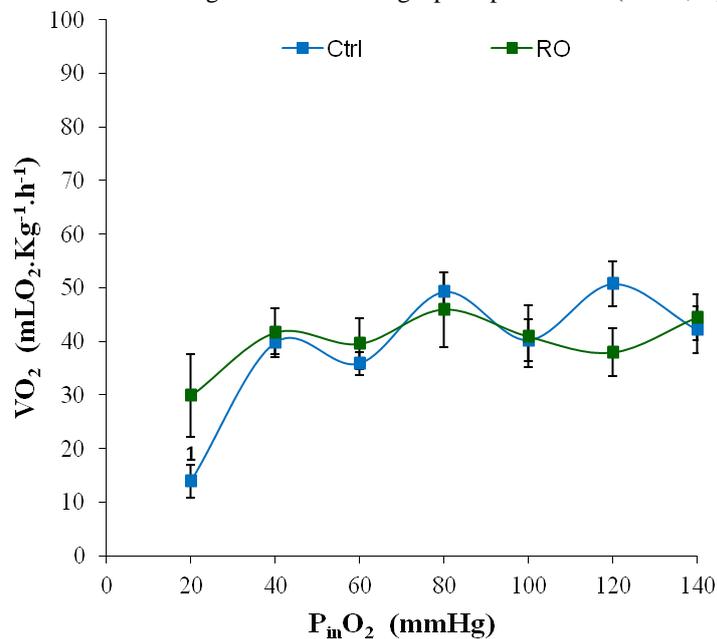


Figura 34 - Comparação entre o efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{in} O_2$ -mmHg) sobre a tomada de O_2 ($\dot{V}O_2 - \text{mLO}_2 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) nos grupos **Controle** e **Roundup Original**. As linhas azuis representam o grupo Controle (Ctrl, n=17) e as linhas verdes o grupo exposto ao Roundup Original® (RO, n=10). I- representa diferença estatística entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$).

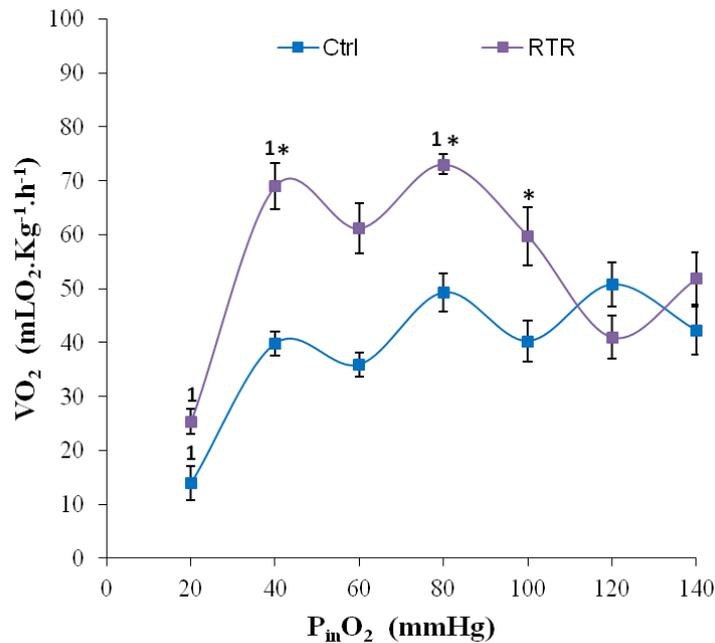


Figura 35 - Comparação entre o efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{i\text{O}_2}$ -mmHg) sobre a tomada de O_2 ($\dot{V}O_2$ - $\text{mLO}_2 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) dos grupos Controle e Roundup Transorb R. As linhas azuis representam o grupo Controle (Ctrl, n=17) e as linhas roxas o grupo exposto ao Roundup Transorb R[®] (RTR, n=7). * indica diferença estatística entre o grupo RTR e o grupo Ctrl em uma mesma tensão ($p < 0,05$). 1- representa diferença estatística entre a respectiva tensão e a tensão inicial de 140 mmHg em um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$).

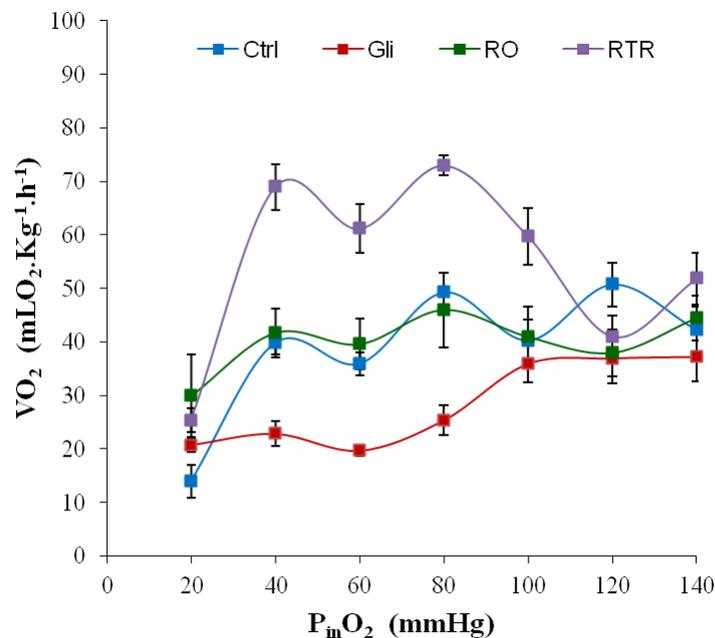


Figura 36 - Comparação do efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{i\text{O}_2}$ -mmHg) sobre a tomada de O_2 ($\dot{V}O_2$ - $\text{mLO}_2 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) dos grupos CT, GLI, RO e RTR. CT (linhas azuis; n = 17), GLI (linhas vermelhas; n = 10), RO (linhas verdes; n = 10) e RTR (linhas roxas; n = 7). A avaliação estatística entre os grupos consta na Tabela 13.

4.5 Parâmetros morfológicos pele dorsal

A análise das lâminas confeccionadas a partir dos tecidos coletados em todos os grupos confirmou o padrão estrutural descrito anteriormente. A pele é constituída por uma epiderme fina pouco queratinizada composta, no grupo CT, por no máximo três camadas de células. A região de tecido conjuntivo frouxo, ou derme esponjosa, situada abaixo da epiderme, é delgada e ancora a lâmina basal, onde estão situadas as glândulas e os melanócitos (Figura 37). No presente trabalho foram identificados dois tipos de glândulas, as mistas e granulosas, que são simples, tubulares e apresentam um caráter acidófilo (Figura 37, B e H).

Entretanto, a comparação entre a morfologia apresentada pelos diferentes grupos experimentais revelou grandes diferenças estruturais, principalmente em relação à epiderme. Como citado, as células epiteliais observadas no grupo CT (Figura 37, A e B) formaram uma camada delgada, com poucas camadas de células achatadas, estrutura necessária para o desempenho adequado das trocas gasosas. Contudo, tal conformação não foi observada em nenhum dos grupos expostos aos diferentes herbicidas. A epiderme apresentada por animais pertencentes ao grupo GLI mostrou-se notavelmente espessa, apresentando diversas camadas sobrepostas de células que adquiriram um aspecto arredondado (Figura 37, C e D). Tal conformação foi acompanhada pela presença de células com cromátides fragmentadas, consequência típica da contaminação por poluentes (ÇAVAŞ, & KÖNEN, 2007). O grupo RO apresentou uma morfologia um tanto distinta do grupo GLI, apresentando células muito inchadas e arredondadas que não se dispuseram em camadas sobrepostas, além da presença de células com cromátides fragmentadas. A morfologia apresentada pelas células epidérmicas dos girinos pertencentes ao grupo RTR mostrou-se muito semelhante à apresentada pelo grupo RO, embora o número de células alteradas encontrado no grupo RTR fosse muito menor que o apresentado pelo grupo no grupo RO. Tal fato sugere que a exposição ao Roundup Transorb R[®] tenha acarretado

efeitos mais brandos sobre as células epidérmicas dos girinos, embora também tenham sido encontradas fragmentações de cromátide nas amostras desse grupo.

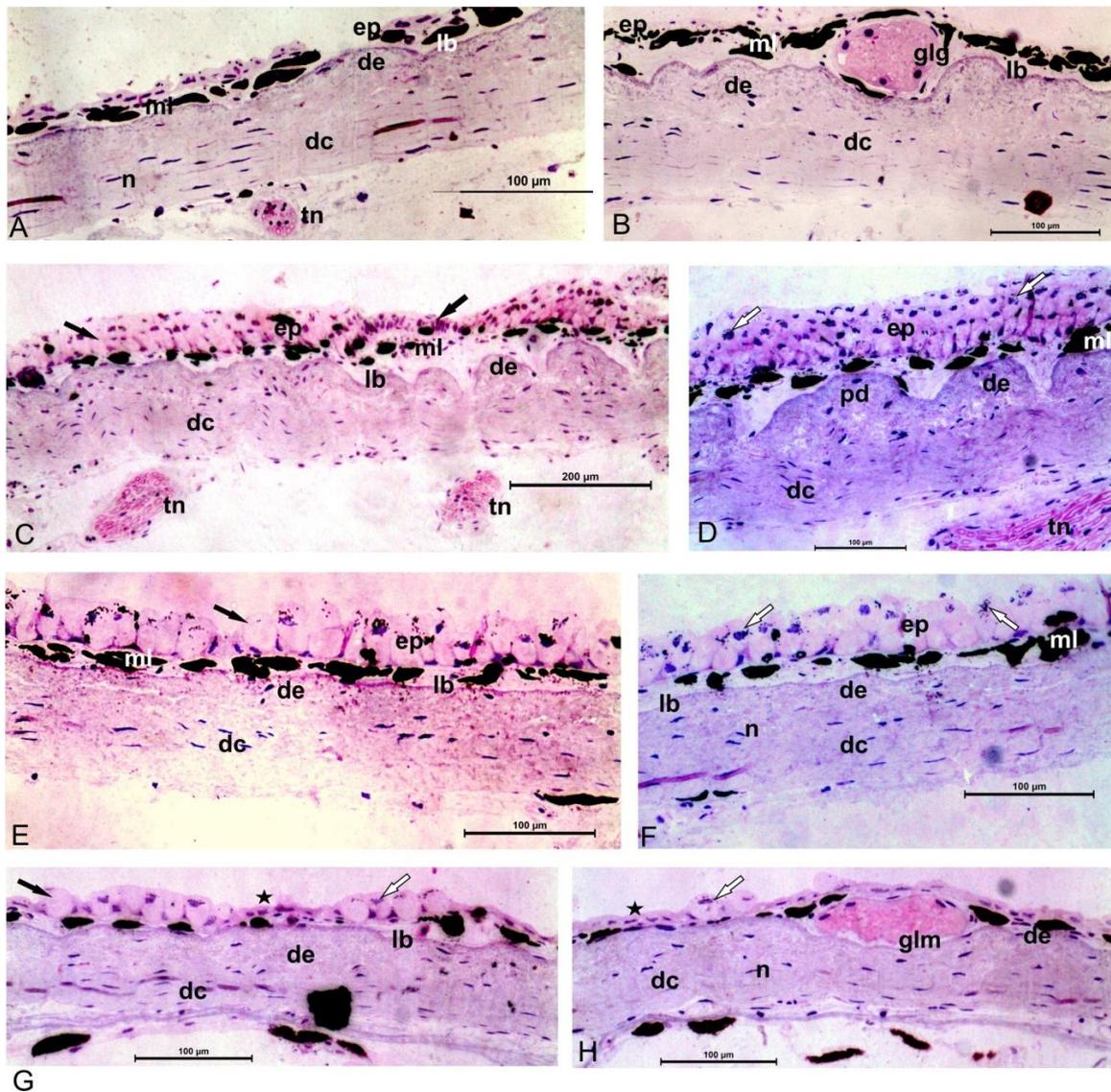


Figura 37 - Cortes longitudinais da pele dorsal de *L. catesbeianus* dos grupos **Controle**, **Glifosto**, **R. Original** e **R. Transorb R** em coloração H.E. Os painéis A e B são referentes ao tecido pertencente ao grupo Controle; C e D ao grupo exposto ao Glifosato; E e F ao grupo exposto ao Roundup Original® e G e H ao grupo exposto ao Roundup Transorb R®. A. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Núcleo de fibroblásto (n), Terminação nervosa (tn), Lâmina basal (lb). B. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Glândula granular (glg), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb). C. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), Terminação nervosa (tn), (↓) Célula inchada e com um formato esférico. D. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Terminação nervosa (tn), Papila dérmica (pd), (↓) Cromatinas fragmentadas. E. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), (↓) Célula inchada e com um formato esférico. F. Epiderme (ep), Melanócito (ml), Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), Núcleo de fibroblásto (n), (↓) Cromatinas fragmentadas. G. Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Lâmina basal (lb), (↓) Cromatinas fragmentadas, (↓) Célula inchada e com um formato esférico, (★) Epitélio não alterado. H. Derme esponjosa (de), Derme compacta (dc), Núcleo do fibroblasto (n), Glândula mista (glm), (↓) Cromatinas fragmentadas, (★) Epitélio não alterado. .

5. DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros de função cardíaca

O débito cardíaco, que corresponde ao produto entre o volume sistólico e a frequência cardíaca (WHITERS & HILLMAN, 2001), deve ser bem regulado a fim de manter um fluxo sanguíneo adequado, garantindo a distribuição de nutrientes essenciais, metabólitos, gases e outras substâncias de e para os diversos tecidos corporais, como músculo esquelético, cérebro, dentre outros, sob uma ampla variedade de condições (LILLYWHITE et al., 1999). Em adição a tal fato, são necessários ajustes eficientes entre o volume sistólico e a frequência cardíaca, a fim de que um animal ectotérmico, como no caso do girino de *Lithobates catesbeianus*, possa apresentar uma resposta cardíaca adequada à sua sobrevivência no ambiente onde se insere.

A capacidade do músculo cardíaco de manter o desempenho dos batimentos em condições fisiológicas adversas é umas das mais importantes características desenvolvidas pelos vertebrados para a sobrevivência quando submetidos a variações e estresses ambientais (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Conseqüentemente, ajustes eficientes no débito cardíaco em resposta aos xenobióticos, alcançado por meio de mudanças no volume da contração e/ou na frequência cardíaca são cruciais.

O volume cardíaco depende da homeostase do complexo de controle do cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) que, por sua vez, mantém a frequência dos batimentos (LEWATOWSKI & PYTKOWSKI 1987; Bers 2001). Outros fatores também influenciam a taxa cardíaca como o controle nervoso e hormonal (FARRELL & JONES 1992).

Quando são necessários aumentos do desempenho cardíaco em função da exposição à xenobióticos, muitas vezes se observa uma hipertrofia cardíaca, evidente

após a exposição crônica a poluentes (CALORE et al., 2007), resultando em um aumento do volume sistólico. Contudo, a afirmação precedente não foi corroborada pelos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que não foram observados incrementos na MVR, mas, contrariamente, constatou-se uma redução deste parâmetro no grupo GLI ($P < 0,05$).

Tal diminuição de MVR observada no grupo GLI não foi descrita por Costa et al. (2008) para girinos de mesma espécie e estágio de desenvolvimento, onde não foram encontradas diminuições de MVR frente à exposição a 1ppm de Roundup Original® por 48 horas, onde a MVR encontrada foi de $0,07 \pm 0,01$ nos grupos Controle e Exposto. Tal diferença pode sugerir que o maior período de exposição realizado atual trabalho, 96 horas, contribuiu para que os efeitos adversos dos xenobióticos ao tecido ventricular se tornassem mais e evidentes. Uma possível explicação para tal efeito seria a diminuição do diâmetro dos miócitos, uma vez que, pelo fato da grande maioria do Ca^{2+} recrutado durante a contração provir do meio extracelular em anfíbios, a diminuição do volume celular poderia facilitar a chegada de Ca^{2+} até os miofilamentos e melhorar a desempenho cardíaco em resposta a exposição. Entretanto, dados que elucidassem tal efeito não foram encontrados na literatura.

A redução do volume sistólico, determinado pela diminuição da MVR, acarretaria em um decréscimo do débito cardíaco que, por sua vez, poderia demandar uma resposta compensatória de aumento da f_H . Entretanto, os valores de f_H encontrados *in loco* não sugerem a ocorrência de taquicardia, uma vez que as frequências apresentadas pelos grupos GLI, CT e RTR não foram superiores às apresentadas por seus respectivos grupos controle. Os valores de f_H obtidos para o grupo RTR se mostraram significativamente inferiores ($P < 0,05$) às apresentadas pelo grupo CT_{RTR} sendo 80 bpm para o grupo RTR e 89 bpm CT_{RTR} .

Uma bradicardia semelhante foi encontrada por Anelli-Jr (2010) em estudo com matrinxã (*Brycon amazonicus*). Tal autor realizou exposições a 5 ppm do herbicidas Roundup Original[®], Roundup Transorb[®] e Roundup WG[®] pelo período de 96 h, observando uma redução da f_H frente a exposição ao R. Transorb[®] e R. WG[®], observando, entretanto, um aumento da f_H frente a exposição ao R. Original[®]. Em concordância, Xiao et al. (2007) averiguando o efeito da administração de glifosato-isopropilamônio (GIA) sobre a pele de indivíduos adultos de *Bufo gargarizans*, demonstraram, através da análise de ECG, a ocorrência de uma redução de f_H .

A principal via naturalmente envolvida na redução de f_H é a inervação colinérgica (nervo vago) que exerce um efeito inibitório sobre a taxa de auto-despolarizações das células marca-passo, o que resulta em um cronotropismo negativo (PELSTER et al., 1993). Tal efeito é oriundo da ativação de receptores muscarínicos, abundantes nos tecidos nodais, pela acetilcolina (ACh), o que desencadeia a abertura de canais permeáveis ao K^+ presentes nestas células que, por sua vez, são hiperpolarizadas (KRAPIVINSKY et al., 1995). A ACh, uma vez na fenda sináptica, é rapidamente degradada por uma enzima específica a acetilcolinesterase (AChE), que impede que este neurotransmissor atue de forma contínua sobre o tecido nodal (JOKANOVIC, 2001).

Consta na literatura (MODESTO & MARTINEZ, 2010) uma redução significativa da concentração da enzima AChE no cérebro e músculos curimbatá (*Prochilodus lineatus*) frente a exposição às concentrações de 1 e 5 mg/L de Roundup Transorb[®] por 96 h. Entretanto, segundo Protas & Leontieva (1992), a inervação vagal no coração de indivíduos de *Rana temporária* ainda não está presente em um estágio de desenvolvimento equivalente ao 25 de Gosner, o que tornaria impossível a redução da f_H em virtude de uma ação do herbicida sobre a AChE.

Em relação aos valores de NA encontrados, o grupo GLI foi o único a apresentar elevações significativas ($P < 0,05$). Os valores de CL50 encontrado por Howe et al, (2004) para girinos de *Rana clamitans* (estágio 25 de Gosner) expostos por 96h ao glifosato puro foram superiores à 17,9 mg/L, enquanto que, os do Roundup Original[®] foram 2,0 mg/L. Tendo em vista que a concentração de Roundup Original[®] utilizada no presente estudo (1mg/L de e.a) foi a próxima do valor da CL50 mensurado para *R. clamitans*, pode-se sugerir que a redução da atividade seja uma estratégia empregada pelos girinos visando a economia de energia frente ao estresse imposto pela exposição às formulações de Roundup[®].

Em relação aos dados encontrados *in vitro*, não ocorreram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os parâmetros analisados (Fc, TPT e THR) durante 40 minutos de estimulação ininterrupta nos 3 grupos experimentais analisados, GLI, RO e RTR. Tais resultados indicam que a exposição aos diferentes xenobióticos não promoveu efeitos adversos sobre o desempenho das tiras ventriculares sob a frequência de estimulação subfisiológica de 0,2 Hz nesse período experimental.

Nos protocolos onde as tiras ventriculares foram submetidas a incrementos da frequência de estimulação, os resultados encontrados para o grupo GLI e CT_{GLI} indicam que o glifosato não provocou alterações nas variáveis analisadas. A frequência máxima suportada foi igual em ambos os grupos sendo 2 Hz na ausência de adrenalina e 2 Hz sob a concentração de 10^{-6} M de adrenalina, o que sugere que a exposição não influenciou a capacidade de contração em frequências elevadas tampouco sob o efeito de adrenalina. Ademais, os valores de Fc e a CBC não diferiram entre os grupos indicando que não houve decréscimo na capacidade contrátil. Os valores de TPT e THR também não variaram, denotando que a exposição não influenciou na captação e extrusão de Ca^{2+} celular.

Em relação à exposição ao Roundup Original[®], surpreendentemente, tanto na presença quanto na ausência de adrenalina, pôde-se observar que a exposição ao herbicida causou um incremento acentuado da Fc, evidenciado pelos maiores valores apresentados pelo grupo RO em relação ao CT_{RO} ($P < 0,05$). Tais valores de Fc também resultaram em grandes incrementos na capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) do grupo RO.

Ademais, a exposição ao Roundup Original[®] resultou em uma aceleração do THR em frequências abaixo de 0,8Hz, porém somente na ausência de adrenalina. Desta forma, quando em condições sem adrenalina o Roundup Original[®] resultou em efeito lusitrópico positivo. Todavia, a adição de adrenalina no grupo RO inibiu totalmente o efeito inotrópico positivo do Roundup[®]. Tais achados apontam para a existência de uma interação entre a adrenalina e o Roundup Original capaz de não só anular os efeitos proporcionados pelos dois compostos em separado, como também de causar um profundo decréscimo da função cardíaca.

Para a elucidação do intrigante efeito causado pela interação entre a adrenalina e o Roundup Original[®] passemos, primeiramente, a pormenorizar os possíveis efeitos dos dois compostos quando atuando separadamente.

Sabe-se que os efeitos da adrenalina sobre a contratilidade cardíaca são bastante complexos, uma vez que envolvem não apenas uma redistribuição do cálcio na célula (GROSSMANN & FURCHGOTT, 1964; NIEDERGERKE & PAGE, 1977, DAVIS et al, 2008), bem como a estimulação da glicólise (BRODDE, 2008). Não obstante, dentre os mecanismos pelos quais a adrenalina estimula a contratilidade miocárdica, os citados a seguir são de especial interesse no presente contexto. A tomada de Ca^{2+} pela SL é aumentada tanto em mamíferos (CARMELIET & VEREECKE, 1969) quanto em peixes (SHIELS & FARRELL, 1997; RANTIN et al., 1998). No miócito, a estimulação

dos β_2 -adrenoceptores pela adrenalina provoca a fosforilação dos canais L da SL (ou DHPR) pela ativação de uma proteína quinase A elevando a condutância destes canais e, conseqüentemente, a entrada de Ca^{2+} na célula (Bers, 2001). Contudo, este mecanismo parece não ser o preponderante no coração dos animais aqui estudados, tendo-se em vista que o inotropismo tampouco o TPT foram significativamente alterados em resposta à adrenalina.

Por outro lado, também já foi constatado que a adrenalina estimula a bomba de Na^+/K^+ da SL em mamíferos (BERS, 2009) e peixes (HOVE-MADSEN & GESSER, 1989), impedindo a acumulação intracelular de Na^+ e, assim, favorecendo o efluxo de Ca^{2+} através do NCX. Esta última observação explica a aceleração da dinâmica cardíaca das preparações controle mediada pela adrenalina agindo sobre a atividade dos sistemas de transporte de Ca^{2+} , particularmente naqueles que promovem um relaxamento mais rápido. Contudo, o efeito mais evidente no presente trabalho esteve relacionado ao efeito usitrópico positivo de adrenalina, uma vez que Bers (1991) demonstrou que a estimulação adrenérgica também produz seu efeito cronotrópico positivo diminuindo a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} por meio da fosforilação da troponina I (TnI) via AMPc, aumentando assim a taxa de desligamento entre este íon e a troponina C, sendo então observado um relaxamento mais rápido na presença de β -agonistas. Assim, a adrenalina exerce as respostas aqui observadas não apenas promovendo uma maior taxa de relaxamento pela redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , mas também por estimular a atividade transportadora dos mecanismos responsáveis pela diminuição dos níveis citosólicos de Ca^{2+} (especialmente NCX, mas também possivelmente estimulando a Ca^{2+} -ATPase da SL). Subramani et al. (2005) ressaltam que apesar do NCX ser considerado a principal via de redução citosólica de Ca^{2+} durante a diástole no coração de anuros, a Ca^{2+} -ATPase da SL pode exercer algum

papel funcional, uma vez que não existem estudos tratando do papel deste mecanismo transportador de Ca^{2+} pela ausência de bloqueadores que atuem especificamente sobre ela.

Por outro lado, dentre os efeitos resultantes da exposição aguda ao Roundup Original[®] que poderiam exercer isoladamente (i.e., sem a estimulação adrenérgica) um efeito lusitrópico positivo estaria a produção de óxido nítrico estimulada pelo Roundup Original[®]. Sys et al. (1997) demonstraram a presença de NO-sintase (NOS) no endotélio do endocárdio (EE) de *Rana esculenta* e assim concluíram que devido à proximidade do EE com relação aos miócitos subjacentes, a atividade da NOS produzida no EE poderia exercer ação direta sobre a contratilidade miocárdica. Em *Lithobates catesbeianus*, apesar de não haver estudos que tenham analisado a produção de NO pelo endotélio cardíaco, a presença deste gás e seu papel como modulador da respiração em preparações isoladas de tronco cerebral de indivíduos no estágio pré-metamórfico já foram observadas (HEDRIK et al., 2005).

Koyama et al. (1997) observaram que o surfactante aniônico conhecido como LES (sodium polyoxyethylene lauryl ether sulfate) produziu vasorelaxamento em segmentos de anéis aórticos de ratos por meio da ativação da NOS, uma vez que o LES ocasionou um aumento significativo na produção de NO em culturas de células endoteliais. Ademais, Langer et al. (2003) demonstraram que doadores de NO (e.g., SNAP, spermine-NONO) apresentaram um efeito inotrópico positivo em cardiomiócitos de rato, resultando em uma relação força-frequência positiva, particularmente a elevadas frequências, conforme o observado no presente estudos para as tiras ventriculares de rã-touro após a exposição a 96 horas ao Roundup Original[®]. De acordo com esses autores, este efeito inotrópico é mediado por uma estimulação da guanilil-ciclase solúvel (sGC) pelo NO, fazendo com que a sGC interaja com proteínas Gas, comumente associadas

aos β -adrenocaptors. A ativação subsequente da adenilato-ciclase (AC) aumenta os níveis citosólicos de AMPc e ativa a proteína quinase A (PKA), resultando na fosforilação de canais de membrana e, assim, resultando em um efeito inotrópico positivo.

Dessa forma, levando-se em consideração uma possível modulação nitrérgica no sistema cardiovascular de girinos de rã-touro e a similaridade química entre o surfactante POEA (presente na formulação do Roundup Original[®]) e o LES, uma elevação da produção de NO pelo EE mediada pelo POEA pode ser sugerida. De especial relevância para a presente discussão está o fato que o NO modula diretamente a contratilidade cardíaca por provocar um aceleração do relaxamento de miócitos ventriculares de ratos (LAYLAND et al., 2002), da mesma forma que foi observado no presente estudo para as tiras ventriculares de girinos de rã-touro. Ainda de acordo com esses autores, o efeito do NO parece estar também relacionado com a redução da afinidade dos miofilamentos pelo Ca^{2+} . Vale salientar que esta redução do THR promovida pela exposição dos girinos de rã-touro após a exposição a uma formulação a base de glifosato também foi observada por COSTA et al. (2008) para o Roundup Original[®].

Entretanto, quando as tiras foram submetidas a adrenalina e o Roundup Original[®] efeito lusitrópico positivo promovido pelos compostos foi claramente anulado.

Uma possível resposta para este resultado pode estar correlacionada a incapacidade do músculo cardíaco em obter energia em uma magnitude compatível às elevações da demanda de ATP, especialmente a frequência de estimulação é elevada nessas condições (alta adrenalina + Roundup Original[®]). Conforme descrito nos parágrafos anteriores, tanto o Roundup quanto a adrenalina interferem no desempenho

cardíaco estimulando mecanismos transportadores de cálcio e/ou aumentando a taxa de desligamento entre o Ca^{2+} e a troponina C, mecanismos estes diretamente dependentes de ATP. À medida que a frequência de estimulação é aumentada, a formação de pontes cruzadas e, conseqüentemente, o consumo de ATP também aumentam. Tais efeitos fazem com que o efeito inotrópico positivo do Roundup desapareça após a adição de adrenalina.

Tais efeitos não foram observados no grupo exposto ao Roundup Transorb R[®], uma vez que não foram encontradas variações estatisticamente relevantes entre os grupos RTR e CT_{RTR} em nenhum dos parâmetros *in-vitro*.

5.2 Parâmetros de função respiratória

A análise dos valores de VO_2 obtidos para o grupo Controle (CT, n =17) evidencia que os girinos de rã-touro apresentam um padrão ventilatório típico de oxirreguladores, sendo capazes de manter a VO_2 relativamente constante em uma faixa de PO_2 que compreende desde a normóxia até a tensão hipóxica de 40 mmHg. Tais resultados indicam que, nas condições experimentais utilizadas, os animais se mostraram bem adaptados a situações de hipóxia, uma vez que foram capazes de manter a VO_2 constante na maioria das tensões de oxigênio a que foram submetidos. A tensão de O_2 de 20 mmHg causou uma diminuição da VO_2 ($P < 0,05$), o que demonstra que nessa tensão, especificamente, os ajustes fisiológicos para a manutenção da taxa metabólica basal não foram mais eficientes e os animais passaram a se comportar como oxiconformistas. Tais resultados sugerem que a tensão crítica de O_2 (P_c) desta espécie deve encontrar-se entre 40 e 20 mmHg, corroborando os resultados obtidos por Crowder et al. (1998), que descreveram valores de P_c entre 27,7 e 37,7 mmHg para girinos de rã-

touro em diversos estágios de desenvolvimento, inclusive no estágio em que se encontravam os animais do presente estudo.

A comparação entre os dados observados para o grupo CT e GLI demonstrou que a exposição ao glifosato ocasionou uma diminuição ($P < 0,05$) da VO_2 nas tensões hipóxicas de 120, 80, 60 e 40 mmHg. Tal efeito pode estar relacionado aos resultados obtidos na análise morfológica da pele dos girinos expostos ao glifosato, a qual revelou que o contato com tal composto, além de outros efeitos, causou um espessamento acentuado da camada epitelial, que poderia gerar um aumento na distância difusional para a tomada de O_2 , diminuindo, desta forma, a condutância desse gás pelo organismo. Tal diminuição da condutância poderia explicar, em parte, a diminuição dos valores de VO_2 apresentada pelos animais expostos em condições de hipóxia, uma vez que, a dificuldade em captar O_2 pela pele somada aos menores valores de PO_2 poderia acarretar no decréscimo da VO_2 presenciado nos animais expostos ao Glifosato.

Entretanto, quando comparados os grupos CT e RTR, observou-se que a exposição ao herbicida Roundup Transorb R[®] provocou um aumento ($P < 0,05$) da VO_2 nas tensões hipóxicas de 100, 80 e 40 mmHg. Segundo dados obtidos por Rowe et al, 1997, a exposição de embriões de rã-touro a metais traço, em condições de normóxia, provocou um aumento semelhante dos valores de VO_2 em um período experimental que compreendeu desde a eclosão até 80 dias de desenvolvimento. Os resultados levaram os autores a concluir que tal elevação da demanda metabólica possivelmente decorre do custo energético necessário para o reparo dos danos causados pela exposição e/ou para a detoxificação dos contaminantes.

Um aumento da demanda metabólica, evidenciado pelos maiores níveis de lactato no sangue e fígado, também foi descrito por Sancho et al. (1998) frente a exposição da enguia europeia (*Anguilla anguilla*) à concentrações subletais do

pesticida Fenitroion. Em um estudo semelhante, Crestani et al. (2006) observaram um grande aumento em vias anaeróbicas de produção de energia no fígado em resposta à exposição de jundiá, *Rhamidia quelen*, ao herbicida Clomazone. De relevância para o presente estudo é o fato de que Cluszczak et al. (2006) encontraram aumentos significativos no níveis de lactato na musculatura branca de piavas (*Leoporinus obtusidens*) quando expostas às concentrações de 3, 6, 10 e 20 mg/L de Roundup® por 96 horas. Segundo tais autores, tal aumento é um indício de que a exposição ao herbicida ocasionou um aumento da demanda energética.

Desta forma, no presente estudo, um processo semelhante pode ter ocorrido nos girinos de rã-touro quando expostos ao Roundup Transorb R®. Tal efeito deve ter sido desencadeado pela composição de surfactantes e componentes inertes presentes nesta formulação, que conferem maior toxicidade a este composto em relação ao glifosato puro.

Tendo em vista que a análise histológica revelou que exposição ao Roundup Transorb R® não provocou um espessamento acentuado na epiderme, o que denota que não tenha causado grandes alterações na difusibilidade da pele, o mesmo não deve ter impedido o aumento da captação de O₂ necessário para os processos de detoxificação do organismo, relacionados com o aumento da VO₂ apresentado pelos indivíduos do grupo RTR.

Em contraste, a análise dos resultados obtidos para os animais expostos ao Roundup Original® indicou que este xenobiótico não provocou mudanças significativas na VO₂ em relação ao grupo CT (P > 0,05). Entretanto, tendo em vista que a exposição ao Roundup Original® causou uma grande hipertrofia na camada epidérmica pode-se sugerir que o aumento da VO₂, necessário para a detoxificação deste composto, tenha sido mascarado pela maior dificuldade na captação de O₂ promovido pelo espessamento da pele dos animais.

5.3 Parâmetros morfológicos de pele dorsal

A análise das lâminas histológicas confeccionadas a partir da pele dorsal dos girinos, pertencentes aos três grupos experimentais, revelou que a porção cutânea mais afetada pela a exposição aos xenobióticos foi a epiderme, região que se encontra em contato direto com o ambiente. Como descrito no item 1.4.2, a pele de anfíbios atua como a principal região de troca gasosa em indivíduos em estágios pré-metamórficos sendo que a epiderme desempenha uma importante função por permitir a entrada de gases por difusão, que, posteriormente, atingirão as camadas mais profundas do tecido onde se encontram os capilares (SCHWINGER et al., 2001).

Animais pertencentes ao grupo GLI apresentaram as maiores alterações na camada epidérmica onde foram encontrados eventos de inchaço celular, fragmentação das cromátides, migração das células para a periferia bem como um notável espessamento em comparação com o grupo CT.

Os efeitos mais destacáveis nos animais pertencentes aos grupos RO foram o grande inchaço celular, que promoveu um espessamento da parede epitelial, e a presença de células com cromátides fragmentadas. Tais características também foram presenciadas no grupo RTR embora em uma frequência muito menor indicando que, apesar de existir uma similaridade entre os efeitos provocados pelo Roundup Original[®] e o Roundup Transorb R[®], a exposição à formulação Transorb R[®] provocou alterações mais brandas sobre a pele dos girinos.

Diversos estudos ecotoxicológicos com teleósteos encontraram efeitos semelhantes em resposta a exposição à herbicidas a base de glifosato, principalmente sobre estruturas branquiais. Oluwatoyin (2007), em estudo com tilápia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*), utilizou concentrações de glifosato de 0,5 à 1,07 g/L pelo período de 96 horas e encontrou notáveis alterações branquiais como processos de soerguimento epitelial, espessamento do epitélio das lamelas primárias e fusão as lamelas secundárias. De forma semelhante, Shiogiri et al. (2012), averiguando o efeito de por 48 h de exposição a concentrações entre 3 e 4 mg/L do herbicida Roundup[®] Ready sobre as brânquias de *Piaractus mesopotamicus*, encontraram respostas como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, edemas e proliferação de células de muco. Danos estruturais comparáveis também foram descritos por Jiraungkoorskul et al, (2002) pela exposição de tilápias ao Roundup Original[®] em concentrações que variaram entre 16,8 à 46,9 ppm, observando tanto hiperplasia e hipertrofia quanto soerguimento epitelial e aneurismas.

Segundo Mallat (1985), os efeitos descritos nos trabalhos citados anteriormente são modificações estruturais de defesa, comuns em resposta à contaminação por poluentes. Tais respostas histopatológicas aumentam a distância de difusão entre o sangue e a água, diminuindo a absorção dos agentes tóxicos pelas brânquias. Entretanto, Fernandes et al. (2007) argumentam que tais modificações também podem dificultar a tomada branquial de O₂, necessário para o metabolismo oxidativo e detoxificação.

Estudos histopatológicos enfocando as alterações estruturais da pele de girinos em resposta a poluentes ainda são muito escassos literatura, entretanto, Bueno-Guimarães et al. (2001) , em um trabalho pioneiro, avaliaram o efeito da exposição por 24, 48 e 96 horas às concentrações de 0,5 e 2,0 ppm de formaldeído sobre a pele e brânquias de girinos de rã-touro e averiguaram efeitos relevantes. Em semelhança com os resultados obtidos no presente estudo, a análise histológica da pele dorsal dos girinos expostos ao formaldeído revelou a existência de hiperplasia tanto da camada epidérmica quanto do epitélio branquial em todas as concentrações testadas.

Tal qual citado no item 1.4.2, a pele de girinos representa órgão respiratório essencial e o espessamento da parede epitelial em virtude da intoxicação por poluentes pode, em semelhança ao que ocorre nas brânquias de teleósteos, reduzir a tomada de O₂ pelos girinos. Ressalta-se que a literatura disponível para o estudo dos efeitos da contaminação ambiental sobre a pele de girinos ainda é muito escassa, entretanto, em semelhança com Bueno-Guimarães et al. (2001), os dados gerados pelo presente trabalho dão indícios que tal estrutura mostrou-se muito sensível à exposição aos herbicidas analisados, uma vez que sofreram alterações pronunciadas mesmo quando expostos a uma concentração muito baixa (1 ppm e.a.g.).

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os herbicidas analisados provocam efeitos adversos sobre a função cardiorrespiratória de girinos de rã-touro e que a formulação de Roundup Original[®] é potencialmente mais nociva aos parâmetros analisados que as demais formulações. Tal característica provavelmente é atribuída ao surfactante (POEA) bem como aos componentes “inertes” presente na formulação do Roundup[®].

Ademais, a exposição por 96h a concentrações ambientalmente relevantes dos herbicidas, apesar de não levarem à mortalidade, resultaram em efeitos subletais que, em ambientes naturais, poderiam vir a ameaçar o desenvolvimento e estabelecimento de populações de anuros.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo para girinos de rã touro, *Lithobates catesbeianus*, em condições controle e após exposição a concentrações ambientalmente relevantes (1 ppm) de glifosato e das formulações comerciais Roundup Original[®] e Roundup Transorb R[®] por 96 horas permitiram as seguintes conclusões:

- a. O nível de atividade dos girinos foi significativamente elevado pela exposição ao glifosato, sugerindo uma resposta de fuga ao estímulo estressor que poderia desviar energia dos processos morfogenéticos;
- b. Todos os herbicidas testados causaram alterações morfológicas no tecido cutâneo, incluindo inchaço celular e consequente espessamento da parede epitelial e ruptura de cromátides, o que indica que este órgão apresenta grande sensibilidade à exposição a poluentes;
- c. A $\dot{V}O_2$ dos girinos, em condições controle, manteve-se constante até a tensão de O_2 de 40 mmHg, sugerindo que a tensão crítica de O_2 desta espécie deve estar entre 40 e 20 mmHg;
- d. A exposição ao glifosato causou redução da $\dot{V}O_2$ em relação aos valores controle, efeito este possivelmente relacionado às alterações causadas por este composto na pele destes animais, aumentando as distâncias difusionais e, consequentemente, reduzindo a tomada de O_2 ;
- e. O Roundup Transorb R[®] elevou os valores de $\dot{V}O_2$ em relação ao controle, sugerindo um efeito pronunciado do surfactante e/ou dos componentes inertes presentes nesta formulação sobre este parâmetro;
- f. A falta de diferença entre os valores de $\dot{V}O_2$ controle e os obtidos após exposição ao Roundup Original[®] pode sugerir que o aumento da taxa metabólica induzido

pelo estresse causado pela exposição seja mascarado pelo espessamento da camada epidérmica, que dificulta a tomada de O₂.

- g. A frequência cardíaca *in loco* de girinos não foi alterada pela exposição ao glifosato e ao Roundup Original[®], mas reduziu-se após exposição ao Roundup Transorb R[®].
- h. A exposição ao glifosato causou diminuição significativa da massa ventricular;
- i. A exposição aos diferentes xenobióticos não promoveu efeitos adversos sobre o desempenho das tiras ventriculares sob a frequência de estimulação subfisiológica de 0,2 Hz, uma vez que nenhum dos parâmetros analisados (Fc, TPT e THR) foi significativamente alterado;
- j. . A exposição ao Roundup Original[®] foi a única que acarretou em alterações frente ao aumento de frequência de estimulação, provocando aumentos na força de contração e diminuições no tempo de relaxamento. Sugere-se que uma possível indução, desencadeada pelo surfactante presente no herbicida, da produção de NO no endotélio cardíaco possa desencadear tal efeito. A associação entre a adrenalina e a exposição ao Roundup Original[®] anulou completamente os incrementos de força e a aceleração do relaxamento, sugerindo a existência de uma interação antagônica entre o Roundup Original[®] e a adrenalina.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANELLI-JR, L.C. Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup® sobre a função cardiorrespiratória de matrinxã *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). 2010. 91 f. Tese (Doutorado Ciências Fisiológicas) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2010.

AHO, E. & VORNANEN, M. Ca²⁺-ATPase activity and Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation. **J. exp. Biol.**, v. 201: p. 252-232, 1998.

ALTIG, R., A primer for the morphology of anuran tadpoles, **Herpet. Conserv. and Bio.**, v.2, p. 71-74, 2007.

ALFORD, R.A.; RICHARDS, S.J; Global amphibian decline: a problem in applied ecology. **Ann. Rev. Ecol. System**, v. 30, p.133-165, 1999.

ANDRÉN C, NILSON G., Distribution and conservation of endangered Swedish reptiles and amphibians. In Codon J, editor. **Proceedings of European Herpetological Symposium 1980 Oxford**, UK: Cotwold Wild Life Park. p.65-67, 1981.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRI (ANVISA), Roundup Transorb R®, Registro no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento- MAPA SOB N° 09306, **Diário Oficial de União**, Distrito Federal, Brasil, 22 de fev de 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM); Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians E 729–96. In: **Annual Book of Standards**, v. 11.05, p. 220–240, 2000.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA), Report of the AVMA Panel on Euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 669, 2001.

AZEVEDO, R. A.; CARVALHO, F. H. & DE BRITO-GITIRANA. Hyaluronan in the epidermal and the dermal extracellular matrix: Its role in cutaneous hydric balance and integrity of anuran integument. **Micron**, v. 38, p. 607-610, 2007.

AZEVEDO, R. A.; PELLI, A. A.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SANTANA, A. S DE J.; FELSEMBURGH, F. A.; DE BRITO GITIRANA, L. Structural aspects of the Eberth-Katschenko layer of *Bufo ictericus* integument: histochemical characterization and biochemical analysis of the cutaneous calcium (Amphibian, Bufonidae). **Micron**, v. 36, p.61-65, 2005.

BARR, L.; DEWEY, M.M; BERGUER, W; Propagation of action potentials and structure of the nexus in cardiac muscle. **J Gen Physiology**, p. 797-823, 1965.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. 533-540, 1993.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. & BERS, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **J. Physiol.**, v. 476, p. 279-293, 1994

BASSANI, J.W.W.; YUAN, W. & BERS, D.M. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 268 p. 1313-1329, 1995.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. & BERS, D.M. A method to estimate mitochondrial Ca^{2+} uptake in intact cardiac myocytes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1699-1707, 1996.

BECKNBACH, A.T. Influence of the body size and temperature in the critical oxygen tension of some Plethodontid salamanders. **Physiol Zoo.**, v. 48, p. 338-347, 1975.

BERS, D.M. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. **Am. J. Physiol.**, v. 248, p. 366-381, 1985.

BERS, D.M. Ca regulation in cardiac muscle. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 23, p. 1157-1162, 1991.

BERS, D.M. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, 2nd edn. Dordrecht, Kluwer **Academic Publishers**, p 258, 2001.

BERS, D.M. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction, **Circ. Res.**, v.2000, p. 275-281, 2009

BOONKOO, V.; ALVARAD, R.H. Adenosinetriphosphatase activity in gills of larval *Rana catesbeiana*. **Am J Physiol**, v. 220, p. 1820-1824, 1971.

BORGES-MARTINS, M.; DI BERNARDO, M.; VINCIPROVA, G. & MEASEY, G. J. **Geographic distribution. Rana catesbeiana. Herpetological Review.** EUA, v. 33, p. 319, 2002.

BOSSEN, E.H. & SOMMER, J.R. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. **Tissue & Cell**, v. 16, p. 173-178, 1984.

BRAGG, A.N. Population fluctuations in the amphibian fauna of levelnd County, Oklahoma, during the past twenty-five years, **Southwest Nat**, v. 5, p. 165-169, 1960.

BRAINERD, E.L.; OWERKOWICZ, T. Functional morphology and evolution of aspiration breathing in tetrapods. **Respir. Physiol. Neurobiol.** v. 154, p. 73–88, 2006.

BRAUSCH, J.M.; SMITH, P.N. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 52, p. 217–221, 2007.

BRIDGES, C.M. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 39, p. 91–96, 2000.

BRODDE, O.E. β -1 and β -2 adrenoceptor polymorphisms: Functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. **Pharm & Therap**, v. 117, p. 1–29, 2008.

BROOMHALL, S.D. Measuring chemical impacts on amphibians: ecotoxicity and behavioural data in governmental regulation. **Appl. Herpetol**, v. 2, p. 259–285, 2005.

BUENO-GUIMARÃES, H. M., FERREIRA, C. M., GARCIA, M. L. B., SALDIVA, P. H. N. Tadpole Epithelium Test: Potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 67, p. 202–209, 2001.

BURGGREN, W.; DOYLE, M. Ontogeny of regulation of gill and lung ventilation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Respir. Physiol**, v. 66, p. 279–291, 1986.

BRUNEAU, M.; MAGNIN, E. Croissance et reproduction des ouaou , *Rana catesbeiana* , Shaw 1802 (Amphibia Anura) des Laurentides au nord de Montréal. **Canadian Journal of Zoology**, v. 58, p. 175-183, 1980.

BRUNELLI, E.; PERROTTA, E.; TRIPEPI, S. Ultrastructure and development of the gills in *Rana dalmatina* (*Amphibia, Anura*). **Zoomorph.**, v. 123, p. 203-211, 2004

BURRY, R.B.; DODD, C.K.J.R; FELLERS, G.M. Conservation of the amphibian fauna of the United States. Washington DC: **USDI Fish. Wildl. Serv. Resour. Publ.**, v. 134, p. 34, 1980.

CABRERA, L; COSTA, F.B.; PRIMEL, E.G. Estimativa de risco de contaminação de águas por pesticidas na região sul do estado RS, **Quim. Nova**, v. 31, p. 1982-1986, 2008.

CALORE, E.E.; PEREZ, N.M.; HERMAN, M.M. Morphometric studies of cardiac myocytes of rats chronically treated with an organophosphate, **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 66, p. 447-450, 2007.

CALOW P.; SIBLY, R.M. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. **Funct. Ecol.**,v. 4, p. 283–288, 1990.

CAMBAR R, MARROT B. Table cronologique du developpement de la Grenouille agile (*Rana dalmatina*). **Bull. Biol. France-Belgique**, v. 88, p.168–177, 1954

CARMELIE, E.; VERRRCKE, J. Adrenaline and plateau phase of cardiac action potential importance of Ca^{2+} , Na^{+} and K^{+} conductive, **Euro J Phy**, v. 313, p. 300-&, 1969.

ÇAVAŞ, T. & KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v. 22, p. 263-268, 2007

CHAPMAN, R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. 535-552, 1983.

CHRISTIN, M.S; GENDRON A.D.; BROUSSEAU, P.; MENARD, L.; MARCOGLIESE, D.J.; CYR, D.; RUBY, S.; FOURNIER, M.; Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.22, p.1127–1133, 2003.

CHUGUN, A.; TEMMA, K.; KONDO, H. & NUREBAYASHI, N. Ca^{2+} sensitivity and caffeine-induced changes in skinned muscle fibers of the carp, *Cyprinus carpio*. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 166, p. 412-417, 1996.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; CRESTANI M.; FONESCA M.B.; PEDRON F.A.; DUARTE, M.F.; VIEIRA, L.P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*), **Ecotoxicol. and Environmental Safety**, v.65, p.237-241, 2006.

COLOMO, F.; PIRODDI, N.; KRONNIE, G.; TESI, C. Active and passive forces of isolated myofibrils and fast skeletal muscle of frog. **J. Physiol.**, v. 500, p. 535-548, 1997

COOKE, A.S. Indicators of recent changes in the status in the British Isles of the frog (*Rana temporaria*) and toad (*Bufo bufo*). **J. Zoo. (London)**, v. 167, p. 161-178, 1972.

CORN, P.S, FOGLEMAN, J.C. Extinction of montane populations of the northern leopard frog (*Rana pipiens* in Colorado **J. Herp.** v. 18, p. 147-152, 1984.

COSTA, M.J.; RIVAROLI, L.; RANTIN, F.T.& KALININ, A.L. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. **J. therm. Biol.**, v. 25, p. 373-379, 2000.

COSTA, M.J.; MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; OLIVEIRA-NETO, A.L.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers and changes in heart function of bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles exposed to the herbicide Roundup® (glyphosate). **Ecotoxicol.**, v.17, p. 153-163, 2008.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environ. Health Persp.**, v.114, p. 1803–1806, 2006.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S, LAZZARI, R.; DUARTE, M. F.; MORSCH, V.M.; PIPPI, A.L.; VIEIRA, V.P. Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*, **Ecotoxicol. and Environmental Safety**, v.65, p. 48-55, 2006.

CROWDER, W.C.; NIE M.;ULTSCH, G.R. Oxygen Uptake in Bullfrog Tadpoles (*Rana catesbeiana*), **Jour. Ex. Zoo.**, v. 280, p. 121–134, 1998.

DAVIDSON, C., Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. **Ecological Applications**, v. 14, p.1892–1902, 2004.

DAVIS, E., LOIACONO, R., SUMMER, R.J., The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the β -adrenergic system. **British J. Pharm.**, v. 154, p. 584–597, 2008.

DE BRITO-GITIRANA, L.; AZEVEDO, R. A. Morphology of *Bufo ictericus* integument. **Micron**, v. 36, p. 532-538, 2005.

DELFINO, G; BRIZZI, R.; FERI, L. Chemical skin defense in *Bufo bufo*: na ultrastructural study during ontogenesis. **Zoologischer Anzeiger**, v. 234, p. 101-111, 1995.

DEVINE, G.J., , M.J., Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, v. 24, p. 281–306, 2007.

DORES, E.F.; 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, p. 27-36, 2001.

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.

DUKE, J.T.;ULTSCH, G.R. Metabolic oxygen regulation and conformity during submergence in the salamanders *Siren lacertina*, *Amphiuma means*, and *Amphiuma tridactylum*, and a comparison with other giant salamanders. **Oecologia**, v. 84, p. 16-23, 1990.

ELKAN, E. Mucopolysaccharides in anurans defence against desiccation. **Journal of Zoology (London)**, v. 155, p. 19–53, 1968.

FABIATO, A. & FABIATO, F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 276, p. 233-255, 1978.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **Am J Physiol.**, v. 245, p. 1-14, 1983.

FAQUAHAR, M.G.; PALADE, G. E. Cell junctions in amphibian skin. **The Journal of Cell Biology**, v. 26, p. 263-291, 1965.

FARRELL, A.P.; JONES, D.R. The Heart. In: HOAR WS, RANDALL DJ, FARRELL AP (eds) **Fish physiology: the cardiovascular system** v. 12A. Academic Press Inc., New York, p. 1-88, 1992

FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. Cutaneous gas exchange in vertebrates: Design, patterns, control, and implications. **Biol. Rev.** v. 60, p. 1-45, 1985.

FEIO, R. N. Diversidade de anfíbios no Brasil. In: **IX Encontro Nacional de Rincultura, II International Meeting on Frog Research and Technology**. Santos, p.165-168, 1997

FELDMAN, J.F.; DEL NEGRO, C.A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 232-241, 2006.

FELDMAN, J.L.; MCCRIMMON D.R., Neural control of breathing. In: **Fundamental neuroscience**, Second edition, 967-990. New York: Academic, 2003.

FELLERS, G.M., MC CONNELL, L.L., PRATT, D., DATTA, S., Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada mountains of California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2170-2177, 2004.

FERNANDES, M.N., MORON, S.E., SAKURAGUI, M.M., Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: FERNANDES, M.N., GLASS, M.L., RANTIN, F.T., KAPOOR, B.G. (Eds.), **Fish Respiration and Environment**. Science Publishers Inc., Enfield, p. 93–120, 2007.

FORBES, M.S. & SPERELAKIS, N. Ultrastructure of lizard ventricular muscle. **J. Ultrastruc. Res.**, v. 34, p. 439-451, 1971.

FRAKER, S.L.; SMITH, G.R, Direct and interactive effects of ecologically relevant concentration of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. *Environ. Toxicol.*, v. 19, p. 250-256, 2004.

FROST, D. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.3 (12 February, 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>
American Museum of Natural History, New York, USA, 2011.

GALLANT, A.L., KLAVER, R.W., CASPER, G.S., LANNOO, M.J. Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation. **Copeia**, p. 967–979, 2007

GALANTE, R.J.; KUBIN, L.; FISHMAN, A.P.; PACK, A.I., Role of chloride-mediated inhibition in respiratory rhythmogenesis in an in vitro brainstem of tadpole, *Rana catesbeiana*. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 492, p. 545–558, 1996.

GARGAGLIONI, L.H.; MILSON W.K. Control of breathing in anuran amphibians, **Comp Bioch and Phyol**, v. 147, p. 665– 684, 2007.

GDOVIN, M. J.; TORGERSON, C. S.; REMMERS, J. E. The fictively breathing tadpole brainstem preparation as a model for the development of respiratory pattern generation and central chemoreception. **Comp Bioch and Phy**, v. 124, p. 275–286, 1999.

GESSER, H. Cardiac force-interval relationship, adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. **J. Comp. Physiol. B**, v. 166, p. 278-285, 1996.

GIBBS, E.L.; NACE, G.W.; EMMONS M.B. The live frog is almost dead. **BioScience**, v. 21, p. 1027-1034, 1971.

GIESY JP, DOBSON S, SOLOMON KR. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000

GLUSCZAK, L. Parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) após a exposição a uma formulação comercial de glyphosate. Santa Maria, RS. Dissertação (Doutorado em Bioquímica toxicológica)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica, **Universidade Federal de Santa Maria**, p.26, 2008.

GOSNER, K.L.; A simple table for staging anuran embryos ad larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 10, p. 1387-1397, 1960.

GREVEN, H.; ZANGER, K.; SCHWINGER, G. Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia). **Journal of Morphology**, v. 224, v. 15-22, 1995

GRINNELL, J.; STORER, T.I. **Animal life in the Yosemite**. Berkeley, CA, USA: University of California, p.752.,1924

GROSSMAN, A.; FRUCHGOTT, R.F. Effects of experimental calcium concentration on distribution + exchange of calcium in resting+ beating guinea-pig auricles, **J Pharm and Exp Therap**, v. 143, p. 107-&, 1967.

GWATHMEY, J.K. & MORGAN, J.P. Calcium handling in myocardium from amphibian, avian and mammalian species: the search for two components. **J. Comp. Physiol.**, v. 161, p. 19-25, 1991.

HAMMERSON, G.A. Bullfrogs eliminating leopard frogs in Colorado ? **Herp Rev**, v. 13, p. 115-116, 1982

HARRIS, M.L., BISHOP, C.A., STRUGER, J., VAN DEN HEUVEL, M.R., VAN DER KRAAK, G.J., DIXON, G., RIPLEY, B., BOGART, J.,.The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetland. I. Genetics, physiology and biochemistry of breeding adults and young-of-the year. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, p. 1338–1350, 1998.

HAYES, M.P.; JNNINGS, M,R. Decline of rained frog species in western North America: are bull frogs (*Rana catesbeiana*) responsible? **J. Herp.**, v. 20, p. 490-509, 2000

HEDRICK, M.S. CHEN AK, JESSOP KL Nitric oxide changes its role as a modulator of respiratory motor activity during development in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) **Comp Biochem Physiol A**. v. 142, p. 231–240, 2005.

HELLE, K.B. Structures of functional interest in the myocardium of lower vertebrates. **Comp Biochem Physiol A**, v. 76, p. 447-452, 1983.

HEYER, W.R.; RAND, A.S; DA CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; Declinations, estinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brasil and their evolutionary implications. **Biotropica**, v. 20, p. 230-235, 1988

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. **Biochemical Adaptation**. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1984.

HOULAHAN, E.; FINDLAY, C.S.; SCHIMIDT, B.R.; MEYERS, A.H.; KUZMIN, S.L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, p. 52-54, 2000

HOVE-MADSEN, L. & GESSER, H. Force-frequency relation in the myocardium of rainbow trout: effects of K⁺ and adrenaline. **J. Comp. Physiol. B**, v. 159, p. 61-69, 1989.

HOVE-MADSEN, L. & TORT, L. L-type Ca²⁺ current and excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 2061-2069, 1998.

HOWARD, R.D. The evolution of mating strategies in bullfrogs, *Rana catesbeiana*. **Evolution**, v. 32, p. 850–871, 1978

HOWE, C.M.; BERRILL, M.; PAULI, B.D.; HELBING, C.C.; WERRY, K.; VELDHOEN, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American Frog Species Environ **Toxicol Chem**, v. 23, p. 1928–1938, 2004

HUGHES, G.M. Respiratory responses to hypoxia in fish. **Amer. Zool.**, v. 13, p. 475-489, 1973.

HUGHES, G. M., ALBERS, C., MUSTER, D., GÖTZ, K.H., Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20 °C and the effects of hypoxia. **J. Fish Biol.**, v. 22, p. 613-628, 1983.

HULTBERG, M. Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 23, p. 19–22, 2007

JENSEN, D. The aneural heart of hagfish. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 127, p. 444-458, 1965.

JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J.; Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Adams SM (ed) Biological indicators of stress in fish., **American Fisheries Symposium**. Bethesda, Maryland,. v. 8, p. 67–79, 1990

JOHANSSON, M.; PIHA, H.; KYLIN, H.; MERILA, J. Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 25, p. 3164–3170, 2006

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicol.**, v.166, p.139-160, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Ed. Livraria Santos, 1983.

KARDONG, K.V. **Vertebrates: Comparative Anatomy, Functional, Evolution**. Fifth Edition. New York: McGraw-Hill, 2008

KEEN, J.E.; FARRELL, A.P.; TIBBITS, G.F. & BRILL, R.W. Cardiac physiology in tunas. II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force-frequency relationship in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **Can. J. Zool.**, v. 70, p. 1211-1217, 1992.

KINKEAD, R. Phylogenetic trends in respiratory rhythmogenesis: Insights from ectothermic vertebrates, **Respir. Physiol. & Neurobiol.**, v. 168, p. 39–48, 2009.

KLAUTZ, R.J.M.; BAAN, J. & TEITEL, D.F. The effect of sarcoplasmic reticulum blockade on the force/frequency relationship and systolic contraction patterns in the newborn pig heart. **Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)**, v. 435, p. 130-136, 1997.

KOYAMA, H.; NAGAI, T.; TAKEUCHI, H.; HILLYARD, S.D. The spinal nerves innervate putative chemosensory cells in the ventral skin of desert toads, *Bufo alvarius*. **Cell Tissue Research**, v. 304, p. 185-192, 2001.

KOYAMA, K.A.; KOYAMA, K.Y.; GOTO, K. Cardiovascular effects of a herbicide containing glufosinate and a surfactant: *in vitro* and *in vivo* analyses in rats **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 145, p. 409-414, 1997.

KRAPIVINSKY, G.; GORDON, E.A.; WICKMAN, K.; VELIMIROVIC, B.; KRAPIVINSKY, L. CLAPHAM, D.E. The G-protein-gated atrial channel I-kach is a heteromultimer of 2 inwardly rectifying K⁺ channel proteins, **Nature**, v. 374, p. 135-141, 1995.

LANGER, M.; LÜTTECKE, D.; KLAUS-DIETER SCHLÜTER, K.D. Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. **Pflugers. Arch. – Eur. J. Physiol.**, v. 447, p. 289–297, 2003.

LARSON, P.M.; REILLY, S. M. Functional Morphology of Feeding and Gill Irrigation in the Anuran Tadpole: Electromyography and Muscle Function in Larval *Rana catesbeiana*, **Jorn. Morph.**, v. 255, p. 202–214, 2003

LAYLAND, J.; LI, J.M.; SHAH, A.M. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. **J. Physiol.**, v. 540, p. 457-467, 2002.

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

LEKNES, I.L. Morphometric analysis of myocardial cells in a teleost. **Anat. Anz.**, v. 155, p. 169-172, 1984.

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.

LILLYWHITHE, H.B., ZIPPEL, K.C. & FARRELL A.P. Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 124, p. 369-382, 1999

MACKEY, M.J., BOONE, M. Single and interactive effects of malathion, overwintered green frog tadpoles, and cyanobacteria on gray treefrog tadpoles. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 28, p. 637–643, 2009

MALLAT, J., Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can. J. Fish Aquat.** v. 42, p. 630–648, 1985.

MANN, R.M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C. B.; WILSON, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2903–2927, 2009

MARENGO, F.D.; WANG, S-Y & LANGER, G.A. The effects of temperature upon calcium exchange in intact cultured cardiac myocytes. **Cell Calcium**, v. 21, p. 263-273, 1997.

MAYLIE, J.& MORAD, M. Evaluation of T- and L-type Ca^{2+} currents in shark ventricular myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 38, 1995.

MCCALL, E. & ORCHARD, C.H. The effect of acidosis on the interval-force relation and mechanical restitution in ferret papillary muscle. **J. Physiol.**, v. 432, p. 45-63, 1991.

MCINDOE R., SMITH D.G. Functional anatomy of the internal gills of the tadpole *Litoria ewigni* (Anura: Hylidae). **Zoomorphology**, v. 104, p. 280–291, 1984.

MEROVICH, C.E. & HOWARD, J.H. Amphibian use of constructed ponds on Maryland's eastern shore. **Journal of the Iowa Academy of Science**, v. 107, p. 151–159, 2000.

MIKAMI, A.; IMOTO, K.; TANABE, T.; NIDOME, T.; MORI, Y.; TAKESHIMA, H.; NARUMIYA, S.; NUMA, S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. **Nature**, v. 340, p. 230-233, 1989.

- MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. & LEITE, C.M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 399-408, 1992.
- MILSOM, W.K. The phylogeny of central chemoreception. **Respir. Physiol. & Neurobiol.**, v. 173, p. 195–200, 2010.
- MISQUITTA, C.M.; MACK, D.P. & GROVER, A.K. Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. **Cell Calcium**, v. 25, p. 277-290, 1999.
- MITRA, R., MORAD, M. Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated K^+ currents in mammalian gastric smooth muscle cells. **Science**, v. 229, p. 269-272, 1985.
- MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C. B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v.81, p. 781-787, 2010.
- MØLLER-NIELSEN, T. & GESSER, H. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling at 20 and 10 °C in rainbow trout myocardium. **J. Comp. Physiol. B**, v. 162, p. 526-534, 1992.
- MONSANTO COMPANY, Roundup Transorb, Registro no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento- MAPA SOB N° 04229. Monsanto do Brasil Ltda, Brasil, 2007
- MORAD, M. & ORKAND, R.K. Excitation-contraction coupling in frog ventricle: evidence from voltage-clamp studies. **J. Physiol.**, v.219, p. 167-189, 1971.
- NAKAI, J.; OGURA, T.; PROTASI, F.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; ALLEN, P.D. & BEAM, K.G. Functional nonequality of the cardiac and skeletal ryanodine receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 1019-1022, 1997.

NIEDERGERKE, R.; PAGE, S. Analysis of catecholamine effects in single atrial trabeculae of frog heart, **Proc. Royal Soc. B-Biol. Scien.**, v.197, p. 333-362, 1977.

OLUWATOYIN, A.S. Histopathology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles exposed to aqueous and ethanolic extracts of Ipomoea aquatica leaf, **Inter. Jour. of Fisher. and Aquacul.**, v.3, p. 244-257

ONIMARU, H.; HOMMA, I.; FELDMAN, J.L.; JANCZEWSKI, W.A. Point:Counterpoint: the parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Bötzinger complex (preBötC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. **J. Appl. Physiol.** v.100, p. 2094–2098, 2006.

ORLOFSKE, S.A.; HOPKINS, W.A., Energetics of metamorphic climax in the pickerel frog (*Lithobates palustris*). **Comp. Biochem. and Physiol**, v. 154, p. 191–196, 2009.

ORTIZ-SANTALIESTRA, M.E; FERNÁNDEZ-BENÉITEZ, M. J.; LIZANA, M.; MARCO A. Influence of a combination of agricultural chemicals on embryos of the endangered gold-striper salamander (*Chiglossa lusitanica*) **Arch. Enviro. Contam. Toxicol**, v.60, p. 672–680, 2011

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. London: Jet. Churchill Ltda, p. 965, 1960.

PERKINS, P.J.; HERMAN, J.; BOERMANS, H.J.; STEPHENSON, G.R.; Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.19, p. 940–945, 2000.

PROSSER, C.L. **Compar Animal Physiol**, Saunders, Philadelphia, p. 966, 1973

PROTAS, L.L; LEONTIEVA, G.R; Ontogeny of cholinergic and adrenergic mechanisms in the frog (*Rana temporaria*) heart. **Am. Physiol. Soc.** p. 150-161, 1992.

PRYOR, G.S. Growth Rates and Digestive Abilities of Bullfrog Tadpoles (*Rana catesbeiana*) Fed Algal Diets, **Journal of Herpetology**, v. 37, p. 560-566. 2003.

RAMIREZ, J.M.; VIEMARI, J.C. Determinants of inspiratory activity. **Respir. Physiol. Neurobiol.** v. 147, p. 145, 2005.

RANTIN, F.T., KALININ, A.L., GLASS, M.L., FERNANDES, M.N.,. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life in two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish. Biol.**, v. 41, p. 805-812, 1992

RANTIN, F.T.; GESSER, H.; KALININ, A.L.; GUERRA, C.D.R.; FREITAS, J.C. & DRIEDZIC, W.R. Heart performance, Ca²⁺ regulation and energy metabolism at high temperatures in *Bathygobius soporator*, a tropical, marine teleost. **J. therm. Biol.**, v. 23, p. 31-39, 1998.

RELYEA, R.A.; Predator cues and pesticides: A double dose of danger for amphibians. **Ecol. Appl.** v. 13, p. 1515–1521, 2003.

RELYEA, R.A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecol Appl**, v. 15, p. 1118–112, 2005.

RICHTER, D.W.; SPYER, K.M. Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of *in vivo* and *in vitro* models. **Trends Neurosci.** v. 24, p. 464–472, 2001.

ROCHA-MIRANDA, F.; MARTINS SILVA, M. J. & MENDONÇA, A. F. First occurrence of bull frogs (*Rana catesbeiana*) in Federal District, Central Brazil. **Froglog**, v. 74, p. 2-3, 2006.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.L.S. **Guia de Herbicidas, 5th edn.** Londrina, Grafmark, p 592, 2005.

RODRÍGUEZ-SERNA, M.; FLORES-NAVA, A.; OLVERANOVOA, M.A. et al. Growth and production of bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, at three stocking densities in a vertical intensive culture system. **Aquaculture Engineering**, v. 15, p. 233-242, 1996.

ROMANIN, C.; KARLSSON, J-O & SCHINDLER, H. Activity of cardiac L-type Ca²⁺ channels is sensitive to cytoplasm calcium. **Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)**, v. 421, p. 516-518, 1992.

ROWE, C.R; KINNEY, O.M., NAGLE R.N., CONGDON, J.D. Elevated Maintenance Costs in an Anuran (*Rana catesbeiana*) Exposed to a Mixture of Trace Elements during the Embryonic and Early Larval Periods. **Physiol. Zool**, v.71, p. 27-35, 1998.

SAINT-AUBAIN, M. L. The morphology of amphibian skin vascularization before and after metamorphosis. **Zoomorph.**, v.100, p. 55-63, 1985.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; FERNÁNDEZ, C; ANDREU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.41, p. 168-175, 1998.

SANTER R.M.; WALKER, M.G.; EMERSON, L.; WITTHAMES, P.R. On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (Teleostei), **Comp. Bioch. and Phys.**, v. 76, p. 453-457, 1983.

SCHWALBE, C.R. & ROSEN, P.C. Bullfrogs—the dinner guests we're sorry we invited. **Sonorensis**, v.19, p. 8–10, 1999.

SCHWINGER, G; ZANGER, K. GREVEN, H. Structural and mechanical aspects of the skin of *Bufo marinus* (Anura, Amphibia). **Tissue Cell**, v. 33, p. 541-547, 2001

SHEPHERD, N. & KAVALER, F. Direct control of contraction force of single frog atrial cells by extracellular ions. **Am J Physiol.**, v. 251, p. 653-661, 1986.

SHIELS, H.A., FARRELL, A.P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing Ca^{2+} to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. **J. Ex. Biol.**, v. 200, p. 1607-1621, 1997.

SHIOGIRIA, N.S.; PAULINO M.P.; CARRASCHI S.P., BARALD F.G, CRUZ C., FERNANDES M.N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environ. Toxicol. and Pharmacol.** v.34, p.388-396, 2012.

SPARLING, D.W.; MATSON, C.; BICKHAM, J.; DOELLING-BROWN, P. Toxicity of glyphosate as Glypro and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 25, p.2768–2774, 2006.

SUBRAMANI, S.;BALAKRISHNAN, S.; JYOTI, T.; SATHISHKUMAR, S.;MOHAMMED, A. A ; ARASAN S.; VIJAYANAN C. Force–frequency relation in frog-ventricle is dependent on the direction of sodium/calcium exchange in diastole. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 185, p. 193–202, 2005.

SMITH, J.C.; BUTERA, R.J.; KOSHIYA, N.; DEL NEGRO, C.; WILSON, C.G.; JOHNSON, S.M. Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. **Resp. Physiol.** v. 122, p. 131–147, 2000.

SULLIVAN, P. A.; HOFF, K. V. S.; HILLYARD, S.D. Effects of anion substitution on hydration behavior and water uptake of the red-spotted toad, *Bufo punctatus*: is there an anion paradox in amphibian skin? **Chemical senses**, v. 25, p. 167-172, 2000

SUTKO, J.L.; AIREY,J.A.; Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: Does diversity in form equal diversity in function? **Phy. Reviews** , v. 76, v. 1027-1071, 1996

SYS, S. U.; PELLEGRINO, D.; MAZZA, R.; GATTUSO, A.; ANDRIES L. J. ; TOTA,B. Endocardial endothelium in the avascular heart of the frog morphology and role of nitric oxide. **J. Exp. Biology**, v. 200, p. 3109–3118, 1997

SZAREK, J.; SIWICKI, A.; ANDRZEJEWSKA, A. TERECH-MAJEWSKA E, BANASZKIEWICZ T. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Mar. Environ. Res.**, v. 50, p. 263–266, 2000.

TERECH-MAJEWSKA, E.; SIWICKI, A.K.; SZWEDA, W. Modulative influence of lysozyme dimer on defense mechanisms in the carp (*Cyprinus carpio*) and European sheatfish (*Silurus glanis*) after suppression induced by herbicide. *Roundup*. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 7, p. 123–128, 2004.

THOMAS, M.J.; HAMMAN, B.N. & TIBBITS, G.F. Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, trout, dogfish and hagfish. **J. exp. Biol.**, v. 199, p. 1999-2009, 1996.

THOMPSON, D.G.;WOJTASZEK, B.F.; STAZNIK, B.; CHARTRAND, D.T.; STEPHENSON, G.R. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, p. 843–849, 2004.

TIBBITS, G.F.; KASHIHARA, H.; THOMAS, M.J.; KEEN, J.E. & FARRELL, A.P. Ca²⁺ transport in myocardial sarcolemma from rainbow trout. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 453-460, 1990.

TIBBITS, G.F.; HOVE-MADSEN, L. & BERS, D.M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. **Can. J. Zool.**, v. 69, p. 2014-2019, 1991.

TIBBITS, G.F.; MOYES, C.D. & HOVE-MADSEN, L. Excitation-contraction coupling in the teleost heart. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & FARRELL, A.P. **Fish Physiology: The Cardiovascular System**. New York: Academic Press Inc., v. 12, p. 267-303, 1992

TIBBITS, G.; XU, L. & SEDARAT, F. Ontogeny of excitation-contraction coupling in the mammalian heart. **Comp Biochem Physiol. A**, v. 132, p. 691-698, 2002.

TORGERSON, C.S.; GDOVIN, M.J.; BRANDT, R.; REMMERS, J.E. Location of central respiratory chemoreceptors in the developing tadpole. **Am. J. Physiol.** v. 280, p. 921–928, 2001.

TOTA, B. Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle. **J. exp. Zool.**, v. 2, p. 122-135, 1989.

TSUI, M.T.K.; CHU, L.M.; Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, p. 1189–1197, 2003.

ULTSCH, G.R.; BRADFORD D.F.; FREDA, J. S. Physiology: Coping with the environment. In: McDIARMID, R.W. & ALTIG, R. (Eds.). **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. The University of Chicago Press, Chicago, p. 193, 1999.

ULTSCH, G.R.; CARWILE, E. M.; CROCKER C.E; JACKSON, D.C. **Physiol and Biochem Zool**, v. 72, p. 493-501, 1999.

VENTURINO, A.; ROSENBAUM, E.; DE CASTRO, A.C.; ANGUIANO, O.L.; GAUNA, L.; DE SCHROEDER, T.F.; D'ANGELO, A.M.P. Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, v. 8, p. 167–186, 2003.

VIERTEL, B., The oral cavities of Central European Anuran larvae (Amphibia). Morphology, ontogenesis and generic diagnosis. **Amphibia-Reptilia**, v. 4, p. 327-360, 1982.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: viscera and endocrines. In: McDIARMID, R.W.; ALTIG, R. (Eds.). **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. The University of Chicago Press, Chicago, p. 444, 1999.

VORNANEN, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. **Comp Bioch and Phy** , v. 94, p. 477-483, 1989

VORNANEN, M. Sarcolemmal Ca^{2+} influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 1432-1440, 1997.

VORNANEN, M. L-type Ca^{2+} -current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and β -adrenergic stimulation. **J. exp. Biol.**, v. 201, p. 533-547, 1998.

VOYLES, J.; YOUNG, S., BERGER, L., CAMPBELL, C.; VOYLES, W. F.; DINUDOM A., COOK, D.; WEBB, R.; ALFORD, R A.; SKERRATT, L.F.; SPEARE, R.; Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, v. 326, p. 582, 2009.

WAKE, D.B. Declining amphibian populations **Science**, v. 253, p. 860, 1991.

WANNEE JIRAUNGKOORSKUL W.; UPATHAMA,E.S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) **ScienceAsia**, v. 28, p. 121-127, 2002

WEST, N. H.; BURGGREN, W. W. Gill and lung ventilatory responses to steady-state aquatic hypoxia and hyperoxia in the bullfrog tadpole (*Rana catesbeiana*). **Respir. Physiol**, v. 47, p. 165–176, 1982.

WITHERS, P.C.; HILLMAN, S.S. Allometric and ecological relationships of ventricle and liver mass in anuran amphibians. **Functional Ecol.**, v. 15, p. 60-69, 2001.

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.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 117-165, 2000.

WILSON, R.J.; VASILAKOS, K.; HARRIS, M.B.; STRAUS, C.; REMMERS, J.E. Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. **J. Physiol.**, v. 540, p. 557–570, 2006.

XUE, X.H.; HRYSHKO, L.V.; NICOLL, D.A.; PHILIPSON, K.D. & TIBBITS, G.F. Cloning, expression, and characterization of the trout cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. 693-700, 1999.

XIAO, Y., ZHU, S., LI, L., JIANG, P. Influences of the herbicide glyphosate-isopropylammonium solution on heart activities of *Bufo gargarizans*, **Acta Zoologica Sinica**, v.53, p. 669-673, 2007.

ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Second Edition. San Diego: Ed Academic Press, 2001.