

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

Avaliação da função cardíaca *in vitro* do cascudo *Hypostomus regani* (IHERING, 1905)
e dos efeitos da exposição a concentrações subletais do
pesticida Fipronil (REGENT 800WG®)

Lucas de Abreu Ferro

São Carlos
2014

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

Avaliação da função cardíaca *in vitro* do cascudo *Hypostomus regani* (IHERING, 1905)
e dos efeitos da exposição a concentrações subletais do
pesticida Fipronil (REGENT 800WG®)

Lucas de Abreu Ferro

Dissertação apresentada ao Programa interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF UFSCar – UNESP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADORA: Profa.Dra. Ana Lúcia Kalinin

São Carlos
2014

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

F395af Ferro, Lucas de Abreu.
Avaliação da função cardíaca *in vitro* do cascudo
Hypostomus regani (IHERING, 1905) e dos efeitos da
exposição a concentrações subletais do pesticida Fipronil
(REGENT 800WG[®]) / Lucas de Abreu Ferro. -- São Carlos :
UFSCar, 2014.
108 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Coração - fisiologia. 2. *Hypostomus regani*. 3. Fipronil.
4. Ecotoxicologia. 5. Função cardíaca. I. Título.

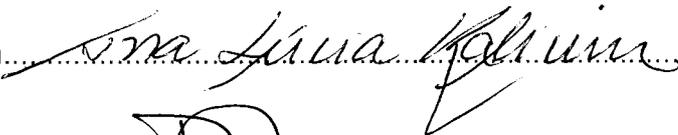
CDD: 612.17 (20^a)

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

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Lucas de Abreu Ferro

Dia 03/09/2014

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Kalinin.....

Prof. Dr. David J. McKenzie.....

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

À toda minha família, que me apoiou e
incentivou incondicionalmente em todos
os momentos e decisões da minha vida.

Dedico

Agradecimentos

À orientadora e amiga Ana Lúcia Kalinin, pela orientação, oportunidade e confiança depositadas em mim, pelo grande exemplo de ética, responsabilidade, profissionalismo e força de vontade. Agradeço-lhe também pelos ótimos momentos proporcionados pelo seu constante e singular bom humor, mesmo em situações difíceis.

Aos professores e pesquisadores Francisco Tadeu Rantin, Gerson Rodrigues e Diana Amaral pelas valiosas contribuições no exame de qualificação, e pelos constantes ensinamentos no dia-a-dia.

Ao André Peret, pelos conselhos no desenvolvimento do sedimento artificial.

À todos funcionários e técnicos do DCF, especialmente a o Seu Ângelo, D. Íris, e Nadir, pelo apoio técnico, conversas descontraídas, e pelo maravilhoso café de todos os dias.

À CAPES pelo suporte financeiro, essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos e companheiros de Laboratório Cynthia, Diana, Eliton, Guelli, Karina, Nathan, Rafael Z, Raquel, Rocqueira, Samuel, Thiaguinho, Vivian, Vô, pelas constantes ajudas no dia-a-dia, discussões científicas, aprendizados, bom humor, e amizade. Foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos grandes amigos de longa data de Araraquara, de São Carlos, e da casa mais divertida e singular que já morei (Família Rep. DiLeve), Aline, Aninha, Baratinha, Bunny, Caips, Camila, Chicão, Créu, Fernanda, Gabi, Glessler, Gui, Helena, Jazi, Jeff, Jéss, João, Johnes, Jú , Léo, Luiz Felipe, Magrão, Mali, Marcel, Mari, Marília, Pedro, Pepino, Rafa, Réptil, Robson, Tanque, Verônica, Victor, Vini, e Vivi pela amizade, ajuda e confiança compartilhada. Que nossa amizade perdure além da distância e falta de tempo.

À minha maravilhosa família, meus tios e primos Ângela, Bel, Bola, Bruno, Dalila, Diguinho, Edson, Fabrício, Fátima, Gê, Gilberto, Greice, Guilherme, Ivan, João, Larissa, Lorena, Márcia, Mônica, Páscoa, Pedro, Quito, Rafaela, Renan, Vitória, pelo amor e carinho compartilhado e reforçado sempre.

À todos aqueles que, apesar de não citados nominalmente, contribuíram diretamente ou indiretamente para meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço especialmente a minha mãe Ângela, meu pai Valmir, minha irmã Mirela, minha avó Aparecida, minha madrinha Teresa e meu cunhado Fernando pelo amor, apoio e ajuda incondicional. Meus principais exemplos de força de vontade e caráter. Devo tudo à vocês. **Amo vocês!!!**

Resumo

O fipronil (Fpn) é um inseticida fenil-pirazólico amplamente utilizado para controle de pragas na agricultura e em animais domésticos. Pode ser aplicado desde doses muito baixas até muito altas para controle efetivo de insetos resistentes ou tolerantes a outras famílias de inseticidas. O Fpn atua como bloqueador dos canais de cloreto acoplados aos receptores GABA e aos receptores glutamatérgicos, estes últimos são alvo inseto-específico não presente nos vertebrados. O objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos da exposição aguda (96 h) em concentrações subletais ($4,23\mu\text{.Kg}^{-1}$) do pesticida Fpn, adicionado em sedimento artificial, sobre a função cardíaca *in vitro* do cascudo *Hypostomus regani*. Não foi encontrada diferença na massa ventricular relativa do grupo controle quando comparado ao grupo exposto ao Fpn. As preparações ventriculares do grupo exposto ao Fpn apresentaram maiores valores de força de contração (Fc) e menores valores das relações entre os parâmetros tempo-dependentes e a Fc (tempo para o pico de tensão – TPT/Fc, e tempo para metade do relaxamento – THR/fc) nos protocolos do tempo experimental, incrementos na frequência de estimulação e incrementos de Ca^{2+} na solução fisiológica. Adicionalmente, o grupo exposto manteve a Fc até a frequência 2,6 Hz, enquanto o grupo controle manteve até a frequência 2,0 Hz. Ambos os grupos não apresentaram potenciação da Fc após pausa diastólica não fisiológica, indicando que o retículo sarcoplasmático (RS) não é funcional para a contratilidade dessa espécie. Corroborando com esse resultado, a técnica de Western Blot revelou que a SERCA2 não foi expressa em ambos os grupos experimentais, tais resultados indicam que o Ca^{2+} para a contração do ventrículo de *H. regani* é proveniente do meio extracelular. A substituição do NaCl por LiCl na solução fisiológica causou um inotropismo negativo no grupo exposto, adicionalmente, os incrementos de Ca^{2+} provocaram um inotropismo positivo no grupo exposto, indicando que o efeito cardiotônico e a maior dinâmica de contração causados pela exposição ao Fpn é devido provavelmente a uma maior expressão e/ou atividade do NCX no grupo exposto. O bloqueio da bomba Na^+/K^+ -ATPase provocou um inotropismo negativo em ambos os grupos, provavelmente devido a uma sobrecarga de Ca^{2+} intracelular. A capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) do grupo exposto foi superior que o grupo exposto em todas as frequências de estimulação, devido a provável maior atividade e/ou expressão do NCX no grupo exposto.

Abstract

Fipronil (Fpn) is a phenyl-pyrazolic insecticide widely used for pest control in agriculture and livestock. It can be applied in very low doses as well as very high concentrations for the effective control of insects that show some resistance or tolerance to other families of insecticides. Fpn acts as a blocker of chloride channels coupled to GABA and glutamate receptors, the latter are insect-specific targets not present in vertebrates. The aim of this study was to evaluate the possible effects on cardiac function of *Hypostomus regani*. of acute exposure (96 h) to sublethal concentrations ($4.23 \mu\text{K}g^{-1}$) of the pesticide Fpn, mixed into an artificial sediment. There was no difference in relative ventricular mass of the control group when compared to the group exposed to the Fpn. Ventricular strips from the Fpn exposed group exhibited higher twitch force (TF) and lower relationships between time-dependent variables and TF (time to peak tension - TPT/TF, and time to half relaxation - THR/TF) in response to increases in the frequency of stimulation or elevations of Ca^{2+} in physiological solution. Additionally, the exposed group maintained TF until a frequency of 2.6 Hz, while the TF of controls was only maintained until 2.0 Hz. Neither group showed potentiation of TF after non-physiological diastolic pause, indicating that the sarcoplasmic reticulum (RS) is not functional for contractility in this species. Corroborating that result, Western blots showed that SERCA2 was not expressed in either experimental group, these results indicate that the Ca^{2+} provided for ventricular contraction of *H. regani* is of extracellular origin. The replacement of NaCl with LiCl in saline caused negative inotropy in the exposed group, additionally, increments of Ca^{2+} caused positive inotropism in this group, indicating that the cardiotonic effect and greater contraction dynamics caused by exposure to Fpn were probably due to an increased expression and / or activity of NCX. Blocking of Na^+/K^+ pump led to a negative inotropism in both groups, presumably due to an overload of intracellular Ca^{2+} . The cardiac pump capacity (CPC) of the exposed group was higher than the control group at all stimulation frequencies, probably due to increased activity and / or expression of NCX in the Fpn-exposed group.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou ausência de resíduos de agrotóxicos (Fonte: PARA, 2012).	3
Figura 2. Estrutura molecular do inseticida fipronil	4
Figura 3. Dissipação do fipronil para fipronil-sulfeto, fipronil-dessulfenil, fipronil-sulfona e fipronil-amida via redução, oxidação, fotólise, hidrólise, e mecanismos de reação bióticos. Textos entre parênteses indicam o meio no qual a reação ocorre. (Adaptado de Gunasekara e Troung, 2007).	6
Figura 4. Imagens confocais de miócitos ventriculares de truta e de rato, marcados com di-8-ANEPPS, um indicador fluorescente lipofílico (fonte: SHIELS e WHITE, 2005).	11
Figura 5. Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco de mamíferos. As setas representam as vias de entrada de Ca^{2+} no sarcoplasma, e as vias de remoção deste íon do mesmo. DHPR: canal de dihidropiridina (canal L); RS: retículo sarcoplasmático; ryr: canal de Ca^{2+} do RS (canal de rianodina); NCX: do trocador Na^{+}/Ca^{2+} ; SERCA: Ca^{2+} -atpase do RS; PLB: fosfolambano (modificado de BERS, 2002).	13
Figura 6. Exemplar de <i>Hypostomus regani</i> (Ihering, 1905).	15
Figura 7. Caixas plásticas onde os peixes foram mantidos por 96 horas antes dos experimentos.	19
Figura 8. Esquema do procedimento de exposição ao sedimento artificial.	20
Figura 9. Sedimento artificial usado no experimento.	21
Figura 10. Set experimental utilizado para a obtenção dos registros da contração isométrica das tiras ventriculares do cascudo: A. Cilindro de mistura carbogênica; B. Banho termostatizado; C. Amplificador de força; D. Estimuladores elétricos; E. banho com quatro cubetas; F. Sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.	23
Figura 11. Variáveis medidas no registro de força de contração isométrica nos diferentes protocolos experimentais. Fc: força de contração isométrica; TPT: tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento. (adaptado de MONTEIRO, 2011).	28
Figura 12. Massa ventricular relativa (MVR) de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 10) exposto (n = 10). Valores médios \pm 1 EPM.	29
Figura 13. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre a força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.	31
Figura 14. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre o tempo para o pico de força (TPT) de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.	32
Figura 15. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre a relação tempo de contração/força das tiras ventriculares (TPT/Fc) de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	32
Figura 16. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre o tempo para metade do relaxamento (THR) de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.	33
Figura 17. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre a relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n=12) e exposto (n=12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.	34
Figura 18. Efeito da pausa diastólica de 5 minutos sobre a força de contração (% de alteração) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12), em solução controle e em solução com lítio. A linha representa a média dos valores antes da pausa. Valores médios \pm 1 EPM.	35
Figura 19. Efeito da pausa diastólica de 5 minutos sobre o tempo para pico de tensão (TPT - % de alteração) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> , dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) em	

solução controle, e em solução com lítio. A linha representa a média dos valores antes da pausa. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação a pré-pausa.	36
Figura 20. Efeito da pausa diastólica de 5 minutos sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - % de alteração) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> , dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) em solução controle, e em solução com lítio. A linha representa a média dos valores antes da pausa. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação a pré-pausa.	37
Figura 21. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre a força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais	39
Figura 22. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre o tempo para o pico de tensão (TPT) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais	40
Figura 23. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre a relação tempo de contração/força (TPT/Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	40
Figura 24. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre o tempo 50% do relaxamento (THR) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais	41
Figura 25. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre a relação tempo de relaxamento/força (THR/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais	42
Figura 26. Força de contração (Fc) em tiras ventriculares do grupo controle de <i>H. Regani</i> em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle.....	43
Figura 27. Força de contração (Fc) em tiras ventriculares do grupo exposto de <i>H. Regani</i> em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais	44
Figura 28. Tensão pós-pausa (% de alteração) das tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle e exposto em solução com lítio em relação a pós-pausa em solução controle. Valores médios \pm 1 EPM. A Linha representa os valores de pós-pausa em solução controle. Asteriscos indicam diferença significativa entre valores de Fc pós-pausa com solução com lítio .em relação a pós pausa com solução controle.....	45
Figura 29. Tempo para o pico de tensão (TPT) em tiras ventriculares do grupo controle de <i>H. Regani</i> em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.	46
Figura 30. Tempo para o pico de tensão (TPT) em tiras ventriculares do grupo exposto de <i>H. Regani</i> em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais	47
Figura 31. Tempo para pico de Tensão (TPT - % de alteração) das tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle e exposto em solução com lítio em relação a pós-pausa em solução controle. Valores médios \pm 1 EPM. A linha representa a média dos valores de pós-pausa em solução controle.	48
Figura 32. Tempo para 50% do relaxamento (THR) em tiras ventriculares do grupo controle de <i>H. Regani</i> em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle.	49
Figura 33. Tempo para 50% do relaxamento (THR) em tiras ventriculares do grupo exposto de <i>H. Regani</i> em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle.	50

Figura 34. Tempo para 50% do relaxamento (THR - % de alteração) das tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle e exposto em solução com lítio em relação a pós-pausa em solução controle. A linha representa a média dos valores de pós-pausa em solução controle. Valores médios ± 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre valores de THR pós-pausa com solução com lítio em relação a pós-pausa com solução controle.	51
Figura 35. Força de contração (Fc) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de <i>H. Regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios ± 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.	53
Figura 36. Tensão de repouso (TR) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de <i>H. Regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios ± 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos.	53
Figura 37. Tempo para atingir o pico de tensão (TPT) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de <i>H. Regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios ± 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.	54
Figura 38. Tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de <i>H. Regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios ± 1 EPM.	55
Figura 39. Relação tempo de contração/força de contração (TPT/Fc) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e controle (n = 8) de <i>H. Regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios ± 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.	56
Figura 40. Relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e controle (n = 8) de <i>H. Regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios ± 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.	56
Figura 41. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio sobre a força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios ± 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial.	58
Figura 42. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio sobre o tempo para o pico de força (TPT) desenvolvido pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios ± 1 EPM. Símbolos vazios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.	59
Figura 43. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio na relação TPT/Fc (ms.mn-1.mm2) de tiras ventriculares de <i>H.regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios ± 1 EPM.	59
Figura 44. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio sobre o tempo para metade do relaxamento (THR) desenvolvido pelas tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios ± 1 EPM. Símbolos vazios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. Valores médios ± 1 EPM.	60
Figura 45. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio na relação THT/Fc (ms.mn-1.mm2) de tiras ventriculares de <i>H.regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios ± 1 EPM.	61
Figura 46. Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração (Fc) de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> , dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Valores médios ± 1 EPM.	63
Figura 47. Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão (TPT - ms) de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> , dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. Valores médios ± 1 EPM.	64
Figura 48. Efeito do aumento da frequência de estimulação na relação TPT/Fc (ms.mn -1 .mm 2) e de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Valores médios ± 1 EPM.	64
Figura 49. Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para 50% do relaxamento de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> , dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Símbolos abertos indicam	

diferença significativa em relação aos valores iniciais. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Valores médios \pm 1 EPM.	65
Figura 50. Efeito do aumento da frequência de estimulação na relação THR/Fc (ms.mn ⁻¹ .mm ⁻²) e de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Valores médios \pm 1 EPM.	66
Figura 51. Capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mn.mm ⁻² .min ⁻¹) de tiras ventriculares de <i>H. Regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Valores médios \pm 1 EPM.	67
Figura 52. Análise da expressão da proteína SERCA2 por Western blotting no ventrículo do cascudo <i>H. Regani</i> e no ventrículo esquerdo do Rato Wistar (<i>Rattus Norvegicus</i>).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do fipronil (Fonte: Conelly, 2001).....	5
Tabela 2. Valores em porcentagem da massa ventricular relativa dos grupos controle e exposto ao Fnp.....	29
Tabela 3. Força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de <i>H. regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12) durante 40 minutos em uma frequência de 0,4 Hz. Valores médios \pm 1 EPM.	30
Tabela 4. Valores de tempo para que o pico de tensão (TPT) seja atingido e da relação tempo de contração/força de contração (TPT/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12) durante 40 minutos em uma frequência de 0,4hz. Valores médios \pm 1 EPM.	31
Tabela 5. Valores de tempo para que a metade do relaxamento (THR) seja atingido e da relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> dos grupos controle e exposto ao Fnp durante 40 minutos em uma frequência de 0,4hz. Valores médios \pm 1 EPM.	33
Tabela 6. Valores da força de contração (Fc) pré-pausa e pós-pausa e da porcentagem de alteração após a pausa das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12), em solução controle e em solução com lítio. Valores médios \pm 1 EPM.	35
Tabela 7. Valores de tempo para o pico de tensão (TPT) da pré-pausa e pós-pausa e da porcentagem de alteração após a pausa das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) em solução controle e em solução com lítio. Valores médios \pm 1 EPM.	35
Tabela 8. Valores de tempo para metade do relaxamento (THR) da pré-pausa e pós-pausa, e da porcentagem de alteração após a pausa, das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12), em solução controle e em solução com lítio. Valores médios \pm 1 EPM	36
Tabela 9. Valores de força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras de <i>H. regani</i> ao longo de 20 minutos em solução com lítio dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	39
Tabela 10. Valores de tempo para pico de tensão (TPT) e da relação tempo de contração/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> em solução com lítio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fpn (n = 12).	39
Tabela 11. Valores de tempo para metade do relaxamento (TPT) e da relação tempo de relaxamento/força (THR/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> em solução com lítio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fpn (n = 12).	41
Tabela 12. Valores de força de contração (Fc) das tiras ventriculares do grupo controle <i>H. regani</i> ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	42
Tabela 13. Valores de força de contração (Fc) das tiras ventriculares do grupo exposto ao Fnp de <i>H. regani</i> ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	43
Tabela 14. Valores de força de contração (Fc) após a pausa diastólica, de ambos os grupos experimentais, em solução controle e em solução com lítio, e porcentagem de alteração da tensão pós-pausa em solução com lítio em relação a solução controle. Valores médios \pm 1 EPM.	44

Tabela 15. Valores do tempo para o pico de tensão (TPT) das tiras ventriculares do grupo controle de <i>H. regani</i> ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	45
Tabela 16. Valores do tempo para pico de tensão (THR) das tiras ventriculares do grupo exposto ao Fnp de <i>H. regani</i> ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	46
Tabela 17. Valores de tempo para pico de tensão (TPT) após a pausa diastólica, de ambos os grupos experimentais, em solução controle e em solução com lítio, e porcentagem de alteração da tensão pós-pausa em solução com lítio em relação a solução controle. Valores médios \pm 1 EPM.	47
Tabela 18. Valores do tempo para metade do relaxamento (THR) das tiras ventriculares do grupo controle de <i>H. regani</i> ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	48
Tabela 19. Valores do tempo para metade do relaxamento (THR) das tiras ventriculares do grupo exposto ao Fnp de <i>H. regani</i> ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	49
Tabela 20. Valores de para metade do relaxamento (THR) após a pausa diastólica, de ambos os grupos experimentais, em solução controle (n = 12) e em solução com lítio (n = 12), e porcentagem de alteração da tensão pós-pausa em solução com lítio em relação a solução controle. Valores médios \pm 1 EPM.	50
Tabela 21. Valores de força de contração (Fc) e de tensão de repouso (TR) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de <i>H. regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM.	52
Tabela 22. Valores do tempo para atingir o pico de tensão (TPT) e da relação força de contração/força de contração (TPT/Fc) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de <i>H. regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM.	54
Tabela 23. Valores do tempo para 50% de relaxamento (THR) e da relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM.	55
Tabela 24. Valores de força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) de <i>H. regani</i> sob o incremento de cálcio. Valores médios \pm 1 EPM.	58
Tabela 25. Valores de tempo para atingir o pico de tensão (TPT) e da relação tempo de contração/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> sob incrementos na concentração de cálcio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	58
Tabela 26. Valores de tempo para que metade do relaxamento (TPT) fosse atingido e da relação tempo de relaxamento/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> sob incrementos na concentração de cálcio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	60
Tabela 27. Valores de força de contração (Fc) desenvolvidas pelas tiras ventriculares de <i>H. regani</i> sob incrementos da frequência de estimulação dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	62
Tabela 28. Valores de tempo para o pico que o pico de tensão (TPT) seja atingido e da relação tempo de contração/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> sob incrementos na frequência de estimulação dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	63
Tabela 29. Valores de tempo para que metade do relaxamento seja atingido (THR) e da relação tempo de contração/força (THR/Fc) das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> sob incrementos na frequência de estimulação dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	65
Tabela 30. Valores da capacidade de bombeamento cardíaco das tiras ventriculares de <i>H. regani</i> dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. FIPRONIL.....	3
1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO TECIDO CARDÍACO DE PEIXES E O ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO CARDÍACO.....	10
1.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE ESTUDADA	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL	19
3.1.1 <i>Preparação do Sedimento Artificial</i>	21
3.2. PREPARAÇÕES E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i>	21
3.2.1. <i>Efeito do Tempo</i>	23
3.2.2. <i>Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio Extracelular</i>	24
3.2.3. <i>Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequência)</i>	24
3.2.4. <i>Tensão pós-pausa</i>	24
3.2.5. <i>Papel do trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX)</i>	25
3.2.6. <i>Efeito do bloqueio da bomba de Na⁺/K⁺ ATPase</i>	25
3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DE WESTERN BLOT	25
3.3.1. <i>Homogeneização do músculo cardíaco</i>	25
3.3.2. <i>Quantificação de proteína</i>	26
3.3.3. <i>Expressão proteica de SERCA2</i>	26
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS	27
4.1. FORMA DE APRESENTAÇÃO DOS DADOS	27
4.2. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	28
5. RESULTADOS	29
5.1. MASSA VENTRICULAR RELATIVA	29
5.2. EFEITO DO TEMPO EXPERIMENTAL	29
5.3. TENSÃO PÓS-PAUSA	34
5.4. IMPORTÂNCIA DO TROCADOR Na ⁺ /Ca ²⁺ (NCX)	37
5.5. IMPORTÂNCIA DA BOMBA Na ⁺ /K ⁺ -ATPASE.....	51
5.6. EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR	57
5.7. AUMENTO DA FREQUÊNCIA DE ESTIMULAÇÃO	61
5.8. CAPACIDADE DE BOMBEAMENTO CARDÍACO	66
5.9. ANÁLISE DE WESTERN BLOT.	67
6. DISCUSSÃO.....	69
6.1. MASSA VENTRICULAR RELATIVA	69
6.2. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	70
7. CONCLUSÕES.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. Introdução

Cerca de 75% da superfície da Terra é coberta por água, no entanto mais de 97% desse volume é de água salgada. As principais fontes de água potável são os rios e lagos, que constituem menos de 0,01% do total de água do planeta (BAIRD, 2002). Muitas modificações ambientais podem ser provocadas por atividades antropogênicas, causando mudanças na estrutura dinâmica de um ecossistema. Os ambientes aquáticos muitas vezes se tornam receptáculos temporários ou finais de uma grande quantidade e variedade de poluentes, sejam eles lançados ao ar, ao solo, ou diretamente nos corpos de água (RAND, 1995).

O Brasil possui aproximadamente 18% do potencial hídrico superficial utilizável do planeta (SETTI, 1998). Além disso, é também um país com grande destaque na agropecuária mundial, sendo o agronegócio um setor essencial na economia do país. De acordo com o Ministério da Agricultura, o Brasil é um dos principais produtores e exportadores de diversos produtos agropecuários. É o maior produtor e exportador de açúcar, etanol, café, cana-de-açúcar, e suco de laranja, e é o líder do ranking das vendas do complexo soja (farelo, óleo e grão) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). O mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190 % nos últimos 10 anos, enquanto o mercado mundial cresceu 93 %, e desde 2008, quando ultrapassou os Estados Unidos, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2014).

Os xenobióticos, compostos orgânicos de origem sintética ou natural, atingem os ecossistemas aquáticos de várias maneiras, sendo que as principais são a descarga proveniente de efluentes industriais, derrames acidentais de lixo químico e o esgoto doméstico. Isto torna tais ecossistemas mais sujeitos à contaminação por uma variedade de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos e outros contaminantes, os quais podem ser incorporados pelos tecidos de invertebrados e vertebrados que habitam esses ambientes (COOPER, 1993; LIVINGSTONNE, 1998, 2001).

Os agrotóxicos ou defensivos agrícolas são compostos que podem controlar a presença ou causar a morte de um ou mais organismos indesejáveis. O registro mais antigo de sua utilização é a queima de enxofre contra insetos, para fumigar os lares gregos, cerca de 1000 a.C. (BAIRD, 2002). Atualmente os agrotóxicos são utilizados para a otimização das culturas, produzindo mais em menos tempo. Apesar dos benefícios para a produção, existe a preocupação com as intoxicações que estes pesticidas podem causar, sobretudo pelo fato que

essas intoxicações acontecem pela ingestão gradual destes produtos que podem estar presentes no solo, água, e em uma variedade de alimentos (RISSATO et al., 2004).

As propriedades destes compostos, como a alta toxicidade para uma grande variedade de pragas, e a ação por um longo tempo, impulsionaram pesquisas e descobertas de outros compostos orgânicos sintéticos. Entre eles estão os organofosforados (paration, triclorfon, malation, diazimon), carbamatos (carbofuran, vetomil, aldicarb), piretróides (flumetrina, cipermetrina, deltametrina, decametrina, permetrina, bifentrina), organoclorados (lindano, endossulfan, heptacloro, aldrin, dieldrin), e os fenil-pirazólicos (fipronil e etiprole)

Esses compostos muitas vezes exercem efeitos em organismos diferentes dos alvos da aplicação, o que pode alterar o equilíbrio dinâmico de um ecossistema (PERET 2009). De acordo com Pimentel e Levitam (1986), do total de pesticidas aplicados, em média apenas 0,1% do composto atinge os organismos alvo, o que torna a maior parte disponível ao ambiente, contaminando-o.

Vários defensivos agrícolas foram proibidos devido a constatação de efeitos prejudiciais e acumulativos, que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo de cadeias tróficas, fenômeno denominado biomagnificação trófica (JORGENSEN, 2001). Muitas vezes a administração desses produtos é realizada de maneira inadequada e seu uso indiscriminado pode trazer consequências gravíssimas ao meio biótico e abiótico.

Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva (movimento das gotas provenientes de pulverização fora da área alvo), lixiviação (lavagem do solo pela chuva, provocando o carreamento de substâncias para corpos d'água) e percolação (deslocamento da água através do perfil dos solos), que pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos, local de difícil descontaminação (NETO; SIQUEIRA, 2005; TOMITA; BEYRUTH, 2002; ZILBERMAN, 1997; EDWARDS, 1973).

No ambiente aquático, o agrotóxico pode se ligar ao material particulado em suspensão na coluna d'água, se depositar no sedimento, permanecer dissolvido na coluna d'água, ou ser incorporado pelos organismos, que o degradam ou o acumulam em seus tecidos (NIMMO, 1985; PERET 2009).

A maioria dos agrotóxicos é encontrada em baixas concentrações nos ambientes aquáticos o que se deve, entre outros fatores, à baixa solubilidade dos mesmos e ao efeito da diluição. Entretanto, existe a possibilidade de que altas concentrações ocorram após eventos de chuvas fortes, particularmente em corpos d'água cujo entorno tenha sido recentemente tratado com altas doses de pesticidas. Não existe um grau de segurança previsível para agrotóxicos em corpos d'água, pois o desenvolvimento de biomagnificação

trófica pode elevar consideravelmente os efeitos tóxicos nos organismos (DORES; FREIRE, 2001).

Existem poucas informações sobre os possíveis prejuízos que os agrotóxicos podem causar em ecossistemas aquáticos, mas sabe-se que o risco de transporte desses das lavouras para a rede hidrográfica pode resultar em ação tóxica direta ou indireta sobre organismos não-alvos, pela alteração do hábitat dos organismos ou interferência na cadeia alimentar (NAKAGOME et al., 2007).

A resolução CONAMA 20/86 (atualmente revisada para a Resolução CONAMA 357/05), estabelece a concentração máxima permitida de diversas substâncias, dentre elas os agrotóxicos, de acordo com os diferentes tipos de água. Entretanto, ainda não existem limites definidos para a presença de compostos fenil-pirazólicos como o fipronil em corpos d'água no Brasil.

Os defensivos agrícolas podem também se manter nos alimentos nos quais são aplicados. O relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) de 2012, que coletou e analisou 1665 amostras de alimentos nos 26 estados e no Distrito Federal, indicou que 29% do resultado das amostras foram considerados insatisfatórios por apresentarem resíduos de produtos não autorizados no Brasil, ou autorizados, mas em concentrações acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela ANVISA. Além disso, 36 % das amostras apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao LMR, e 35 % não apresentaram resíduos de agrotóxicos. Esses dados estão representados na figura 1. (PARA, 2012).

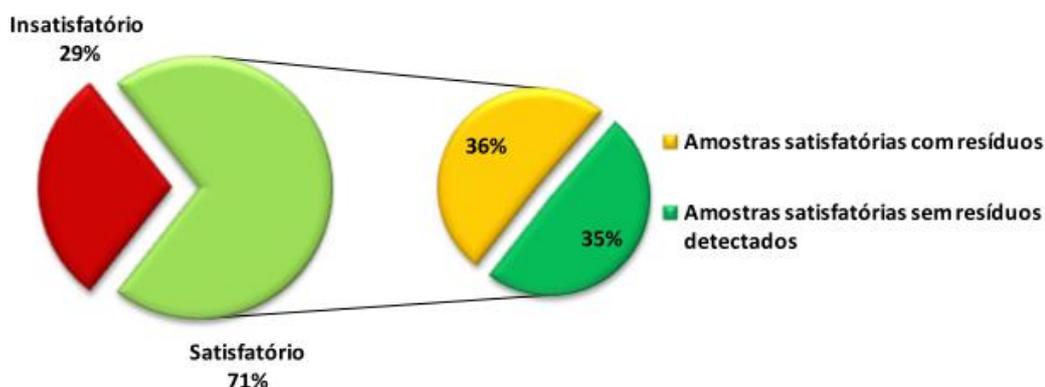


Figura 1. Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou ausência de resíduos de agrotóxicos (Fonte: PARA, 2012).

1.1. Fipronil

O fipronil (Figura 2) é um inseticida do grupo químico dos pirazóis de segunda geração, descoberto pela empresa Rhône-Poulenc Agro Company (atual Bayer Cropscience) em 1987 (BOBÉ et al., 1998).

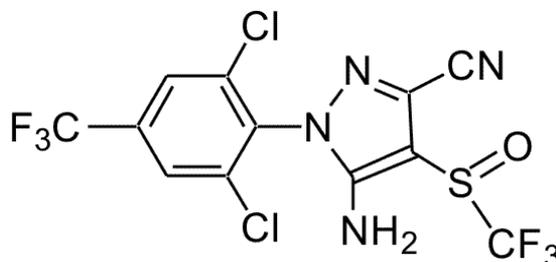


Figura 2. Estrutura molecular do inseticida fipronil

De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), o nome químico do fipronil é (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila), e foi registrado como pesticida nos Estados Unidos da América (EUA) em 1996.

Pode ser aplicado desde doses muito baixas até muito altas para controle efetivo de insetos resistentes ou tolerantes a outras famílias de inseticidas como os organofosforados, piretróides, carbamatos e ciclodienos (RAYTON, M.; AAJOUND, A.; WILLISON, J. C.; AOUADI, H.; TISSUT, M.; RAYANEL, P.; 2006.). É amplamente utilizado para o controle de formas adultas e larvais de pragas como baratas, mosquitos, moscas e besouros, para o controle de formigas, cupins e larvas de coleópteros em plantações como as de soja e cana-de-açúcar e para o controle de pulgas e carrapatos em animais domésticos. (BOBE et al., 1997; OHI, 2004). O composto é ingrediente ativo de diversas formulações, como Termidor®, Frontline®, Regent®, Evolution®, entre outras.

Pode ser aplicado na forma de grânulos ou iscas para controle comercial ou residencial de pragas em gramíneas e como um tratamento para sementes ou spray aéreo para controle de pragas na agricultura (WALSE et al., 2004). Stevens (1998) relatou que a aplicação de fipronil em sementes de arroz a uma concentração de 12,5 g de ingrediente ativo/ha é mais eficaz do que o tratamento com o organofosforado Malation a 300 g de ingrediente ativo/ha, e promove proteção de 9 a 14 dias contra insetos chironomídeos após o aparecimento nas sementes de arroz. (STEVENS; HELLIWELL; WARREN, 1998).

Os pesticidas apresentam um conjunto de propriedades físico-químicas, que representam importantes características que podem ser avaliadas para determinar um potencial risco de contaminação ambiental. As principais propriedades dos pesticidas

relacionadas a seu comportamento no ambiente são as seguintes: solubilidade em água, coeficiente de partição carbono orgânico e água, coeficiente de partição octanol-água, pressão de vapor, constante de Lei de Henry, e tempo de meia vida (AMARAL, 2012).

A constante da Lei de Henry e a pressão de vapor indica a tendência do composto à volatilização ou a permanência no estado aquoso. A solubilidade em água aponta o comportamento, transporte e destino do composto. O coeficiente de partição carbono orgânico (K_{OC}) e água está relacionada com a quantidade de matéria orgânica no solo, onde moléculas altamente solúveis apresentam K_{OC} relativamente baixo, podendo ser rapidamente biodegradáveis no solo. O coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) indica a tendência das moléculas se distribuir em regiões hidrofóbicas (BARCELÓ e HENNION, 1997; DORES e DE-LAMONICA-FREIRE, 2001). Os compostos que apresentam alto K_{OW} e baixa solubilidade em água, podem sofrer alta adsorção no solo ou no sedimento, e bioacumular-se em organismos aquáticos (AMARAL, 2012). As propriedades físico-químicas do fipronil estão mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do fipronil (Fonte: Conelly, 2001).

Peso molecular	437,2 g mol^{-1}
Constante de Henry	$3,7 \times 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$
Pressão de vapor	$3,7 \times 10^4 \text{ mPa}$ (a 25 °C)
Coeficiente de partição carbono orgânico e água (K_{oc})	803 ml.g^{-1}
Log do coeficiente de partição octanol água (k_{ow})	4.01 $\log K_{ow}$
Solubilidade em água (pH = 9)	0.0022 g L^{-1}
Solubilidade em água (pH = 5)	0.0024 g L^{-1}
Solubilidade em octanol	12,2 g L^{-1}
Solubilidade em hexano	0,028 g L^{-1}
Solubilidade em acetona	545,9 g L^{-1}
Ponto de fusão	195,5 – 203 °C

Por possuir a constante de Henry e pressão de vapor relativamente baixas, o fipronil não se volatiliza, e só é encontrado no ar se for aplicado na forma de spray. A baixa solubilidade e o alto K_{OW} do fipronil o caracteriza como hidrofóbico, ligeiramente móvel em água, e com grande suscetibilidade a adsorção no sedimento ou solo.

O valor médio do K_{oc} do fipronil (803 ml.g^{-1}) confere a este composto moderada adsorção no solo por área de superfície. No entanto, Bobé et al. (1997) observou uma grande afinidade do fipronil por solos com elevada concentração de matéria orgânica, e que esta adsorção não é afetada por alterações no pH, mas sim pela temperatura, presença de

metanol, e pela razão da quantidade de solo/água, de forma que o aumento da temperatura e a redução da razão da quantidade de solo/água elevam a adsorção do fipronil no solo.

Nos ecossistemas, o fipronil pode ser degradado através de hidrólise, fotólise, oxidação ou redução, resultando em compostos derivados, tais como fipronil sulfeto, fipronil sulfona, fipronil desulfenil e fipronil amida (MASUTTI E MERMUT, 2007; ZHU et al., 2004; ZHOU PEI et al., 2004; WIRTH et al., 2004; HAINZL E CASIDA, 1996; GUNASEKARA E TROUNG, 2007). O fipronil desulfenil é resultado exclusivamente de fotólise, e os outros produtos são produtos de processos químicos, mediados ou não por microorganismos. Alguns desses produtos podem ser ainda mais tóxicos que o próprio fipronil. Em ordem crescente de toxicidade encontram-se fipronil amida, fipronil e fipronil desulfenil, fipronil sulfona e o mais tóxico dos derivados, fipronil sulfeto (BEELER et al., 2001).

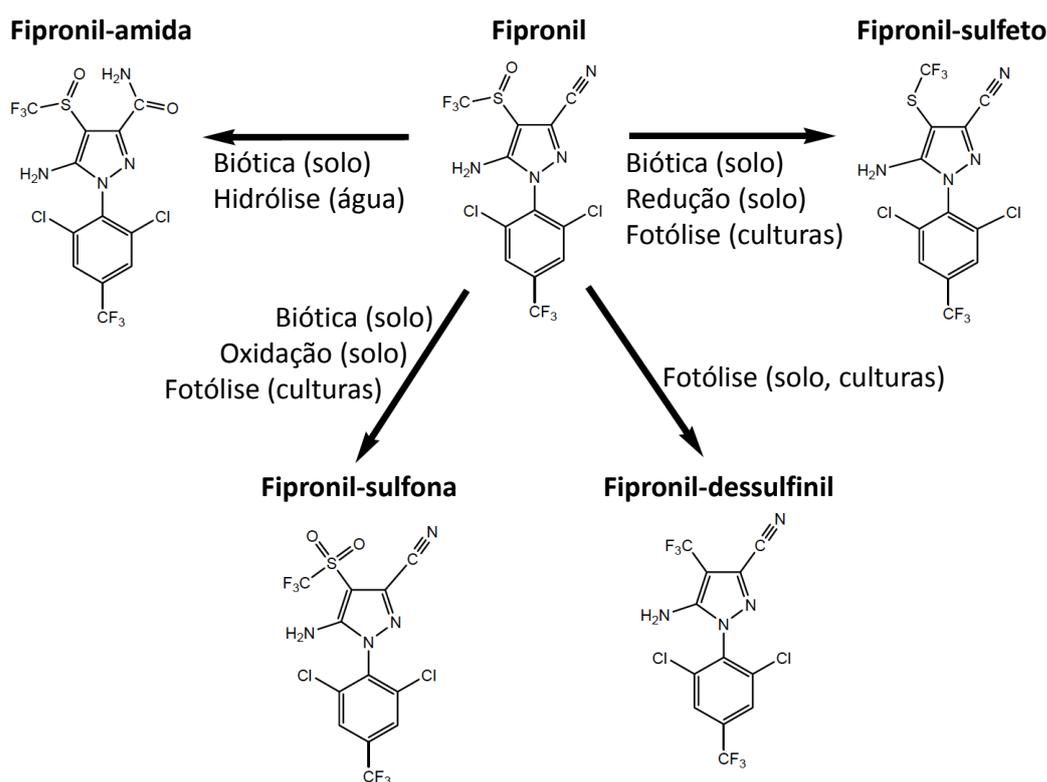


Figura 3. Dissipação do fipronil para fipronil-sulfeto, fipronil-dessulfenil, fipronil-sulfona e fipronil-amida via redução, oxidação, fotólise, hidrólise, e mecanismos de reação bióticos. Textos entre parênteses indicam o meio no qual a reação ocorre. (Adaptado de Gunasekara e Troung, 2007).

Mais de 80% do fipronil permanece estável após 100 dias presente em soluções aquosas, na ausência de luz, em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), e pH entre 5,5 e 7,0. Entretanto, em soluções alcalinas, a velocidade de degradação aumenta proporcionalmente

com o aumento do pH. Em pH 12, a degradação é 300 vezes mais rápida do que em pH 9, gerando unicamente o fipronil amida, através da hidrólise. Quando há a presença de luz, e em pH 5,5, o fipronil é rapidamente degradado por fotólise e hidrólise, e a reação de hidrólise se torna mais rápida, com a meia vida chegando a 4,1 h (BOBÉ et al., 1998).

Em um estudo com 8 tipos de solos australianos, a adsorção do fipronil aumentou com o aumento da matéria orgânica, e o tempo de meia vida do fipronil e de seus metabólitos no solo foi de 113 a 350 dias (YING e KOOKANA, 2001). De acordo com BOBÉ et al. (1998), mais de 90% do fipronil aplicado no solo sem a presença de luz permaneceu inalterado após 96 horas, porém, com a presença de luz pode ocorrer degradação em diferentes velocidades dependendo das condições do solo, e o produto de degradação foi o fipronil desulfínil. Feung e Yenne (1997) estudaram o a dinâmica do fipronil em ambiente aquático, e verificaram que o composto foi rapidamente adsorvido em sedimento contendo 8% de matéria orgânica e pH 5,8, e meia vida em condições aquáticas aeróbicas foi de 14 dias.

O fipronil é considerado como um pesticida seletivo para insetos, atuando como inibidor não competitivo dos receptores GABA (ácido gama-aminobutírico), interferindo na passagem de íons cloreto pelos canais de cloro dos neurônios e, conseqüentemente, inibindo o impulso nervoso normal, que resulta em atividade neural excessiva (KIDD; JAMES, 1991; WALSE et al., 2004). O aumento da atividade neural causa paralisia levando à morte do inseto (BOBÉ et al., 1998).

O GABA é um dos neurotransmissores mais abundantes no Sistema Nervoso Central, pois cerca de 40% das sinapses são GABAérgicas. O complexo receptor GABA é formado por cinco subunidades que se unem delimitando um canal de cloreto. Quando o GABA se liga ao sítio de ligação, o canal de cloreto se abre, e o gradiente de concentração promove um influxo de íons cloreto para o interior da célula, hiperpolarizando a membrana. Isso dificulta sua despolarização por influências excitatórias, resultando em inibição do tipo pós-sináptico. Porém, onde sinapses GABAérgicas estabelecem contato com terminais nervosos, o GABA promove saída de cloreto, portanto a despolarização da membrana. Nestas condições, o impulso nervoso libera menor quantidade de neurotransmissor excitatório, promovendo uma inibição pré-sináptica (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001).

O GABA distribui-se por muitas regiões do cérebro, fazendo parte de muitos circuitos inibitórios, regulando assim diversas funções no sistema nervoso central. A importância do GABA para o funcionamento cerebral é mostrada pelo fato que os

antagonistas do GABA estão entre os mais potentes convulsivantes (GRAEFF e GUIMARÃES, 2001).

Atualmente são conhecidos três tipos de receptores gabaérgicos, o GABA_A e o GABA_C, que são receptores ionotrópicos, e o GABA_B, que é um receptor metabotrópico ligado a proteína G (CHEBIB et al., 2007). Esses três subtipos já foram identificados em peixes (MING-HU et al., 1997; DELGADO e SCHMACHTENBERG, 2008). Os receptores GABA_A dos mamíferos são glicoproteínas hetero-oligoméricas compostas por uma mistura das subunidades α (1-6), β (1-4), γ (1-4), δ e ϵ . Conseqüentemente, um enorme arranjo de combinações pode existir para esses subtipos de receptores. No entanto, para um funcionamento adequado, é necessário ao menos um receptor α , um β , e outro subtipo, que pode ser o γ , o δ , ou o ϵ . Os receptores GABA_C são homo-oligoméricos, compostos pela subunidade $\rho 1$ ou $\rho 2$, embora há evidências de que esses receptores sejam compostos por uma combinação de subunidades ρ (CHEBIB; JOHNSTON, 1999).

Em mamíferos, os inseticidas fenil-pirazólicos possuem afinidade pelos receptores GABA_A. Experimentos *in vitro* indicaram que o fipronil liga-se fortemente a receptores homo-oligomérico (pentamérico) formados pela subunidade $\beta 3$ de mamíferos, e também a receptores GABAérgicos nativos de insetos, apontando uma grande similaridade dos receptores de insetos e da subunidade $\beta 3$ de mamíferos. No entanto, na natureza não existem mamíferos com receptores GABAérgicos $\beta 3$ homo-oligoméricos, e a ligação do fipronil em um receptor hetero-oligomérico de mamífero é relativamente fraca, o que indica que a presença de outras subunidades no receptor é o principal fator que reduz a afinidade desse inseticida para os receptores GABAérgicos nos mamíferos (RATRA; CASIDA, 2001).

Além disso, estudos recentes mostram que o fipronil também bloqueia a abertura dos canais de cloro nos receptores de glutamato, encontrado somente em invertebrados. Portanto, a seletividade do fipronil para os insetos em relação aos mamíferos é explicada pela alta afinidade desse inseticida aos canais de cloro dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos dos invertebrados, sendo a sensibilidade ao fipronil 700 a 1300 vezes maior em insetos do que em mamíferos (ZHAO et al., 2004). Entretanto, ainda não existem estudos investigando a afinidade desse pesticida nos receptores GABAérgicos de peixes.

Apesar de muito utilizado, existem poucos estudos publicados sobre os possíveis efeitos adversos desse pesticida. (OHI, et al, 2004). Em estudos com crustáceos, o fipronil apresentou-se altamente tóxico para as lagostas *Procambarus clarki* (96 h CL₅₀ = 14.3 mg L⁻¹) e *Palaemonetes pugio* (96 h CL₅₀ = 0.32 μ g L⁻¹), para o camarão *Amphiascus tenuiremis* (96 h CL₅₀ ~ 6.8 μ g L⁻¹) (WALSE et al, 2004).

Chandler e seus colaboradores (2004) relataram que concentrações abaixo de $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$ reduziram em 94% a reprodução de *Amphiascus tenuiremis*.

O desenvolvimento embrionário do peixe paulistinha (*Danio rerio*) foi extremamente afetado pelo fipronil na concentração de $333 \mu\text{g L}^{-1}$, havendo comprometimento das respostas motoras, redução do tamanho corporal, degeneração da notocorda devido o encurtamento das fibras musculares na direção rostro-caudal e redução da transmissão interneural na medula espinal, resultando em tetania e morte (STEHR et al., 2006).

Em estudos com o peixe-guarú *Poecilia reticulata*, a CL_{50} 96h sem sedimento foi de $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$, e com sedimento foi de $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$. Além disso, os peixes apresentaram hiperexcitação e nado errático após 12 horas de exposição nas concentrações 0,1; 0,125 e 0,15 mg.L^{-1} , e após 24 horas nas concentrações de 0,025 e 0,050 mg.L^{-1} (MANRIQUE, 2009).

BEGGEL et al. (2012) expuseram o peixe “fathead minnow” (*Pimephales promelas*) a concentrações $\geq 31 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fipronil por 24 horas e verificaram mudanças significativas na transcrição de genes para aspartociclase, metalotioneína, receptores de glicocorticóides, citocromos P450 3A126, e vitelogenina, além de efeitos neurotóxicos. Após 6 dias de recuperação da exposição, ainda foram observados efeitos endócrinos, com a vitelogenina aumentando em até 90 vezes, na concentração $61 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fipronil.

Em um trabalho com carpas, *Cyprinus carpio*, mantidas em consórcio com cultura de arroz, o fipronil provocou aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado, enquanto a catalase (CAT) foi inibida. Após 30 dias de exposição houve aumento de proteína carbonilada e de peroxidação lipídica (CLASEN et al, 2011).

Para o peixe nativo jundiá, *Rhamdia quelen*, a exposição à 0,10 e 0,23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fipronil induziu alterações morfológicas nucleares e danos ao DNA. A concentração 0,23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ provocou aumento na atividade da enzima Glutathione S-transferase, e a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral aumentou a partir da concentração 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para o lambari, *Astianax sp*, as concentrações de 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$; 0,10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fipronil promoveram quebras no DNA, depleção da acetilcolinesterase muscular e aumento da atividade da Glutathione S-transferase (RAMSDORF, 2011).

1.2. Características gerais do tecido cardíaco de peixes e o acoplamento excitação-contração cardíaco

Johansen e Burggren (1980) enfatizam que o coração de um determinado vertebrado não é inferior ao de outro, mas encontra-se adaptado para que o animal tenha uma organização apropriada, e que apresente respostas e padrões bem definidos de comportamento e interação com seu hábitat. Uma das principais características que possibilitam os vertebrados sobreviverem em diferentes situações é a capacidade do coração manter seu desempenho frente a condições fisiológicas variáveis (DRIEDZIC e GESSER, 1994).

O coração dos vertebrados ectotérmicos está sujeito a maiores variações nas concentrações de gases, equilíbrio ácido-base e temperatura do que o coração dos vertebrados endotérmicos. Esta singularidade decorre, fundamentalmente, das flutuações ambientais, muitas vezes súbitas e não previsíveis, a que estes animais estão sujeitos (DRIEDZIC e GESSER, 1994).

As características da contratilidade cardíaca podem ser influenciadas por diversos fatores ambientais impactantes no desempenho cardíaco. Portanto, tanto o cronotropismo quanto o inotropismo envolvidos na contratilidade cardíaca sofrem ajustes capazes de assegurar um débito cardíaco adequado para atender as demandas impostas pelo ambiente (DRIEDZIC e GESSER, 1994).

Os mecanismos contráteis envolvendo a interação dos miofilamentos de actina e miosina e sua regulação pelo cálcio parecem ser semelhantes dentro do grupo dos vertebrados. No entanto, existem diversas diferenças morfológicas entre os corações de peixes e mamíferos (TIBBITS et al., 1991).

O coração dos peixes teleósteos situa-se alojado dentro do saco pericárdico, e é constituído por 4 câmaras em série, bombeando sangue venoso: seio venoso, átrio, ventrículo, e bulbo arterioso. Em conjunto, essas câmaras elevam a energia potencial e cinética do sangue (FARREL e JONES, 1992).

O seio venoso é uma câmara de parede finas e com volume semelhante ao do átrio. Recebe sangue venoso do corpo através das veias hepáticas, jugular anterior, e dos ductos pareados de Cuvierian. O tecido conjuntivo é o principal componente da parede do seio venoso, e apresenta cobertura endotelial interna, e epicardial externa. A quantidade de músculo pode variar consideravelmente entre as espécies. Sua principal função está relacionada com o controle da frequência cardíaca, pois é onde está localizado o tecido marcapasso especializado (FARREL e JONES, 1992).

O átrio é uma câmara com parede trabeculada, formato irregular, e com volume similar ou maior que o volume ventricular. Sua massa constitui de 8% a 25% da massa do ventrículo. Entre o átrio e o ventrículo existe a válvula atrioventricular, suportada por um anel de tecido cardíaco (FARREL e JONES, 1992).

O ventrículo pode apresentar grande variabilidade intra e interespecífica em relação a massa e morfologia, e apresenta 2 camadas diferentes: uma interna que se estende por todo o ventrículo formando uma rede de aspecto esponjoso, chamada camada esponjosa; e outra externa que envolve a esponjosa, denominada camada compacta, associada a circulação coronariana. A maioria dos peixes possui predominância da camada esponjosa em seus ventrículos (FARREL e JONES, 1992).

As principais características que distinguem as células musculares cardíacas (cardiomiócitos) de peixes e mamíferos são: 1- tamanho reduzido em relação a dos mamíferos; 2- desenvolvimento limitado do retículo sarcoplasmático; 3- arranjo periférico das miofibrilas; 4- quantidade variável de mioglobina intracelular (FARREL e JONES, 1992; TIBBITS et al., 1991). O miócito de tamanho reduzido apresenta algumas vantagens funcionais, como uma maior razão entre a área superficial da sarcolema (figura 4) e o volume intracelular, e conseqüentemente, a menor distância de difusão do exterior para o interior da célula, fundamental para a troca de substâncias como o cálcio entre os espaços intra e extracelulares (DRIEDZIC e GESSER, 1994; VORNANEN, 1997).



Figura 4. Imagens confocais de miócitos ventriculares de truta e de rato, marcados com di-8-ANEPPS, um indicador fluorescente lipofílico (fonte: SHIELS e WHITE, 2005).

Os mamíferos apresentam os túbulos-T, que correspondem a invaginações da sarcolema que auxiliam na propagação do potencial de ação para o interior da célula e reduzem a distância de difusão do cálcio do meio extracelular para o meio intracelular e vice-

versa. Os túbulos-T representam de 30% a 50% da área sarcolemal ventricular dos mamíferos, onde também é encontrada maior densidade de canais de cálcio (BERS, 1991). No entanto, os peixes e os demais ectotérmicos já estudados não possuem túbulos-T. Assim sendo, as vantagens apresentadas pelos túbulos-T dos mamíferos são, em parte, compensadas pelo aumento da taxa de difusão proporcionada pelo menor diâmetro dos cardiomiócitos dos peixes.

Outra característica importante que difere os cardiomiócitos de peixes e mamíferos é a abundância, distribuição, e funcionalidade do retículo sarcoplasmático (RS), organela especializada na reserva e liberação de cálcio para a contração muscular. O RS é relativamente bem desenvolvido em aves e mamíferos, refletindo grande importância do cálcio intracelular para a ativação do aparelho contrátil (CHAPMAN, 1983; BERS, 1987, 1989, 1991, 2001; GWATHMEY e MORGAN, 1991). Entretanto, o desenvolvimento do RS varia amplamente em diferentes espécies de vertebrados ectotérmicos. Na maioria dos peixes o RS é pouco desenvolvido e seu papel na contração do miocárdio é questionável (AHO e VORNANEN, 1998; DRIEDZIC e GESSER, 1988; SHIELS e FARRELL, 1997).

Embora os peixes apresentem menor abundância das miofibrilas contráteis em relação aos mamíferos, normalmente essas miofibrilas estão distribuídas mais próximas a sarcolema do que nos miócitos dos mamíferos (SANTER e COBB, 1972; VORNANEN, 1997), permitindo uma difusão eficiente do cálcio extracelular até o aparato contrátil, mesmo na ausência dos túbulos-T (FARRELL e JONES, 1992).

O produto da frequência e da força de contração, denominado débito cardíaco, deve ser regulado a fim de que haja um fluxo sanguíneo apropriado para a execução do trabalho de todos os tecidos nas mais variáveis condições impostas pelo ambiente (TIBBITS et al., 1992), principalmente em animais ectotérmicos, em que o equilíbrio homeostático sofre influência direta das oscilações ambientais.

O acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C) corresponde à sequência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração e o relaxamento muscular. A geração de força e, em parte, a frequência cardíaca, dependem da quantidade de Ca^{2+} que interage com as proteínas contráteis, bem como do tempo em que o Ca^{2+} permanece disponível no citosol para esta interação (YUE, 1987). A principal diferença entre ectotérmicos e endotérmicos está relacionada com a origem do cálcio a ser utilizado pelas miofibrilas (TIBBITS et al., 1992).

A compreensão dos mecanismos envolvidos no acoplamento E-C serve de base para o entendimento da estratégia utilizada para manter um débito cardíaco apropriado em cada uma das espécies (BERS, 1991).

Um esquema do acoplamento excitação-contração em mamíferos é mostrado na figura 5.

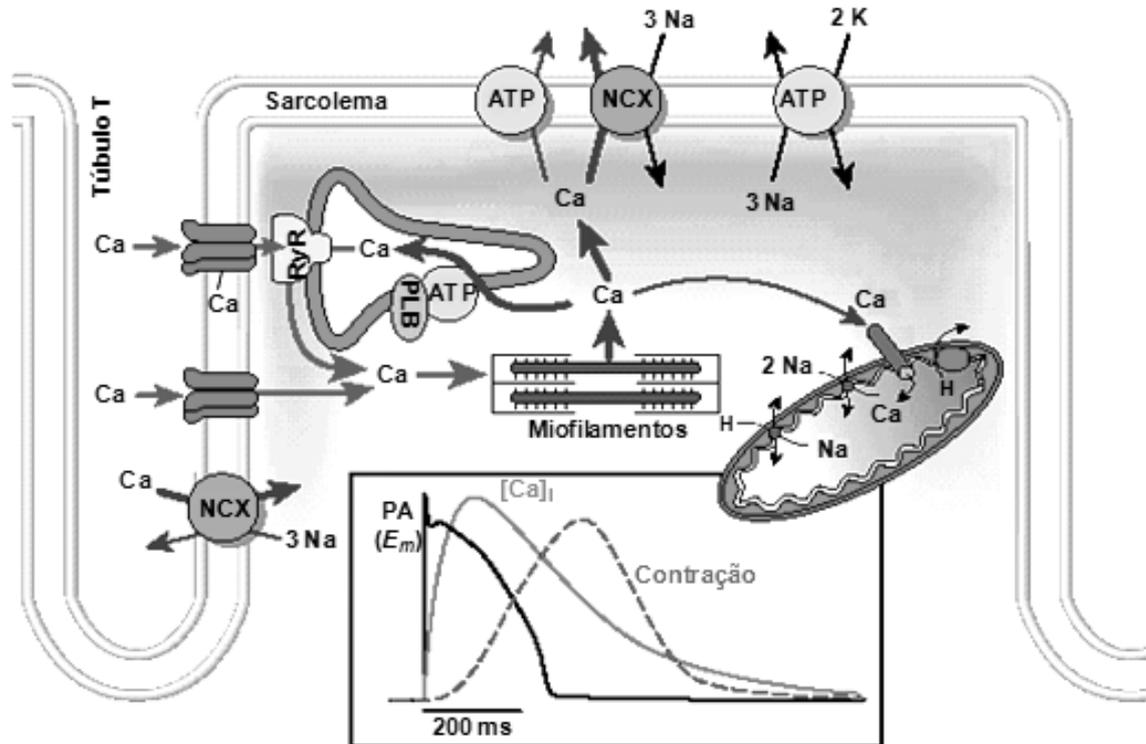


Figura 5. Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco de mamíferos. As setas representam as vias de entrada de Ca^{2+} no sarcoplasma, e as vias de remoção deste íon do mesmo. DHPR: canal de dihidropiridina (canal L); RS: retículo sarcoplasmático; RyR: canal de Ca^{2+} do RS (canal de rianodina); NCX: do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; SERCA: Ca^{2+} -ATPase do RS; PLB: fosfolambano (modificado de BERS, 2002).

O cálcio que promove a interação actino-miosínica (Ca^{2+} ativador) origina-se de duas fontes principais: a) Meio extracelular: pela sarcolema, através dos canais voltagem-dependentes do tipo L (canais lentos) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) no modo reverso; b) Reservas internas: principalmente o retículo sarcoplasmático (RS).

Fabiato (1983) propôs que, em mamíferos, o influxo transarcolemal de cálcio, através de canais tipo L e do NCX, dispara a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS, através de canais de cálcio denominados canais de rianodina (BERS, 1991), processo denominado liberação de cálcio cálcio-induzida (“calcium-induced calcium release” - CICR).

A rianodina é um alcalóide neutro que, quando aplicado em altas concentrações ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), liga-se específica e irreversivelmente ao canal de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (canal de rianodina), mantendo-o aberto, prevenindo o acúmulo de Ca^{2+} em seu interior (ROUSSEAU et al. 1987). Assim, a rianodina tem sido utilizada para o teste da importância funcional do RS no acoplamento E-C de diversos vertebrados (COSTA et al., 2002; DRIEDZIC e GESSER, 1988; HOVE-MADSEN, 1992; RIVAROLI et al., 2006; ROCHA et al., 2007).

Apesar da quantidade do influxo de cálcio através dos canais L da sarcolema ser variável nas diferentes espécies de mamíferos, a maioria dos estudos indica que este é insuficiente para ativar a contração (BERS, 1991; CHAPMAN, 1983). Assim, a principal fonte de cálcio para a contração muscular cardíaca em mamíferos provém da liberação do RS. (WIER, 1990).

Diversas espécies de teleósteos parecem ser insensíveis à rianodina, indicação indireta de que o influxo de cálcio extracelular é o principal mecanismo de ativação da contração (TIBBITS et al., 1992; VORNANEN, 1997, 1998), como ocorre na tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (COSTA et al., 2000). Entretanto, em alguns teleósteos, parte do Ca^{2+} utilizado pelo aparato contrátil nos miócitos cardíacos é liberada por depósitos intracelulares (RS), como visto no curimatá, *Prochilodus lineatus*, e na traíra, *Hoplias malabaricus* (RIVAROLI et al., 2006).

O relaxamento muscular ocorre com a redução da concentração de cálcio do citosol, através do efluxo pela sarcolema por meio da atividade da Ca^{2+} -ATPase e do NCX, e/ou por sua receptação pelo RS por meio da atividade da Ca^{2+} -ATPase-sarco(endo)plasmática, ou SERCA (TIBBITS et al., 1992).

O processo de relaxamento nos miócitos de peixes com o RS pouco desenvolvido é atribuído à saída do Ca^{2+} citosólico principalmente por ação da Ca^{2+} -ATPase sarcolemal e pelo NCX. (VORNANEN et al., 2002). Já no coração de mamíferos, a SERCA e o NCX são os principais mecanismos para reduzir a concentração citosólica de cálcio a fim de induzir o relaxamento máximo (VORNANEN et al., 2002).

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

Por tudo o que foi anteriormente exposto e pela falta de informações acerca dos efeitos fisiológicos do Fipronil em organismos não-alvo como os peixes, o presente trabalho propôs-se a investigar o efeito de uma baixa concentração deste inseticida, quando presente no sedimento ($4.23 \mu\text{g.Kg}^{-1}$), sobre a contratilidade miocárdica do cascudo da espécie *Hypostomus regani*. A escolha de tal concentração e forma de exposição baseou-se no estudo de Peret (2009), que encontrou Fipronil no sedimento da Lagoa do Óleo, uma lagoa marginal do Rio Mogi-Guaçu situada no município de Luiz Antônio, SP, nesta mesma concentração.

1.3. Considerações sobre a espécie estudada

No presente estudo foram utilizados exemplares do cascudo da espécie *Hypostomus regani* (figura 6).



Figura 6. Exemplar de *Hypostomus regani* (Ihering, 1905).

Entre os vertebrados vivos, os peixes apresentam ampla distribuição e representam o grupo mais diversificado. Os diferentes habitats e o grande número de espécies oferecem uma gama sem paralelo para as variações da história evolutiva desse grupo (POUGH, 2003). Segundo Eschmeyer e Fong (2012), são consideradas válidas 32.184 espécies de peixes.

O gênero *Hypostomus* pertence à família Loricariidae, ordem Siluriforme.

Dentre as 62 ordens de peixes vivos, Siluriformes é a terceira maior em número de espécies, ficando atrás apenas das ordens Perciformes e Cypriniformes (NELSON,

2006). São conhecidos popularmente como peixes de couro, cascudos, mandis, bagres, entre outros, e representam mais de 35% das espécies neotropicais, com 1647 espécies descritas.

Em relação a posição filogenética, a ordem Siluriformes e seu provável grupo irmão, a ordem Gymnotiformes, são considerados os membros mais derivados da Superordem Ostariophysi. Os Siluriformes, juntamente com Cypriniformes, Characiformes e Gymnotiformes, constituem um clado denominado série Otophysi, que compreende um grupo de peixes ósseos diagnosticado por apresentarem o aparelho de Weber, um complexo formado por um conjunto de ossículos e ligamentos que conectam a bexiga natatória ao ouvido interno (BURGESS, 1989; FINK e FINK, 1996).

Loricariidae é a família com maior número de espécies entre todos os siluriformes (NELSON, 2006). Os peixes desta família apresentam corpo achatado dorso-ventralmente coberto por placas ósseas e boca ventral em forma de ventosa, sendo considerados animais de fundo, hábeis para aderir ao substrato em rios de forte correnteza, obtendo alimento raspando o fundo dos rios. Quanto a sua biologia reprodutiva, os Loricariidae apresentam baixa fecundidade, desovando poucos ovos grandes e adesivos (FÁVARO, 1999).

Hypostominae corresponde a uma das subfamílias de Loricariidae, contendo muitas espécies com taxonomia imprecisa, provavelmente por conta de possíveis erros de alguns autores ao identificar e analisar a alta variabilidade interespecífica na morfologia e no padrão de coloração dos espécimes desse grupo (WEBER, 2003).

Os peixes que constituem essa família são conhecidos popularmente como cascudos, e além de corpo coberto por placas ósseas e boca ventral em forma de ventosa, apresentam pedúnculo caudal alto, não deprimido e região interopécula com pouca mobilidade, provida de espinhos curtos não eréteis. Vivem essencialmente em ambientes dulcícolas, com excessão de *Hypostomus watwata*, que vive em regiões estuarinas de rios das Guianas. A maioria desses animais apresenta hábitos crepusculares, alojando-se em pedras e troncos de árvores mortas no período diurno (WEBER, 2003).

De acordo com a classificação proposta por Armbruster (2004), a subfamília Hypostominae abrange 60 gêneros. Entre eles, o gênero *Hypostomus* representa o grupo mais numeroso, com 125 espécies (ZAWADZKI et al., 2010), amplamente distribuído pela América do Sul, ocorrendo em uma grande variedade de ecossistemas de água-doce, desde pequenos riachos até rios com extensas áreas de várzea (OYAKAWA et al., 2005). Os peixes desse gênero apresentam focinho revestido por placas pequenas, interopérculo pouco móvel desprovido de cerdas pouco hipertrofiadas e nadadeira adiposa usualmente presente

(BRITSKI et al., 1999). Além disso, *Hypostomus* apresenta elevada diversidade interespecífica quanto ao padrão de coloração e morfologia, sendo o gênero de cascudos predominante nos rios brasileiros (BRITSKI, 1972).

Hypostomus regani é geralmente encontrado ao longo do Rio Mogi-Guaçu (CARDOSO et al., 2012). É uma espécie bentônica, normalmente encontrada sobre substratos de ambientes lóticos, próximos a quedas d'água, onde a água é bem oxigenada. Apresenta hábitos relativamente sedentários, com respiração aérea facultativa, utilizando o trato gastrointestinal ricamente vascularizado para trocas gasosas em situações de hipóxia aquática. Um estudo avaliando os parâmetros cardiorrespiratórios *in vivo* com essa espécie verificou que a frequência cardíaca, quando aclimatados à 20°C e 25°C e em normóxia, é aproximadamente 70 batidas por minuto (bpm), e quando aclimatados à 30°C é em torno de 110 bpm (NELSON et al., 2007).

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo estudar os possíveis efeitos da exposição aguda (96 h) ao pesticida fipronil (Fpn) sobre a função cardíaca *in vitro* do cascudo *Hypostomus regani*.

Para tanto, foram utilizados exemplares de *H. regani* em condições controle e após exposição aguda a $4.23 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de fipronil, adicionado a sedimento artificial, utilizando-se a formulação comercial Regent 800 WG[®] (BASF – 80% fipronil).

Os seguintes parâmetros foram analisados:

a) Massa ventricular relativa (MVR);

b) Respostas inotrópicas e cronotrópicas de tiras ventriculares eletricamente estimuladas para verificar:

- O efeito do tempo experimental sobre o desenvolvimento de força isométrica;
- A importância do cálcio extracelular para o desenvolvimento de força das tiras ventriculares da espécie;
- A importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ como fornecedor de cálcio para contração miocárdica.
- A importância do retículo sarcoplasmático como fornecedor de cálcio para contração miocárdica.
- A importância da bomba de Na^+/K^+ ATPase para a contração miocárdica.
- O efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração;
- A capacidade de bombeamento cardíaco (CBC).

c) Verificar se há expressão da proteína SERCA2 no músculo ventricular de *H. regani* em condições controle e exposto ao fipronil.

3. Material e Métodos

Os exemplares de cascudo da espécie *Hypostomus regani* ($n = 30$, $Wt = 85,0 \pm 13,5$ g) foram cedidos pela Psicultura Santa Cândida (Santa Bárbara d'Oeste). Os experimentos foram aprovados pelo CEUA/UFSCar (Protocolo nº018/2013).

No Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar, os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros com recirculação de água declorada (pH 7,0; DO_2 6,5-7,3 $mg.L^{-1}$; dureza 48-56 $mg.L^{-1}$ como $CaCO_3$, alcalinidade 40-43 $mg.L^{-1}$ como $CaCO_3$ e condutividade 120-128 $\mu S.cm^{-1}$), aeração constante (condições normóxicas, $PwO_2 \geq 135$ mmHg), temperatura controlada (25 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 30 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes com 40% de proteína.

3.1 Desenho Experimental

Após a preparação do sedimento artificial (item 3.1.1), três quilos deste material foram acondicionados em caixas plásticas pretas (figura 7) para assegurar que não houvesse fotodegradação do inseticida, quando presente. Em seguida, adicionou-se lentamente 30 litros de água.



Figura 7. Caixas plásticas onde os peixes foram mantidos por 96 horas antes dos experimentos.

Após um período de 24 horas, tempo necessário para a total sedimentação do material em suspensão, os peixes foram acondicionados nas caixas experimentais. Em cada caixa foram colocados no máximo dois peixes, onde permaneceram por 96 horas com aeração

constante e em jejum e em seguida, os experimentos foram conduzidos. Tal procedimento está esquematizado na figura 8.

Estes procedimentos foram realizados tanto para o grupo controle quanto para o grupo exposto ao fipronil (Fpn). Entretanto, para o grupo exposto, antes da adição dos 30 L de água, o inseticida Regent 800 WG[®] foi adicionado ao sedimento da caixa experimental para atingir uma concentração de $4,23 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de fipronil (1 ml de água destilada contendo $15,8 \mu\text{g}$ de Regent 800 WG[®]).

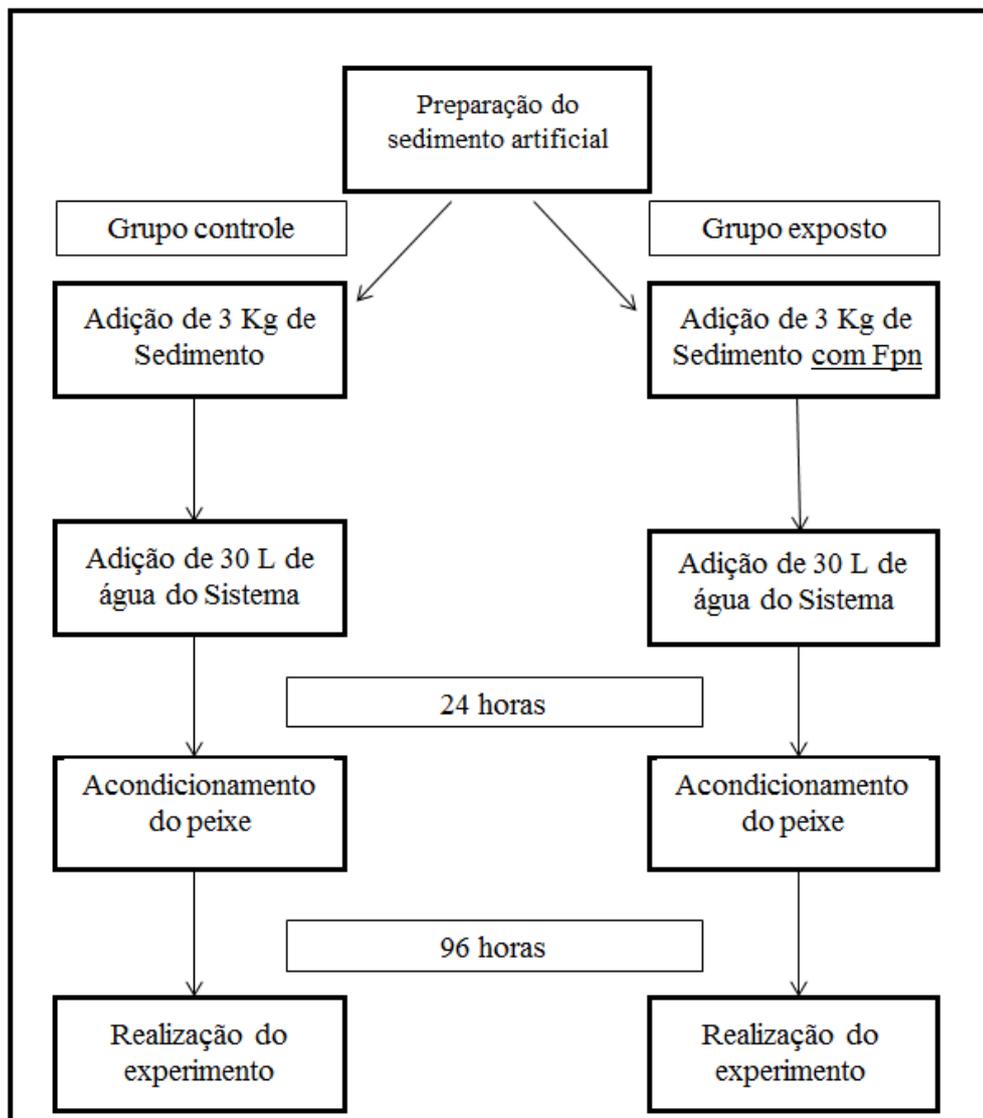


Figura 8. Esquema do procedimento de exposição ao sedimento artificial.

3.1.1 Preparação do Sedimento Artificial

O sedimento utilizado no presente estudo (figura 9) foi elaborado com base no trabalho de Arrate et al., (2004), que apresenta uma formulação para sedimento artificial, e no trabalho de Cunha-Santino e Bianchini Jr (2013), que descreve o percentual de matéria orgânica presente no sedimento da Lagoa do Óleo, de 23%.

O sedimento artificial foi preparado com os seguintes compostos: terra vegetal comercial da marca “Plante Bem”, areia de quartzo, argila comercial seca e triturada, macrófita *Urochloa subquadrifera* seca e moída no moinho de facas (TECNAL, modelo TE-650).

Três amostras da terra vegetal de diferentes lotes foram separadas e calcinadas a 550 °C em mufla (EDG, modelo Edgcon 3P) a fim de quantificar o teor de matéria orgânica, obtendo-se o percentual médio de 24,8%. O mesmo procedimento foi realizado com a macrófita *Urochloa subquadrifera* moída, obtendo-se o percentual médio de 96,55%. Com base nestes dados, o sedimento foi elaborado com a seguinte formulação: 90% de terra vegetal, 0,33% de macrófita moída, 4,83% de areia de quartzo, 4,83% de argila moída. Ao final, o percentual de matéria orgânica do sedimento elaborado no presente estudo foi de 23%, mesma composição descrita para o sedimento encontrado na Lagoa do Óleo.



Figura 9. Sedimento artificial usado no experimento.

3.2. Preparações e Procedimentos Experimentais *in vitro*

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos adotados por Monteiro et al. (2011), descritos a seguir.

Os peixes de ambos os grupos experimentais foram sacrificados por meio de concussão cefálica em conformidade com as normas da “American Veterinary Medical Association” (AVMA, 2001) e imediatamente pesados. O coração foi removido cirurgicamente e colocado em solução fisiológica controle gelada própria para teleósteos de água-doce, com a seguinte composição: 125,0 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 0,94 mM de MgSO₄, 1,0 mM de NaH₂PO₄, 30,0 mM de NaHCO₃, 1,5 mM CaCl₂, 10 mM de glicose. A essa solução foi borbulhada uma mistura carbogênica (2% CO₂ e 98% O₂) a 25°C por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, o pH final da solução foi acertado para 7,2.

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

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

As extremidades das tiras foram cuidadosamente presas a duas pequenas espirais metálicas e transferidas para um banho contendo 30 mL de solução fisiológica termostatizada a 25°C, dotado de borbulhamento constante de mistura carbogênica. Uma extremidade da tira foi fixada, por meio de uma das espirais metálicas, a um gancho construído na parte terminal de um eletrodo de estimulação de platina. A espiral metálica da outra extremidade foi presa a um fio de aço conectado a um gancho metálico que, por sua vez, foi acoplado a um transdutor de força isométrica (LETICA Scientific Instruments, Espanha). A figura 10 mostra o esquema detalhado da preparação.

Os eletrodos de estimulação de platina foram acoplados a estimuladores AVS-100D (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP), nos quais foram gerados impulsos elétricos com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior àquela necessária para que se atinja o limiar da resposta mecânica (~90 V), permitindo assim a estimulação elétrica das tiras para o desenvolvimento da tensão isométrica a diferentes taxas de estimulação. Os transdutores de força isométrica foram acoplados a um amplificador AECAD 0408 (Solução Integrada Ltda.,

São Paulo, SP) conectado a um computador para que os registros das tensões isométricas pudessem ser efetuados pelo software AQCAD - Soft & Solutions (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP).



Figura 10. Set experimental utilizado para a obtenção dos registros da contração isométrica das tiras ventriculares do cascudo: A. cilindro de mistura carbogênica; B. banho termostaticado; C. amplificador de força; D. estimuladores elétricos; E. banho com quatro cubetas; F. sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.

As tiras ventriculares foram estimuladas a uma frequência constante de 0,4 Hz (24 bpm) e estiradas, utilizando-se micromanipuladores, para aumentar a distância entre o transdutor de força isométrica e o gancho de fixação do eletrodo de platina. O estiramento foi realizado até que uma relação constante entre o comprimento da preparação e o pico de tensão seja obtida seguindo a lei de Frank-Starling, ou seja, a força de contração cardíaca está diretamente relacionada ao grau de estiramento da fibra miocárdica (ALLEN e KENTISH, 1985). Dessa forma, a tensão máxima foi atingida a 0,4 Hz e seguiu a um período de estabilização do tecido cardíaco de 20 a 30 minutos. Após a estabilização, os diferentes protocolos experimentais, descritos a seguir, foram realizados:

3.2.1. Efeito do Tempo

As tiras ventriculares foram mantidas a 0.4 Hz (24 bpm) na temperatura de aclimatação (25°C) por um período de 40 minutos, onde foram realizadas marcações a cada 10 minutos. Durante tal período a força isométrica de contração (F_c) e os parâmetros tempo-

dependentes (TPT e THR) foram registrados ininterruptamente para avaliar a possível ocorrência de sua deterioração no decorrer do período experimental.

3.2.2. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio Extracelular

As tiras ventriculares foram estabilizadas a 0,4 Hz na temperatura de aclimatação (25 °C) em solução fisiológica contendo 1,5 mM de Ca^{2+} , por um período de aproximadamente 15 min. Após este período, serão efetuados registros do desenvolvimento de força isométrica das tiras por 3 min.

A seguir, as concentrações de Ca^{2+} das preparações serão elevadas em 2 mM a cada 10 minutos (por meio da adição de CaCl_2) ou após cada concentração ter produzido seu efeito completo. Os registros serão efetuados ao longo de todo o experimento para a análise da força de contração e dos parâmetros tempo-dependentes.

3.2.3. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequência)

Este protocolo foi realizado com o objetivo de determinar a capacidade do miocárdio dos peixes controles e expostos ao fipronil em manter o acoplamento E-C frente a incrementos da frequência de contração. As tiras ventriculares foram submetidas a incrementos progressivos de 0,2 Hz na frequência de estimulação partindo-se da frequência inicial de 0,4hz, até que os registros de se tornem irregulares. Essa relação força-frequência permite avaliar o desenvolvimento da força isométrica de contração do miocárdio desde frequências sub-fisiológicas até supra-fisiológicas. Foram consideradas frequências de estimulação máximas aquelas em que 80% das tiras ventriculares se contraíam de forma regular.

3.2.4. Tensão pós-pausa

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

Após a estabilização, a tira ventricular foi estimulada a uma frequência constante (0,4hz) durante 5 minutos. Seguir-se-á então um período de repouso de 5 minutos, após o qual a tira foi novamente estimulada a 0,4 Hz, sendo que a primeira contração registrada após a primeira estimulação foi considerada a tensão pós-repouso. A tensão pós-pausa foi considerada como uma porcentagem da última contração precedente ao período de

repouso, permitindo assim a verificação de possíveis alterações na força de contração após as pausas diastólicas.

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

Para verificar a importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) na contratilidade do miocárdio dos grupos controle e exposto ao FPN, o NaCl contido na solução fisiológica utilizada no estudo foi substituído, na mesma molaridade, por LiCl, que tem a propriedade de bloquear tal trocador. As tiras ventriculares foram estabilizadas em solução controle (descrita no item 3.2) e, em seguida, a solução foi substituída pela solução contendo Li^+ . Logo após a troca de soluções, iniciaram os registros para avaliar a força de contração e os parâmetros tempo-dependentes ao longo de 20 minutos, com marcações realizadas a cada 5 minutos. Em seguida, foi realizado o protocolo de pausa diastólica de 5 minutos e registrada a primeira contração após a pausa.

3.2.6. *Efeito do bloqueio da bomba de Na^+/K^+ ATPase*

A bomba de Na^+/K^+ -ATPase forma um complexo em conjunto com o NCX, dessa forma, a atividade destas proteínas está intimamente relacionada (FUJIOKA e BAN, 1998). A ouabaína é um glicosídeo que atua como um inibidor específico da bomba Na^+/K^+ -ATPase (SCHWARTZ et al., 1998) e, dessa forma, pode ser utilizada para verificar o papel da Na^+/K^+ -ATPase e do NCX para a contratilidade cardíaca.

As tiras ventriculares foram estabilizadas em solução fisiológica sem ouabaína, em uma frequência de estimulação de 0,4 hz. Após a estabilização das tiras, foi iniciada a gravação dos registros das contrações em solução sem ouabaína por 5 minutos e, em seguida foram adicionadas concentrações crescentes de ouabaína a cada 20 minutos. As concentrações utilizadas foram 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M.

3.3. **Procedimentos experimentais de Western Blot**

Os peixes de ambos os grupos experimentais foram sacrificados por meio de concussão cefálica em conformidade com as normas da “American Veterinary Medical Association” (AVMA, 2001) e imediatamente pesados. O coração foi removido cirurgicamente, para que o ventrículo fosse separado, e instantaneamente congelados em nitrogênio líquido (-198°C) para em seguida serem mantidos em freezer à -80°C .

3.3.1. **Homogeneização do músculo cardíaco**

Os ventrículos congelados (-80°C) do peixe *H. regani* e do rato Wistar foram homogeneizados. Foi utilizado aproximadamente 500 mg de tecido em 500 µL de tampão hiperosmótico (Sacarose 250 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,4).

Os homogenatos dos tecidos foram obtidos com a utilização do homogeneizador IKA (T 10 basic ULTRA-TURRAX®), sendo mantidos no gelo durante todo o procedimento. Cada procedimento foi realizado separadamente.

Os homogenatos obtidos foram vertidos em microtubos e centrifugados a uma força de 10000 G por 40 min a 4°C para remover células intactas, fragmentos celulares e frações ricas em partículas de origem nuclear, citoesquelética e mitocondrial (NECKÁR et al., 2005). Em seguida, o sobrenadante foi colhido e o precipitado descartado.

Para obtenção da fração microsomal, o sobrenadante foi levado a ultracentrifugação com força de 100000 G a 4°C por 60min. Após a ultracentrifugação o sobrenadante, que representa a fração citosólica, foi descartado, as vesículas microsomais que constituem a fração com maior densidade (após a separação prévia) encontraram-se no precipitado na forma de uma densa massa ao fundo do tubo, denominado pellet. Os pellets de cada tubo foram ressuspensos em um volume reduzido (100 a 150 µL) de tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM; EDTA 1mM; pH 7,4). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.3.2. Quantificação de proteína

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com método de Bradford (1976), utilizando o kit para medida de proteínas da Bio-Rad®.

3.3.3. Expressão proteica de SERCA2

Os homogeneizados de tecido foram analisados por Western blotting. (BURNETTE et al., 1981). Vinte e cinco microgramas de proteína do ventrículo esquerdo do Rato Wistar e cem microgramas do ventrículo de *H. regani* e padrões moleculares SDS-PAGE pré-colorados (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA) foram separados por eletroforese em SDS-PAGE 7,5% utilizando o tampão Tris 3 g, glicina 14,4 g, SDS 10% (10 ml) e água destilada q.s.p 1L. Em seguida, as amostras foram transferidas para membranas de polivinil difluoreto (PVDF) durante 10 horas a 4 °C, usando um sistema celular de transferência Mini Trans-Blot (Bio-Rad) contendo Tris 25 mM, glicina 190mM, metanol 20% e SDS 0,05% e água destilada q.s.p 1L.

Em seguida, a membrana foi bloqueada por 60 minutos à temperatura ambiente em solução tamponada Tris (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,4) com 5%

de leite desnatado em pó. Posteriormente, a membrana foi incubada durante a noite a 4°C com os anticorpos policlonais de cabra anti-SERCA2 (0,5 µg/mL, SERCA2: sc-8095, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A).

Após a incubação, as membranas foram lavadas por 30 minutos com a solução tamponada Tris, em seguida foram incubadas com o anticorpo secundário (anticorpo anti-cabra IgG conjugado com a fosfatase alcalina 0,2. µg/mL, IgG-AP: sc-2355, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.) por 90 minutos.

A membrana foi cuidadosamente lavada com água destilada e os imunocomplexos foram detectados através do revelador Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad). Parcelas de proteínas nos géis foram quantificadas pelo software ImageJ (ABRAMOFF et al., 2004), em unidades arbitrárias de densidade óptica. Amostras com concentrações definidas (1.0; 5.0; 10; 15; 20 mg.ml⁻¹) foram usadas como padrão para estimar as concentrações.

4. Análise dos Resultados

4.1. Forma de apresentação dos dados

Todos os protocolos experimentais foram aplicados para os peixes de ambos os grupos experimentais e tiveram um n mínimo de 8. Os registros foram arquivados em um computador, onde os mesmos foram posteriormente analisados pelo software ANCAD (Soft & Solutions/Solução Integrada Ltda., São Paulo, Brasil).

Ao término de cada protocolo, as tiras ventriculares foram levemente secas em papel de filtro para a determinação do peso úmido da porção da tira responsável pelas contrações isométricas registradas. O comprimento da porção contrátil das tiras ventriculares também foi medido. Tanto a massa quanto o comprimento das tiras ventriculares foram usados no cálculo da área de seção transversal (CSA – “cross-sectional area” - mm²), assumindo-se a densidade muscular de 1,06 g.cm⁻³ (LAYLAND et al, 1995).

A força de contração isométrica de cada tira ventricular (Fc - mN.mm⁻²) foi calculada pela diferença entre os valores do pico da tensão isométrica e da tensão de repouso (RT – “resting tension” - mN.mm⁻²) dividida pela CSA da respectiva tira. Os parâmetros tempo-dependentes foram analisados em todos os protocolos experimentais e expressos em

valores absolutos como TPT (“time to peak tension” – ms) e THR (“time to half relaxation” – ms) e através das relações TPT/Fc e THR/Fc (ms. $\text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2$).

A figura 11 apresenta todas as variáveis analisadas em cada protocolo. O produto do pico da força de contração isométrica pela frequência de estimulação foi usado para determinar o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBP - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) de acordo com MATIKAINEN e VORNANEN (1992). Vale ressaltar que tal medida é apenas uma estimativa do funcionamento do coração enquanto “bomba” uma vez que leva em consideração apenas a tensão isométrica desenvolvida pelas tiras cardíacas isoladas.

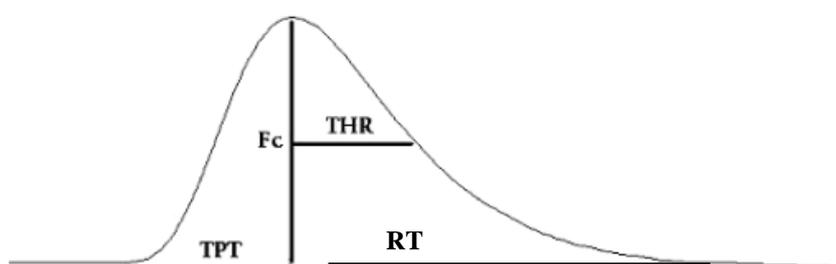


Figura 11. Variáveis medidas no registro de força de contração isométrica nos diferentes protocolos experimentais. Fc: força de contração isométrica; TPT: tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento. (adaptado de MONTEIRO, 2011).

4.2. Tratamento estatístico dos dados

Os valores de todos os parâmetros analisados foram expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. Todos os testes foram realizados de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade. Foram realizados os seguintes procedimentos:

- Análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo teste de post-roc Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para verificar a existência de possíveis diferenças significativas entre os valores de um mesmo protocolo experimental tendo como referência de controle os valores iniciais de cada protocolo (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- Teste-t de Student não-pareado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes de diferentes grupos experimentais (controle e exposto) (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5. Resultados

5.1. Massa Ventricular Relativa

A massa ventricular relativa (MVR) de ambos os grupos experimentais é apresentada na figura 12 e na tabela 2. Não foi encontrada diferença significativa na massa ventricular relativa do grupo controle quando comparado ao grupo exposto ao Fpn.

Tabela 2. Valores em porcentagem da massa ventricular relativa dos grupos controle e exposto ao Fpn.

	Controle	Exposto
MVR (%)	0,04±0,002	0,044±0,002

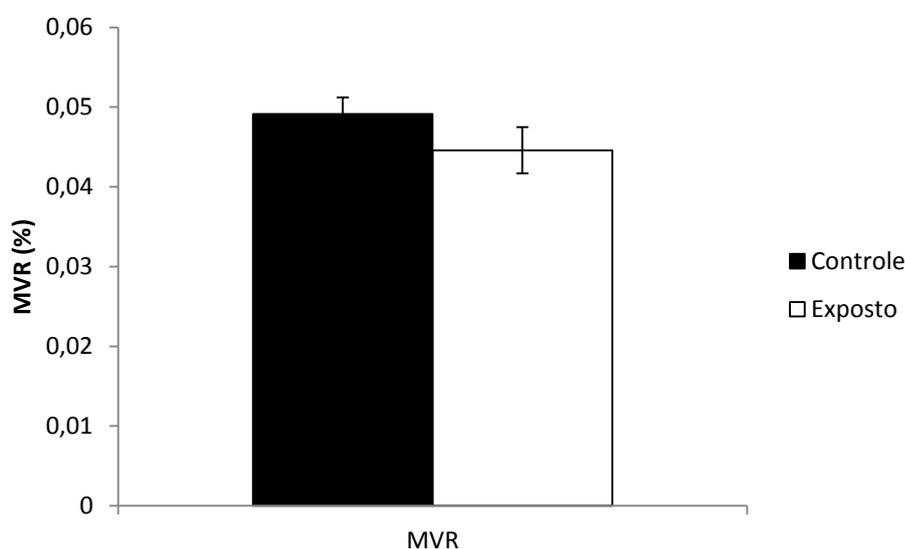


Figura 12. Massa ventricular relativa (MVR) de *H. regani* dos grupos controle (n = 10) exposto (n = 10). Valores médios \pm 1 EPM.

5.2. Efeito do Tempo experimental

O teste do efeito do tempo na contratilidade das tiras ventriculares foi realizado para averiguar se ao longo de todo o período experimental não há redução da capacidade contrátil. Esta é uma análise importante para validar o experimento, pois mostra que qualquer alteração na função contrátil da fibra cardíaca decorre do protocolo aplicado e não por uma possível degradação celular em função do tempo de experimento.

Os valores médios de Fc desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *H. regani*, estimulados a 0,4 Hz, ao longo do tempo experimental (40 min), nos grupos Controle e Exposto ao fipronil são apresentados na tabela 3 e representados graficamente na figura 13. Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) estão representados

graficamente nas figuras 14 e 16 e nas tabelas 3 e 4, respectivamente. A análise da relação entre os parâmetros tempo-dependentes e a força de contração (TPT/Fc e THR/Fc) mostra quantos ms são necessários para o desenvolvimento e 1 mN de força (figuras 15 e 16 e tabelas 3 e 4).

A comparação entre os valores registrados a cada 10 minutos dos 2 grupos experimentais demonstrou que, durante os 40 minutos de estimulação ininterrupta, não houve alteração significativa na Fc em ambos os grupos. No entanto, a Fc do grupo exposto mostrou-se maior do que a do grupo controle durante todo o tempo experimental. Os parâmetros tempo-dependentes (TPT, TPT/Fc, THR e THR/Fc) não sofreram alterações significativas ao longo dos 40 minutos experimentais em nenhum dos grupos. Entretanto, o TPT nos primeiros 10 minutos no grupo exposto foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle, e a relação TPT/Fc do grupo exposto foi menor do que a do grupo controle ao longo dos 40 minutos experimentais. Para o THR, o grupo Exposto apresentou valor significativamente menor em comparação com o Controle somente no início do experimento, em zero minuto, e para a relação THR/Fc, o grupo exposto apresentou valores significativamente menores que o grupo controle durante todo o protocolo experimental.

Tabela 3. Força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12) durante 40 minutos em uma frequência de 0,4 Hz. Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Fc (mN.mm ⁻²)	
	Controle	Exposto
0	1,84 \pm 0,29	3,13 \pm 0,47
10	1,94 \pm 0,36	3,09 \pm 0,48
20	1,7 \pm 0,33	2,88 \pm 0,45
30	1,55 \pm 0,31	2,67 \pm 0,41
40	1,47 \pm 0,30	2,55 \pm 0,37

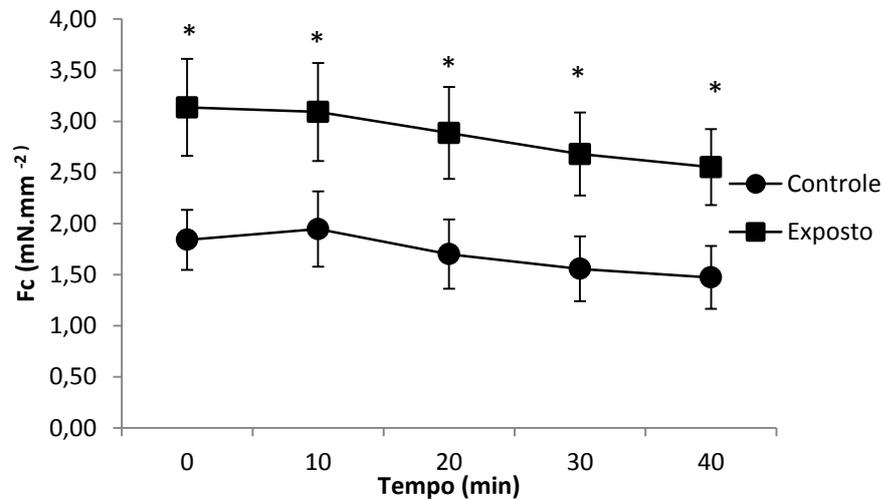


Figura 13. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre a força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 4. Valores de tempo para que o pico de tensão (TPT) seja atingido e da relação tempo de contração/força de contração (TPT/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12) durante 40 minutos em uma frequência de 0,4hz. Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	TPT (ms)		TPT/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0	288 \pm 6	266 \pm 6	229 \pm 45	129 \pm 17
10	287 \pm 7	269 \pm 5	249 \pm 44	143 \pm 17
20	2777 \pm 7	269 \pm 5	288 \pm 49	162 \pm 22
30	276 \pm 5	275 \pm 5	312 \pm 49	172 \pm 21
40	269 \pm 14	273 \pm 5	316 \pm 53	181 \pm 24

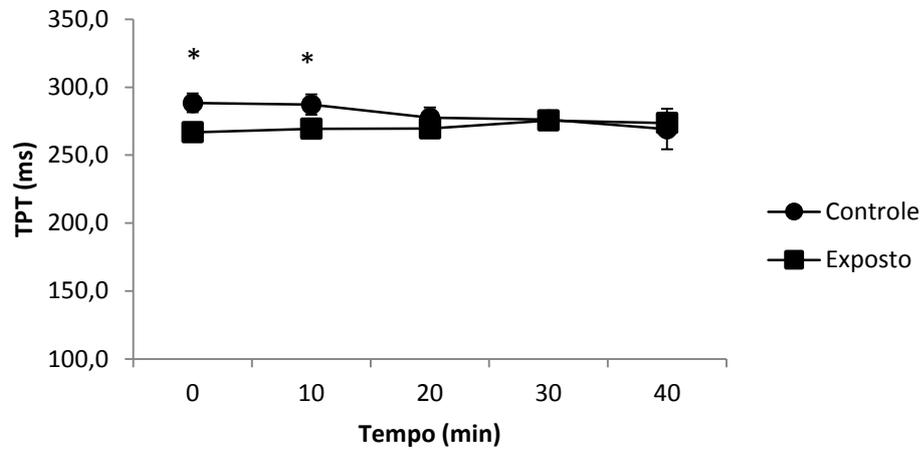


Figura 14. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre o tempo para o pico de força (TPT) de tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.

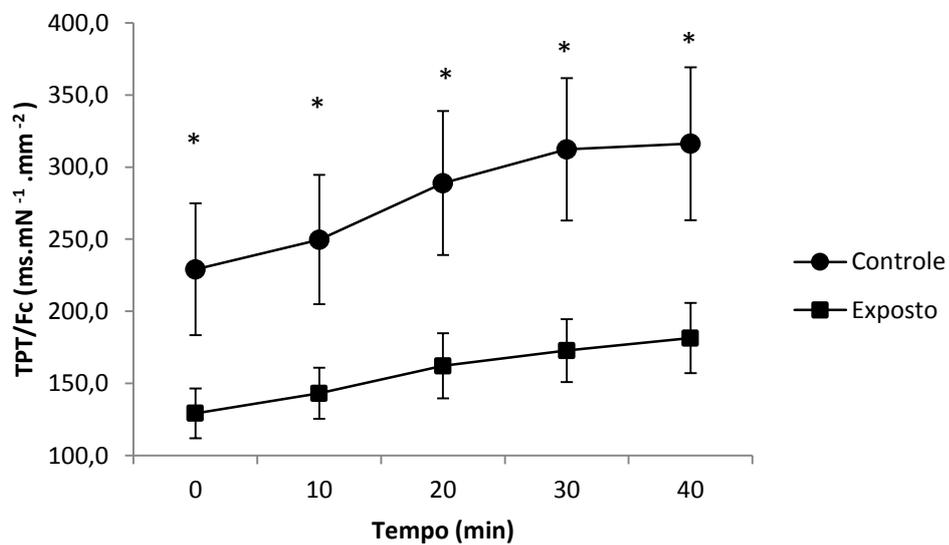


Figura 15. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre a relação tempo de contração/força das tiras ventriculares (TPT/Fc) de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 5. Valores de tempo para que a metade do relaxamento (THR) seja atingido e da relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle e exposto ao Fnp durante 40 minutos em uma frequência de 0,4hz. Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	THR (ms)		THR/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0	183 \pm 11	155 \pm 7	282 \pm 50	156 \pm 26
10	176 \pm 8	161 \pm 7	309 \pm 50	172 \pm 23
20	175 \pm 7	170 \pm 8	347 \pm 52	203 \pm 29
30	172 \pm 11	171 \pm 8	367 \pm 58	212 \pm 30
40	182 \pm 13	170 \pm 7	414 \pm 64	221 \pm 32

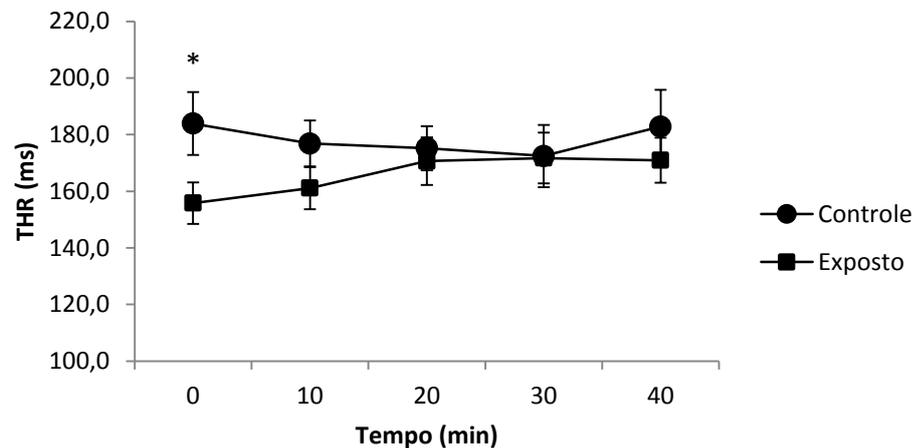


Figura 16. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre o tempo para metade do relaxamento (THR) de tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.

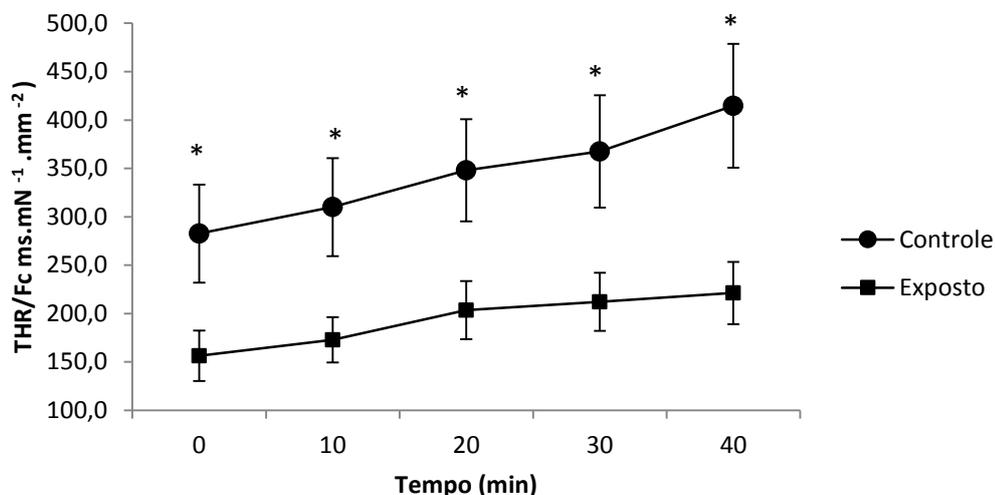


Figura 17. Efeito do tempo experimental de 40 minutos sobre a relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n=12) e exposto (n=12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.

5.3. Tensão Pós-Pausa

Os valores da força de contração (Fc - % de valores de pré-pausa) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani* após pausa diastólica de 5 minutos de ambos os grupos experimentais, em solução controle e solução com LiCl, estão apresentados numericamente na tabela 6, e graficamente na figura 18.

Apesar de ter sido observada uma tendência de aumento na Fc, as preparações em solução controle de ambos os grupos experimentais não apresentaram valores de Fc pós-pausas significativamente superiores aos apresentados antes das pausas. Em solução com lítio, também não foi encontrada diferença significativa dos valores de Fc pós-pausa, em relação aos valores pré-pausa, em ambos os grupos experimentais.

Os valores dos parâmetros tempo dependentes após a pausa em solução controle e em solução com lítio estão apresentados nas tabelas 7 e 8 (TPT e THR, respectivamente), e graficamente nas figuras 19 e 20. (TPT e THR, respectivamente).

Em solução controle, os valores de TPT da pós-pausa de ambos os grupos experimentais foram significativamente maiores em relação aos valores antes da pausa. Em solução com LiCl, não houve diferença significativa do TPT da pós-pausa em relação aos valores de pré-pausa.

O THR após a pausa diastólica, em solução controle, apresentou valores significativamente superiores em relação aos valores apresentados antes da pausa. Em solução

com LiCl, os valores de THR pós-pausa não diferiram significativamente em relação aos valores de pré-pausa, embora tenham apresentado uma tendência de aumento após a pausa.

Tabela 6. Valores da força de contração (Fc) pré-pausa e pós-pausa e da porcentagem de alteração após a pausa das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12), em solução controle e em solução com lítio. Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo	Fc (mN.mm ⁻²) - Sem lítio		Fc (mN.mm ⁻²) - Com lítio	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
Pré-Pausa	1,49 \pm 0,20	2,20 \pm 0,29	0,77 \pm 0,14	1,21 \pm 0,24
Pós-Pausa	1,92 \pm 0,26	2,75 \pm 0,36	0,74 \pm 0,13	1,26 \pm 0,21
Porcentagem dos valores	128,7 \pm 13,8	124,7 \pm 13	96,7 \pm 18	104,2 \pm 17

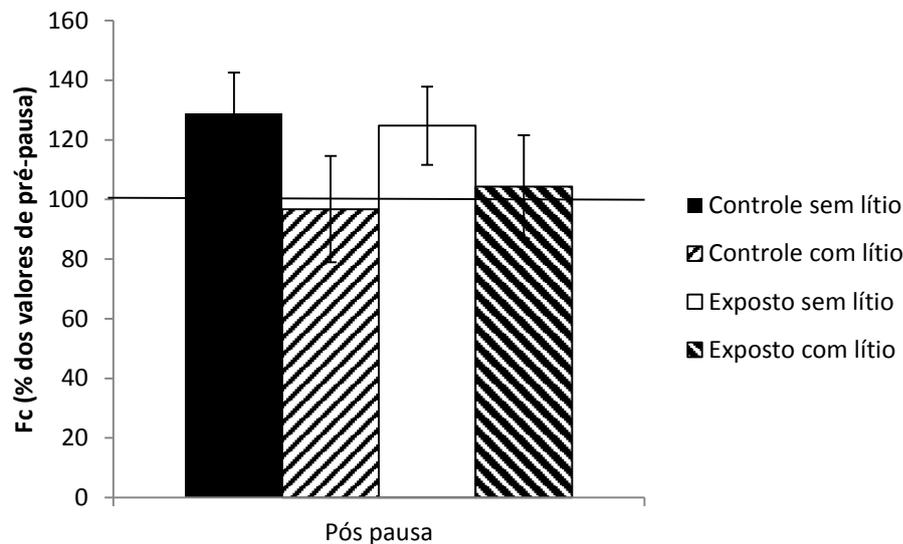


Figura 18. Efeito da pausa diastólica de 5 minutos sobre a força de contração (% de alteração) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12), em solução controle e em solução com lítio. A linha representa a média dos valores antes da pausa. Valores médios \pm 1 EPM.

Tabela 7. Valores de tempo para o pico de tensão (TPT) da pré-pausa e pós-pausa e da porcentagem de alteração após a pausa das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) em solução controle e em solução com lítio. Valores médios \pm 1 EPM.

Pós Pausa	TPT (ms) - Sem lítio		TPT (ms) - Com lítio	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
Pré pausa	285 \pm 6	276 \pm 6	324 \pm 10	324 \pm 18
Pós pausa	339 \pm 9	349 \pm 10	324 \pm 15	330 \pm 24
Porcentagem dos valores	118 \pm 2	126 \pm 2	99 \pm 4	101 \pm 7

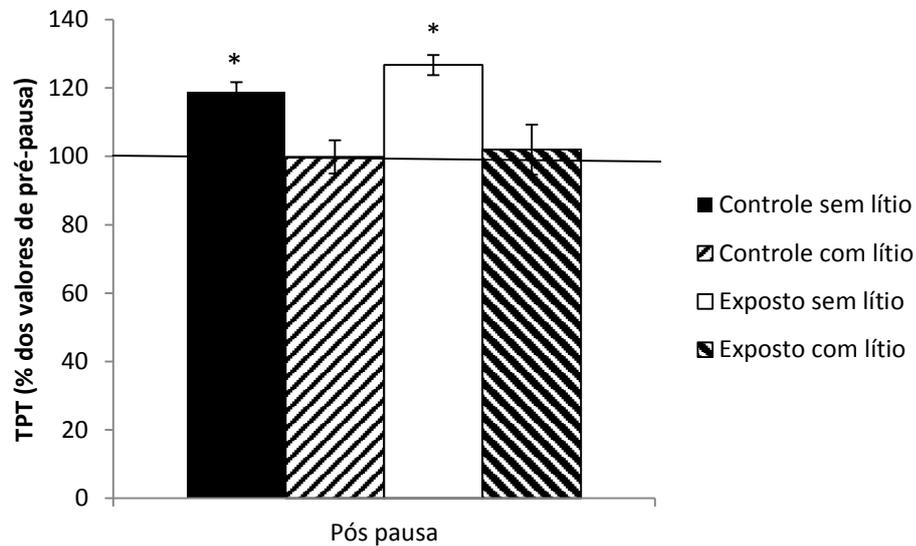


Figura 19. Efeito da pausa diastólica de 5 minutos sobre o tempo para pico de tensão (TPT - % de alteração) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani*, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) em solução controle, e em solução com lítio. A linha representa a média dos valores antes da pausa. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação a pré-pausa.

Tabela 8. Valores de tempo para metade do relaxamento (THR) da pré-pausa e pós-pausa, e da porcentagem de alteração após a pausa, das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12), em solução controle e em solução com lítio. Valores médios \pm 1 EPM

Pós Pausa	THR (ms) - Sem lítio		THR (ms) - Com lítio	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
Pré pausa	215 \pm 10	183 \pm 6	395 \pm 45	386 \pm 35
Pós pausa	350 \pm 27	272 \pm 24	544 \pm 59	466 \pm 32
Porcentagem dos valores	162 \pm 7	148 \pm 9	137 \pm 10	120 \pm 32

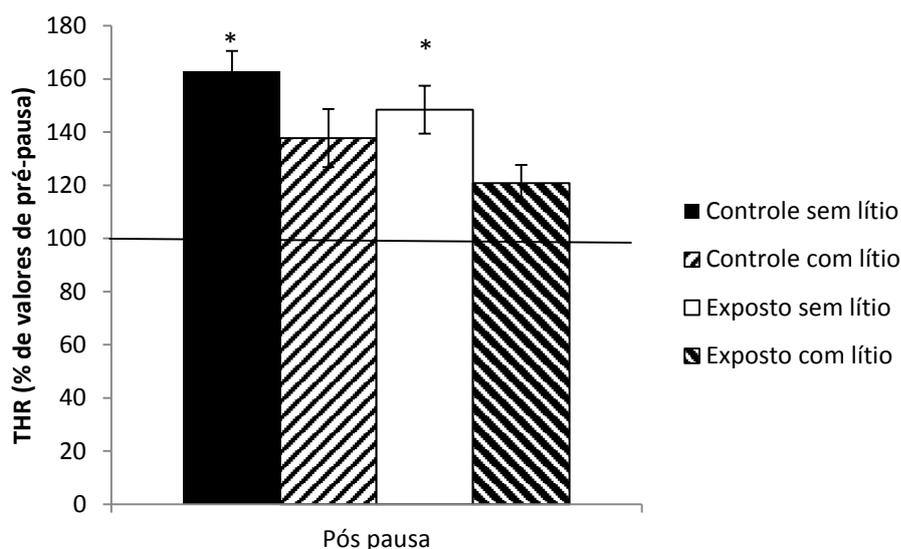


Figura 20. Efeito da pausa diastólica de 5 minutos sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - % de alteração) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani*, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) em solução controle, e em solução com lítio. A linha representa a média dos valores antes da pausa. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação a pré-pausa.

5.4. Importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

Os valores médios da força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares dos grupos controle e exposto ao longo de 20 minutos em solução com lítio, estão representados na tabela 9 e graficamente na figura 21.

No grupo exposto, a Fc sofreu redução significativa após 20 minutos em solução com LiCl. Já o grupo controle não apresentou alterações significativas ao longo dos 20 minutos em solução com lítio. Não foram encontradas diferenças significativas na Fc entre os grupos experimentais, embora o grupo exposto apresente uma tendência de valores superiores em relação ao grupo controle.

Os valores dos parâmetros tempo-dependentes das tiras ventriculares em solução com lítio ao longo de 20 minutos estão apresentados nas tabelas 10 e 11, e representados graficamente nas figuras 22 e 24 (TPT e THR, respectivamente). O grupo exposto apresentou redução significativa do TPT no tempo 5 minutos em relação ao tempo inicial, entretanto, nos tempos 10, 15 e 20 minutos retornou a valores semelhantes ao tempo inicial. O grupo controle não apresentou alterações significativas do TPT ao longo dos 20 minutos em solução com LiCl. Os valores de THR de ambos grupos experimentais apresentaram aumento significativo a partir do tempo 15 minutos em relação ao tempo inicial. Não foram encontradas diferenças significativas no THR entre os grupos experimentais ao longo dos 20 minutos em solução com lítio.

A análise das relações entre os parâmetros tempo-dependentes e da força de contração estão respresentadas nas tabelas 10 e 11, e nas figuras 23 e 25 (TPT/Fc e THR/Fc, respectivamente). Não foram encontradas diferenças significativas da relação TPT/Fc entre os grupos experimentais. Entretanto, o grupo exposto apresentou aumento significativo no tempo 20 minutos em relação ao tempo inicial, já o grupo controle não apresentou variação significativa de tal relação ao longo dos 20 minutos. Os valores de THR/Fc dos dois grupos experimentais não diferiram entre si. Entretanto, ambos os grupos apresentaram aumento significativo no THR/Fc aos 20 minutos.

A comparação entre a Fc das tiras ventriculares em solução controle em relação a Fc das tiras em solução com LiCl, de ambos os grupos experimentais, estão apresentadas numericamente nas tabelas 12 e 13, e graficamente nas figuras 26 e 27 (grupos controle e exposto, respectivamente). Os grupos controle e o grupo exposto apresentaram redução significativa da Fc em solução com lítio em comparação com a solução controle a partir dos 10 min.

A comparação da Fc pós-pausa entre solução com lítio em relação a Fc da pós-pausa em solução controle dos grupos grupos controle e exposto estão representados na tabela 14 e na figura 28. Ambos os grupos apresentaram redução significativa da Fc pós-pausa em solução com lítio quando comparada com com o valor de pós-pausa em solução controle.

A comparação entre os valores de TPT desenvolvidos pelas tiras ventriculares ao longo de 20 minutos, em solução com e sem lítio, estão representados nas tabelas 15 e 16, e nas figuras 29 e 30 (grupos controle e exposto). Os valores de TPT de ambos os grupos em solução com lítio sofreram um aumento significativo em relação aos valores apresentados em solução controle após 20 min. Os resultados obtidos do TPT pós-pausa em solução controle em relação a pós-pausa em solução com lítio, nos grupos controle e exposto, estão apresentados na tabela 17 e na figura 31. Ambos os grupos não apresentaram alterações nos valores de TPT pós pausa em solução com lítio, quando comparados com solução controle.

Os resultados de THR em solução controle e em solução com lítio, ao longo de 20 minutos, estão representados nas tabelas 18 e 19, e nas figuras 32 e 33 (grupos controle e exposto, respectivamente). Ambos os grupos apresentaram aumento significativo dos valores de THR após 20 minutos em solução com lítio, quando comparados a solução controle. A comparação dos valores de THR obtidos após a pausa entre solução controle e solução com lítio, dos grupos grupos controle e exposto, estão apresentados numericamente na tabela 20 e graficamente na figura 34. Ambos os grupos apresentaram aumento significativa do THR pós-pausa em solução com lítio quando comparada com solução controle.

Tabela 9. Valores de força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras de *H. regani* ao longo de 20 minutos em solução com lítio dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Fc (mN.mm ⁻²)	
	Controle	Exposto
0	1,35 \pm 0,28	1,93 \pm 0,24
5	1,02 \pm 0,16	1,48 \pm 0,20
10	0,92 \pm 0,17	1,38 \pm 0,19
15	0,91 \pm 0,16	1,20 \pm 0,20
20	0,77 \pm 0,14	1,00 \pm 0,20

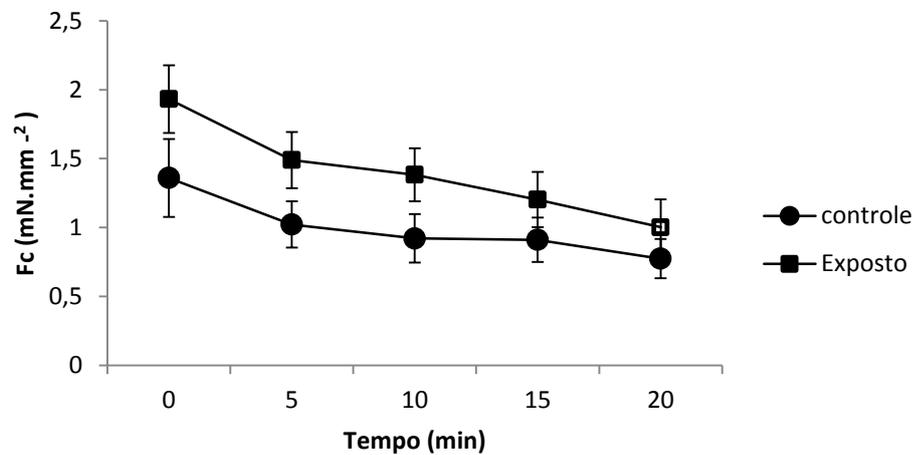


Figura 21. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre a força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani* em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais

Tabela 10. Valores de tempo para pico de tensão (TPT) e da relação tempo de contração/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* em solução com lítio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fpn (n = 12).

Tempo (ms)	TPT (ms)		TPT/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0	301 \pm 8	312 \pm 8	318 \pm 75	197 \pm 41
5	263 \pm 6	227 \pm 5	344 \pm 86	208 \pm 48
10	284 \pm 9	272 \pm 13	401 \pm 93	234 \pm 43
15	319 \pm 15	291 \pm 8	477 \pm 107	313 \pm 65
20	324 \pm 10	322 \pm 11	552 \pm 100	576 \pm 178

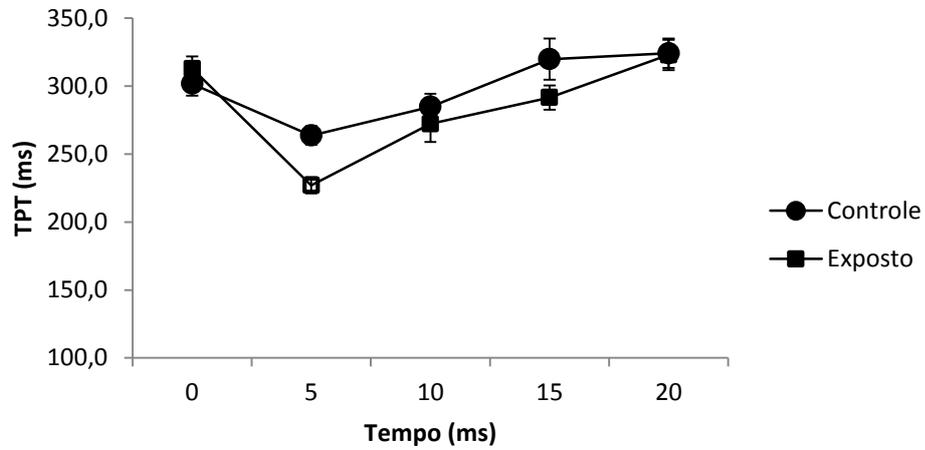


Figura 22. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre o tempo para o pico de tensão (TPT) desenvolvido pelas tiras ventriculares de *H. regani* em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.

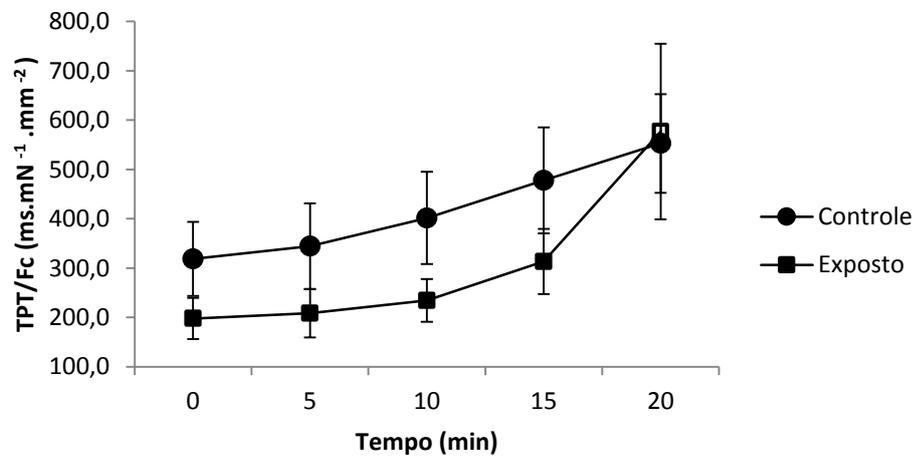


Figura 23. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre a relação tempo de contração/força (TPT/Fc) desenvolvido pelas tiras ventriculares de *H. regani* em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tabela 11. Valores de tempo para metade do relaxamento (THR) e da relação tempo de relaxamento/força (THR/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* em solução com lítio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fpn (n = 12).

Tempo (min)	THR (ms)		THR/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0	207±5	217±10	432±97	274±61
5	198±8	189±11	499±103	335±78
10	279±28	263±14	752±136	462±92
15	349±39	349±24	964±161	750±174
20	392±45	354±33	1287±227	1034±261

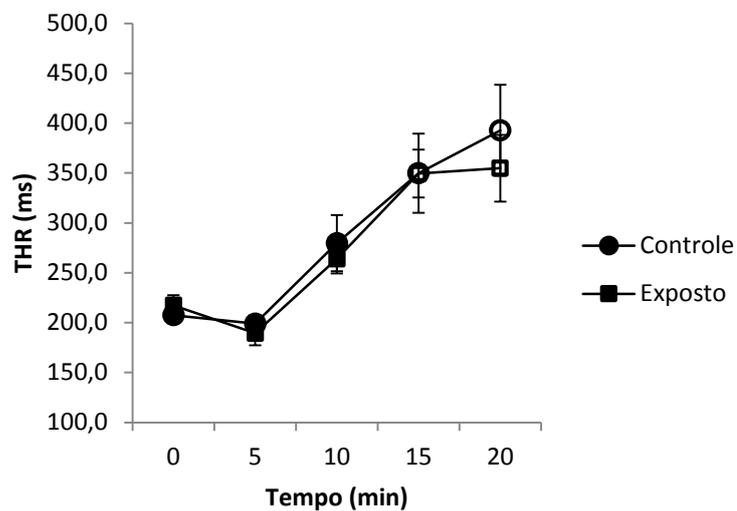


Figura 24. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre o tempo 50% do relaxamento (THR) desenvolvido pelas tiras ventriculares de *H. regani* em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios ± 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.

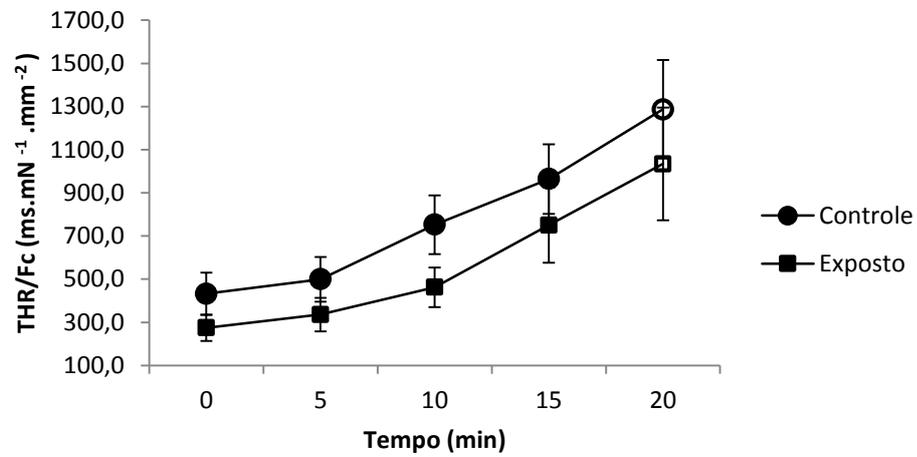


Figura 25. Efeito do tempo experimental de 20 minutos sobre a relação tempo de relaxamento/força (THR/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* em solução com lítio, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais .

Tabela 12. Valores de força de contração (Fc) das tiras ventriculares do grupo controle *H. regani* ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Fc (mN.mm ⁻²)	
	Grupo Controle	
	Sem Lítio	Com Lítio
0	2,12 \pm 0,39	1,35 \pm 0,28
10	2,14 \pm 0,40	0,92 \pm 0,18
20	1,83 \pm 0,34	0,77 \pm 0,14

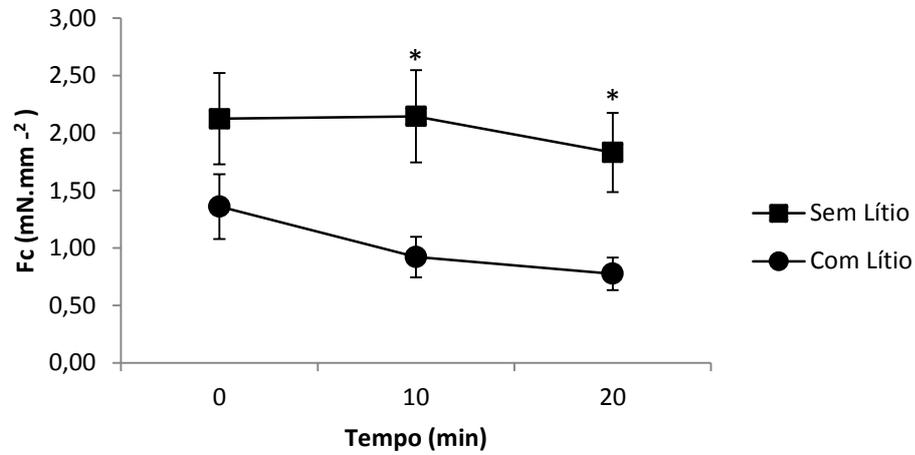


Figura 26. Força de contração (Fc) em tiras ventriculares do grupo controle de *H. regani* em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 13. Valores de força de contração (Fc) das tiras ventriculares do grupo exposto ao Fnp de *H. regani* ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Fc (mN.mm ⁻²)	
	Grupo Exposto	
	Sem Lítio	Com Lítio
0	3,02 \pm 0,46	1,93 \pm 0,25
10	2,97 \pm 0,46	1,38 \pm 0,19
20	2,77 \pm 0,44	1,00 \pm 0,20

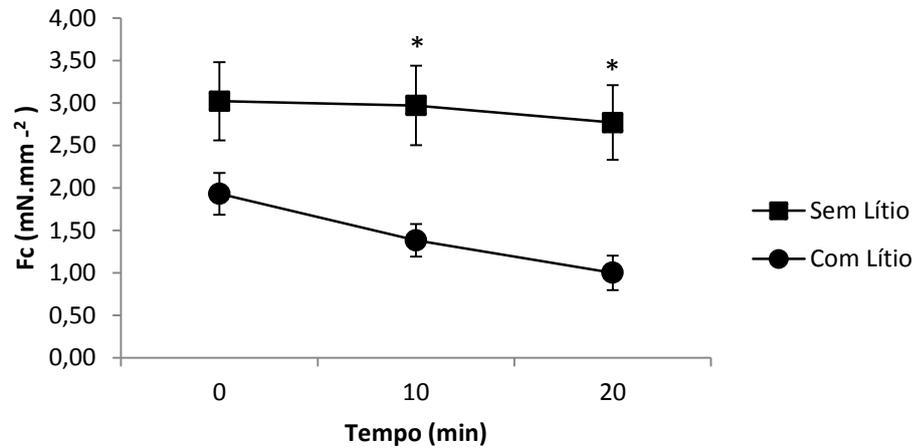


Figura 27. Força de contração (Fc) em tiras ventriculares do grupo exposto de *H. regani* em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais .

Tabela 14. Valores de força de contração (Fc) após a pausa diastólica, de ambos os grupos experimentais, em solução controle e em solução com lítio, e porcentagem de alteração da tensão pós-pausa em solução com lítio em relação a solução controle. Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo	Fc (mN.mm ²)	
	Controle	Exposto
Solução controle	1,92 \pm 0,27	2,75 \pm 0,36
Solução com lítio	0,74 \pm 0,13	1,26 \pm 0,22
Porcentagem de valores	38 \pm 18	46 \pm 17

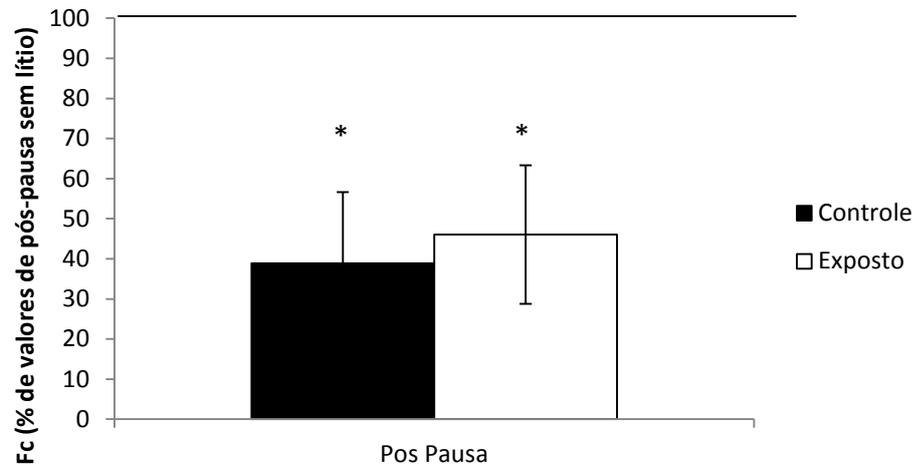


Figura 28. Tensão pós-pausa (% de alteração) das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle e exposto em solução com lítio em relação a pós-pausa em solução controle. Valores médios \pm 1 EPM. A Linha representa os valores de pós-pausa em solução controle. Asteriscos indicam diferença significativa entre valores de Fc pós-pausa com solução com lítio em relação a pós pausa com solução controle.

Tabela 15. Valores do tempo para o pico de tensão (TPT) das tiras ventriculares do grupo controle de *H. regani* ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Grupo controle	
	TPT (ms)	
	Sem Lítio	Com Lítio
0	288 \pm 6	301 \pm 9
10	287 \pm 7	284 \pm 9
20	277 \pm 7	324 \pm 10

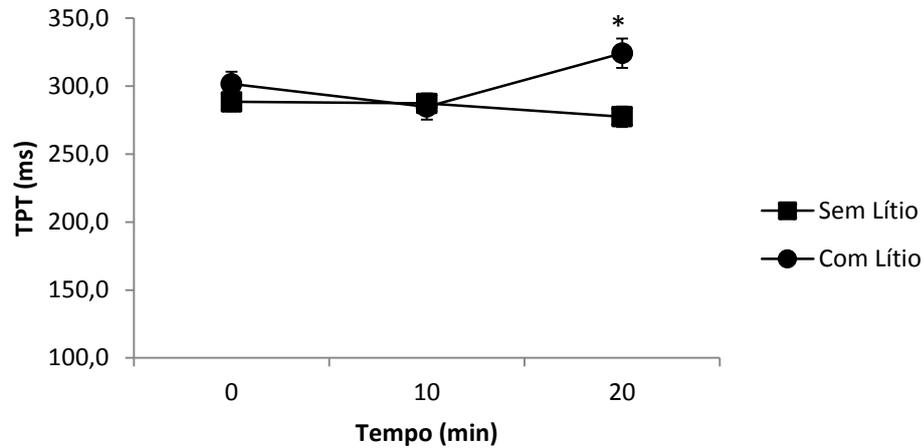


Figura 29. Tempo para o pico de tensão (TPT) em tiras ventriculares do grupo controle de *H. regani* em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.

Tabela 16. Valores do tempo para pico de tensão (TPT) das tiras ventriculares do grupo exposto ao Fnp de *H. regani* ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Grupo exposto	
	TPT (ms)	
	Sem Lítio	Com Lítio
0	266 \pm 6	292 \pm 9
10	269 \pm 5	272 \pm 13
20	269 \pm 5	322 \pm 11

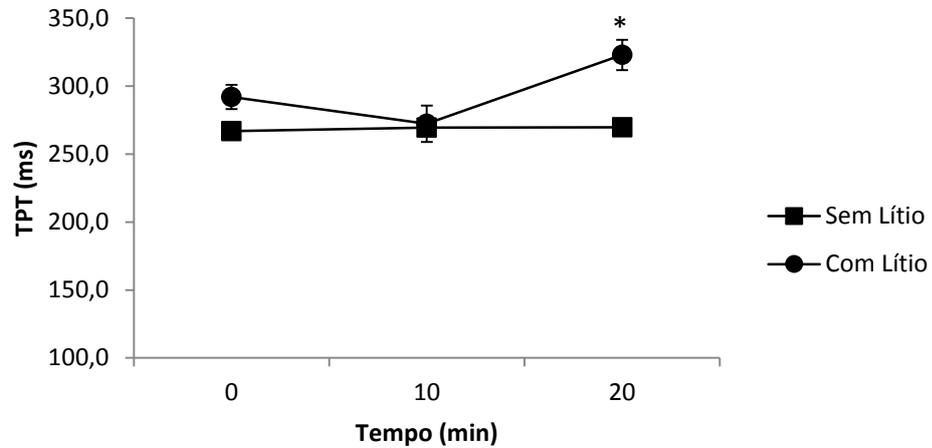


Figura 30. Tempo para o pico de tensão (TPT) em tiras ventriculares do grupo exposto de *H. regani* em solução controle e em solução com lítio, ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.

Tabela 17. Valores de tempo para pico de tensão (TPT) após a pausa diastólica, de ambos os grupos experimentais, em solução controle e em solução com lítio, e porcentagem de alteração da tensão pós-pausa em solução com lítio em relação a solução controle. Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo	TPT (ms)	
	Controle	Exposto
Sem Lítio	339 \pm 9	349 \pm 10
Com Lítio	324 \pm 15	330 \pm 24
Porcentagem de valores	95 \pm 5	94 \pm 7

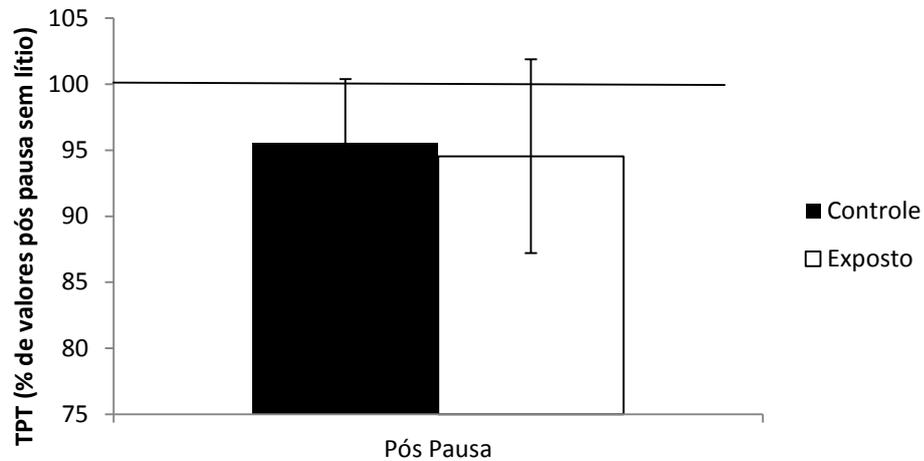


Figura 31. Tempo para pico de Tensão (TPT - % de alteração) das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle e exposto em solução com lítio em relação a pós-pausa em solução controle. Valores médios \pm 1 EPM. A linha representa a média dos valores de pós-pausa em solução controle.

Tabela 18. Valores do tempo para metade do relaxamento (THR) das tiras ventriculares do grupo controle de *H. regani* ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Grupo controle	
	THR (ms)	
	Sem Lítio	Com Lítio
0	183 \pm 11	207 \pm 6
10	176 \pm 8	279 \pm 28
20	175 \pm 7	392 \pm 45

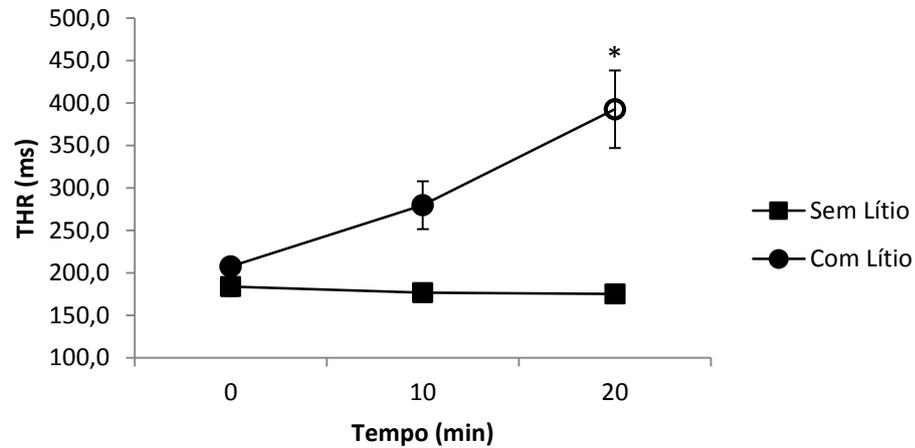


Figura 32. Tempo para 50% do relaxamento (THR) em tiras ventriculares do grupo controle de *H. regani* em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 19. Valores do tempo para metade do relaxamento (THR) das tiras ventriculares do grupo exposto ao Fnp de *H. regani* ao longo de 20 minutos em solução controle (n = 12) e solução com lítio (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo (min)	Grupo exposto	
	THR (ms)	
	Sem Lítio	Com Lítio
0	155 \pm 7	217 \pm 10
10	161 \pm 7	263 \pm 14
20	170 \pm 8	354 \pm 33

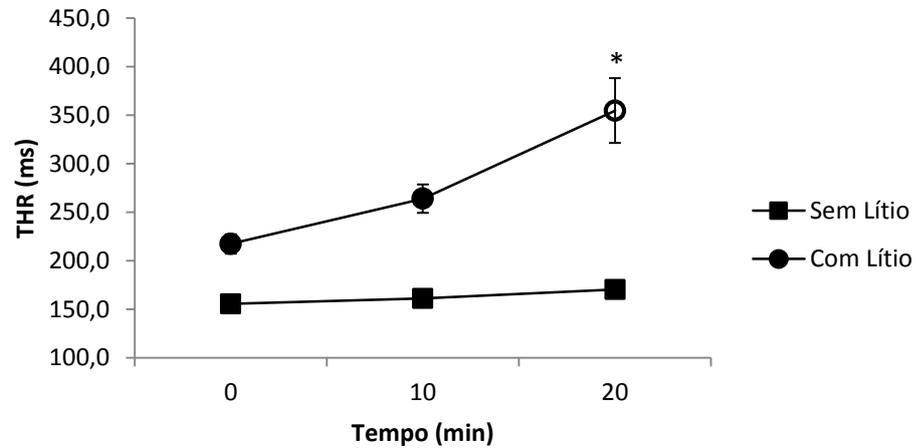


Figura 33. Tempo para 50% do relaxamento (THR) em tiras ventriculares do grupo exposto de *H. regani* em solução controle e em solução com lítio ,ao longo de 20 minutos de experimento. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 20. Valores de para metade do relaxamento (THR) após a pausa diastólica, de ambos os grupos experimentais, em solução controle (n = 12) e em solução com lítio (n = 12), e porcentagem de alteração da tensão pós-pausa em solução com lítio em relação a solução controle. Valores médios \pm 1 EPM.

Tempo	THR (ms)	
	Controle	Exposto
Sem Lítio	350 \pm 27	272 \pm 24
Com Lítio	544 \pm 59	466 \pm 32
Porcentagem de valores	155 \pm 10	171 \pm 7

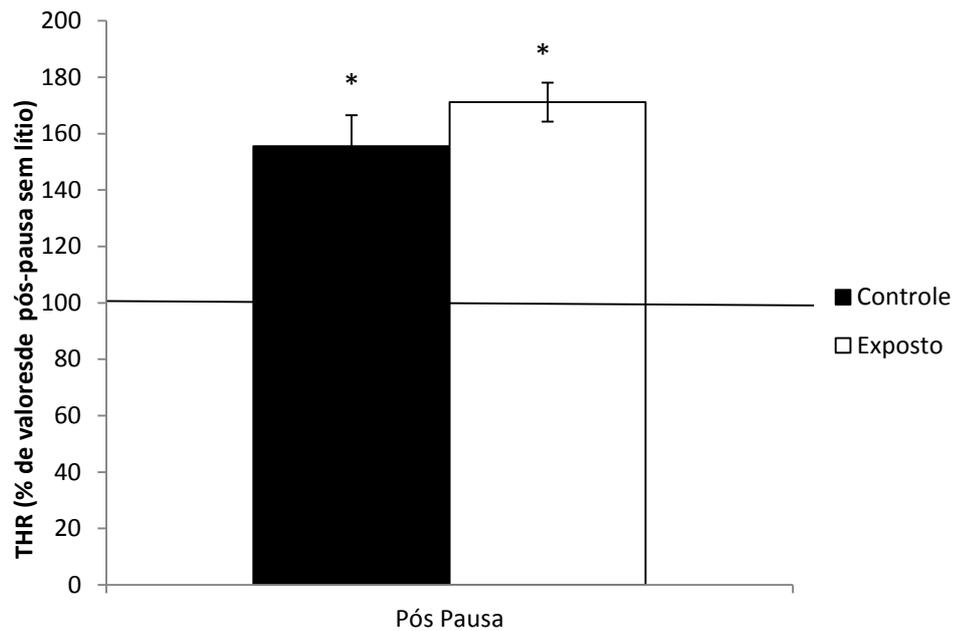


Figura 34. Tempo para 50% do relaxamento (THR - % de alteração) das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle e exposto em solução com lítio em relação a pós-pausa em solução controle. A linha representa a média dos valores de pós-pausa em solução controle. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre valores de THR pós-pausa com solução com lítio em relação a pós pausa com solução controle.

5.5. Importância da Bomba Na^+/K^+ -ATPase.

Para avaliar a importância da bomba de sódio-potássio, foi realizado experimento adicionando-se concentrações crescentes de ouabaína na solução fisiológica, de 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M.

O efeito da adição de ouabaína na Fc desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle e exposto estão representados numericamente na tabela 21 e graficamente na figura 35. A Fc do grupo exposto foi significativamente maior que o grupo controle em solução controle, e nas concentrações 10^{-8} M e 10^{-7} M de ouabaína. O grupo exposto apresentou redução da Fc na concentração de 10^{-6} M em relação a solução sem ouabaína, enquanto o grupo controle apresentou redução da Fc somente na maior concentração, de 10^{-5} M.

A tensão de repouso (RT) das tiras ventriculares sofreram aumento nos seus valores ao longe das adições crescentes de ouabaína, entretanto, tal elevação não foi significativa. Quando comparados os valores de RT entre os grupos, o grupo exposto apresenta valores significativamente maiores em relação ao grupo controle em todas as concentrações de ouabaína. Tais dados estão representados numericamente na tabela 21 e graficamente na figura 36.

O efeito dos incrementos de ouabaína sobre os parâmetros tempo dependentes estão representados nas tabelas 23 e 23 (TPT e THR respectivamente) e nas figuras 37 e 38 (TPT e THR, respectivamente). Não foram encontradas diferenças nos valores de TPT entre os grupos experimentais em nenhuma concentração de ouabaína, no entanto, ambos os grupos apresentaram redução significativa de tal parâmetro nas concentrações 10^{-6} e 10^{-5} mM de ouabaína, em relação a solução controle. Já os valores de THR de ambos os grupos experimentais não diferiram entre si em nenhuma concentração de ouabaína. Também não houve alteração dos valores de THR ao longo dos incrementos de ouabaína em ambos os grupos experimentais.

A análise das relações dos parâmetros tempo dependentes com a Fc estão apresentados numericamente nas tabelas 23 e 23 (TPT/Fc e THR/Fc) e graficamente nas figuras 39 e 40 (TPT/Fc e THR/Fc). O grupo exposto apresentou valores significativamente menores de TPT/Fc que o grupo controle nas concentrações 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M de ouabaína. O grupo controle não apresentou variação no TPT/Fc ao longo dos incrementos de ouabaína. Já o grupo exposto, apresentou aumento do TPT/Fc nas concentrações 10^{-6} e 10^{-5} mM de ouabaína em relação a solução controle. A relação THR/Fc do grupo exposto mostrou-se significativamente menor que o grupo controle em solução com ouabaína nas concentrações 10^{-8} e 10^{-7} M. O grupo controle apresentou aumento significativo na relação THR/Fc com adição de ouabaína na concentração de 10^{-5} M, em relação a solução sem tal composto. Já o grupo exposto apresentou aumento significativo da THR/Fc em solução com ouabaína nas concentrações 10^{-6} M e 10^{-5} M, em relação a solução controle.

Tabela 21. Valores de força de contração (Fc) e de tensão de repouso (RT) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM.

Concentração de Ouabaína (M)	Fc (mN.mm ⁻²)		RT (mN.mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0	1,37 \pm 0,28	3,95 \pm 0,37	1,6 \pm 0,44	3,6 \pm 0,65
10^{-8}	1,14 \pm 0,22	3,72 \pm 0,37	1,6 \pm 0,43	3,4 \pm 0,64
10^{-7}	1,06 \pm 0,20	3,42 \pm 0,36	1,6 \pm 0,43	3,6 \pm 0,84
10^{-6}	0,66 \pm 0,13	1,39 \pm 0,30	2,1 \pm 0,56	5,1 \pm 1,01
10^{-5}	0,51 \pm 0,08	0,68 \pm 0,27	2,7 \pm 0,40	5,6 \pm 0,98

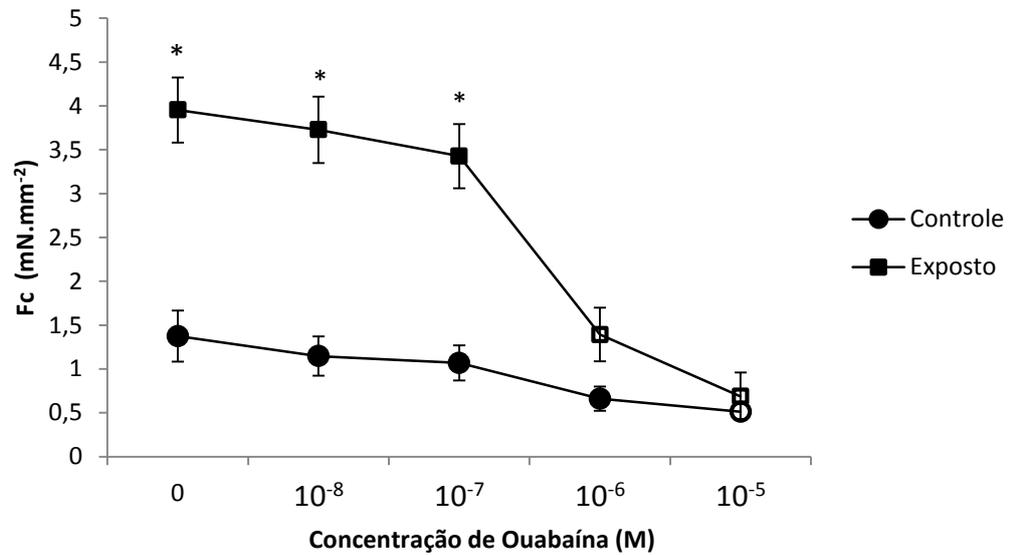


Figura 35. Força de contração (Fc) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.

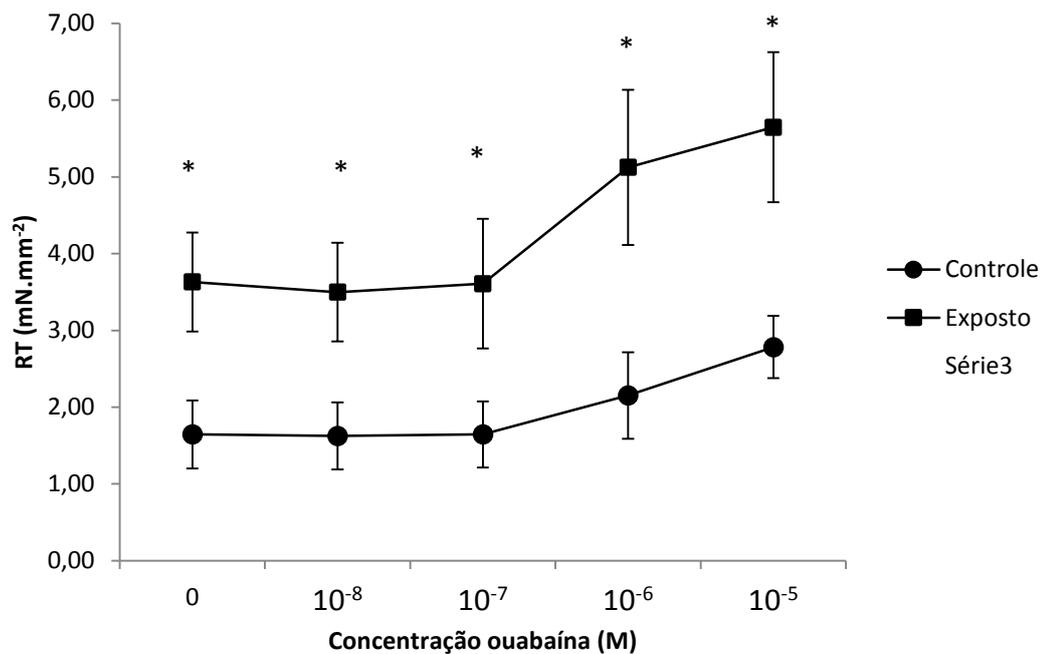


Figura 36. Tensão de repouso (RT) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos.

Tabela 22. Valores do tempo para atingir o pico de tensão (TPT) e da relação força de contração/força de contração (TPT/Fc) de tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM.

Concentração Ouabaína (M)	TPT (ms)		TPT/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0	310 \pm 11	302 \pm 6	336 \pm 74	83 \pm 13
10 ⁻⁸	309 \pm 10	343 \pm 37	409 \pm 98	92 \pm 14
10 ⁻⁷	302 \pm 9	298 \pm 7	401 \pm 84	94 \pm 13
10 ⁻⁶	245 \pm 17	222 \pm 9	459 \pm 108	186 \pm 33
10 ⁻⁵	215 \pm 6	194 \pm 8	461 \pm 88	551 \pm 163

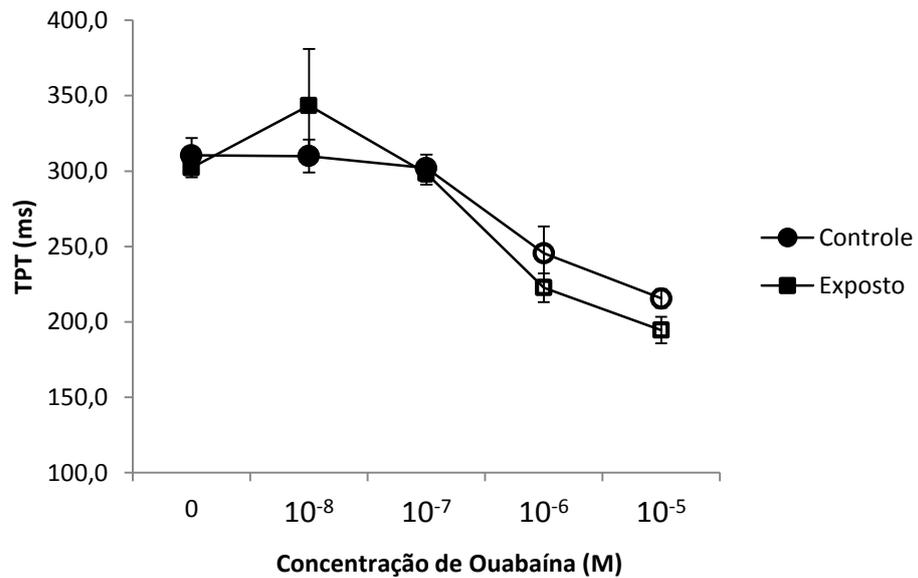


Figura 37. Tempo para atingir o pico de tensão (TPT) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.

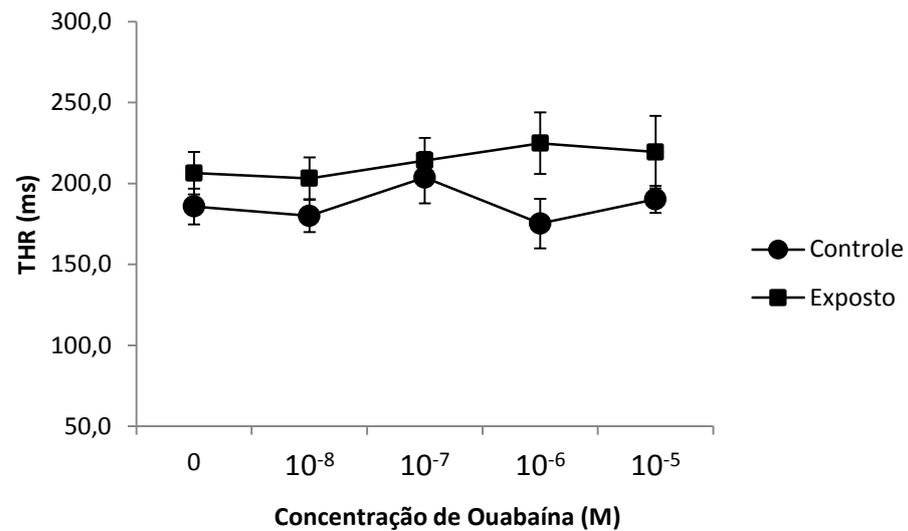


Figura 38. Tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e exposto (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM.

Tabela 23. Valores do tempo para 50% de relaxamento (THR) e da relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM.

Concentração Ouabaína (M)	THR (ms)		THR/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0	185 \pm 11	206 \pm 13	427 \pm 113	116 \pm 27
10 ⁻⁸	179 \pm 9	203 \pm 12	523 \pm 155	121 \pm 27
10 ⁻⁷	203 \pm 15	214 \pm 14	607 \pm 182	140 \pm 31
10 ⁻⁶	175 \pm 15	224 \pm 19	769 \pm 189	353 \pm 64
10 ⁻⁵	190 \pm 8	219 \pm 22	820 \pm 170	1224 \pm 417

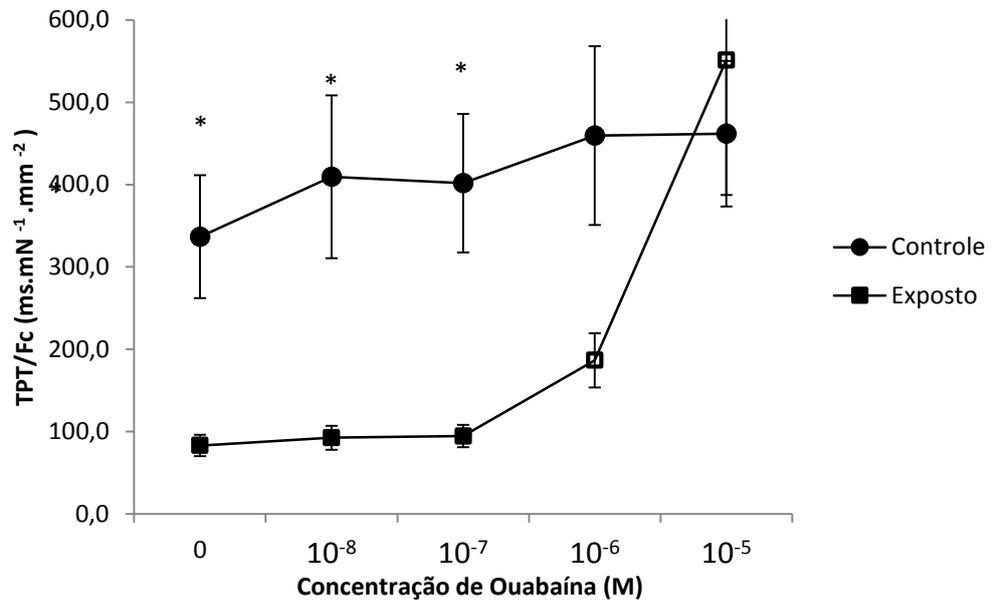


Figura 39. Relação tempo de contração/força de contração (TPT/Fc) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e controle (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.

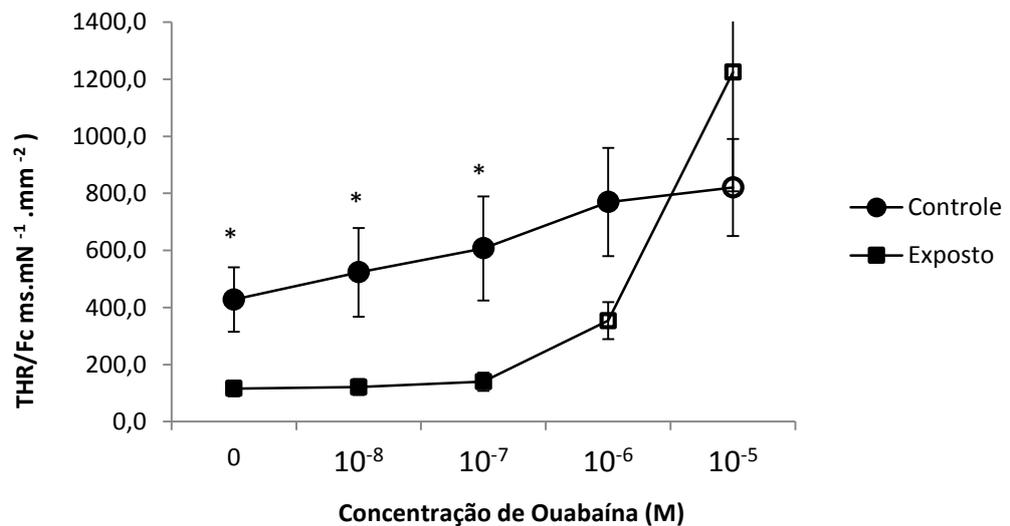


Figura 40. Relação tempo de relaxamento/força de contração (THR/Fc) das tiras ventriculares dos grupos controle (n = 8) e controle (n = 8) de *H. regani* em solução controle e sob incrementos de ouabaína. Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação a solução controle.

5.6. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio Extracelular

Para testar a importância do cálcio extracelular na contração do miócito ventricular de *H. regani*, foram adicionadas concentrações crescentes de cálcio na solução fisiológica. A elevação na concentração de Ca^{2+} provocou um efeito inotrópico positivo nas tiras ventriculares de ambos os grupos experimentais, no entanto, somente no grupo exposto esse aumento na Fc mostrou-se significativo em relação a concentração inicial, a partir de 7,5 mM de Ca^{2+} . A Fc do grupo exposto foi significativamente maior que o grupo controle em todas as concentrações de Ca^{2+} . Esses dados estão apresentados numericamente na tabela 24 e graficamente na figura 41.

Os parâmetros tempo-dependentes estão representados graficamente nas figuras 42, 43, 44, 45 (TPT, TPT/Fc, THR, e THR/Fc, respectivamente) e nas tabelas 7 e 8. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores médios do TPT do grupo exposto em relação ao grupo controle. Os valores de TPT de ambos os grupos mostrou-se significativamente maior na concentração de 9.5 mM de Ca^{2+} em relação a concentração inicial de 1.5 mM de Ca^{2+} .

Não foi encontrada diferença significativa no THR entre os grupos experimentais em qualquer concentração de Ca^{2+} . Entretanto, ambos os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante no THR ao longo dos incrementos de Ca^{2+} , com aumento significativo de seus valores médios a partir da concentração de 5,5 mM de Ca^{2+} em relação a concentração inicial.

A relação TPT/Fc de ambos grupos experimentais não sofreu alterações significativas ao longo dos incrementos na concentração de Ca^{2+} , assim como não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais para esta relação em nenhuma concentração de Ca^{2+} .

A relação THR/Fc não apresentou diferenças significativas ao longo dos incrementos de Ca^{2+} em ambos os grupos experimentais. Entretanto, a TRH/Fc do grupo exposto foi significativamente menor em relação ao grupo controle em todas as concentrações de Ca^{2+} .

Tabela 24. Valores de força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12) de *H. regani* sob o incremento de cálcio. Valores médios \pm 1 EPM.

Concentração (mM)	Fc (mN.mm ⁻²)	
	Controle	Exposto
1,5	1,27 \pm 0,3	2,6 \pm 0,47
3,5	1,64 \pm 0,39	3,71 \pm 0,62
5,5	2,01 \pm 0,48	4,17 \pm 0,67
7,5	2,26 \pm 0,56	4,31 \pm 0,67
9,5	2,36 \pm 0,59	4,3 \pm 0,66

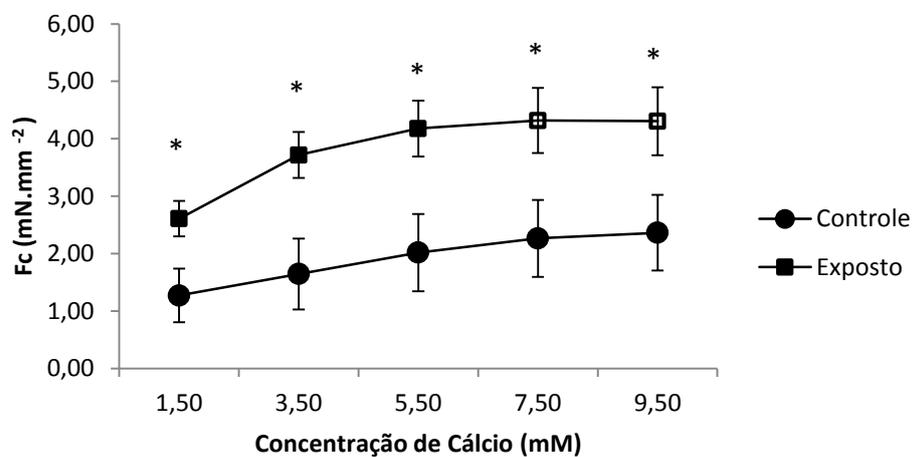


Figura 41. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio sobre a força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial.

Tabela 25. Valores de tempo para atingir o pico de tensão (TPT) e da relação tempo de contração/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* sob incrementos na concentração de cálcio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Concentração de Cálcio (mM)	TPT (ms)		TPT/Fc(ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
1,5	288 \pm 11	281 \pm 11	327 \pm 55	316 \pm 126
3,5	300 \pm 8	310 \pm 10	263 \pm 47	236 \pm 97
5,5	303 \pm 9	326 \pm 9	223 \pm 41	207 \pm 82
7,5	324 \pm 10	336 \pm 14	215 \pm 39	197 \pm 82
9,5	326 \pm 7	343 \pm 10	204 \pm 36	208 \pm 92

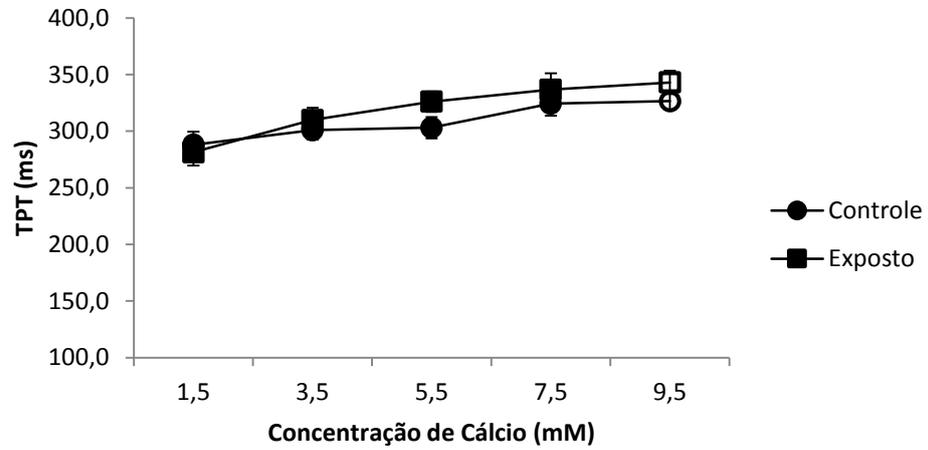


Figura 42. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio sobre o tempo para o pico de força (TPT) desenvolvido pelas tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos vazios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.

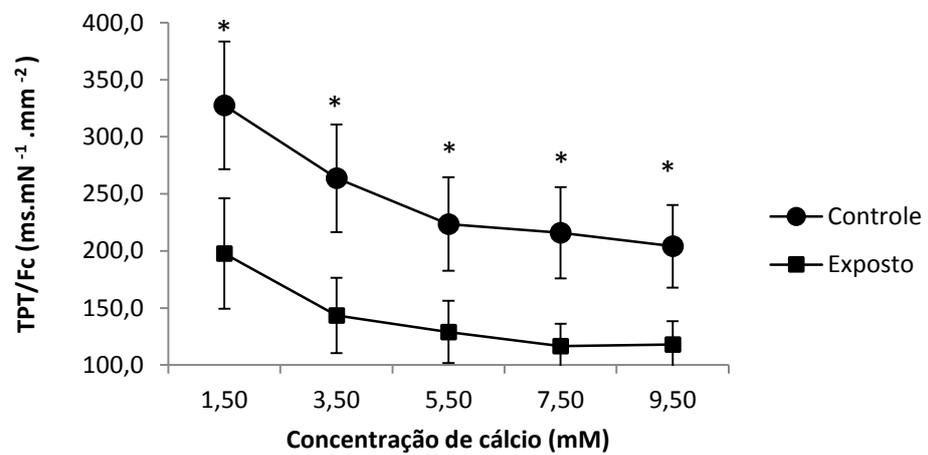


Figura 43. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio na relação TPT/Fc ($\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$) de tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 26. Valores de tempo para que metade do relaxamento (TPT) fosse atingido e da relação tempo de relaxamento/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* sob incrementos na concentração de cálcio dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Concentração de Cálcio (mM)	THR (ms)		THR/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
1,5	205 \pm 21	182 \pm 11	486 \pm 85	198 \pm 35
3,5	298 \pm 26	259 \pm 23	448 \pm 76	197 \pm 40
5,5	350 \pm 26	341 \pm 26	462 \pm 85	225 \pm 46
7,5	391 \pm 27	391 \pm 27	482 \pm 87	238 \pm 46
9,5	433 \pm 31	420 \pm 30	499 \pm 86	254 \pm 47

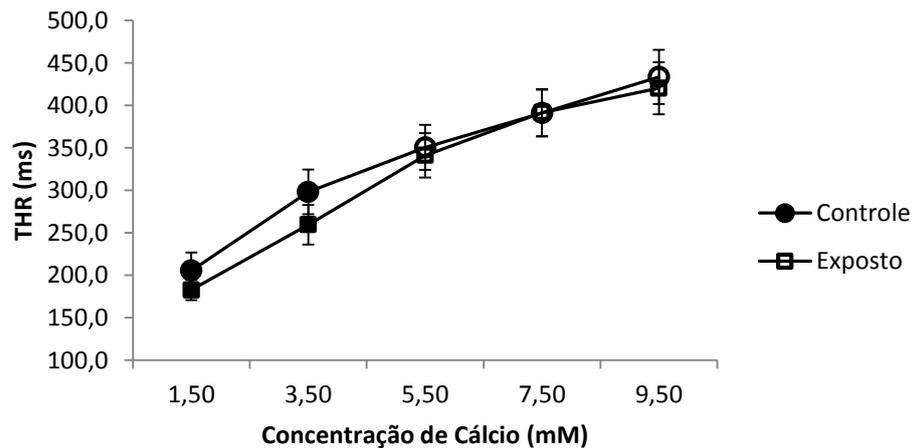


Figura 44. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio sobre o tempo para metade do relaxamento (THR) desenvolvido pelas tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM. Símbolos vazios indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. Valores médios \pm 1 EPM.

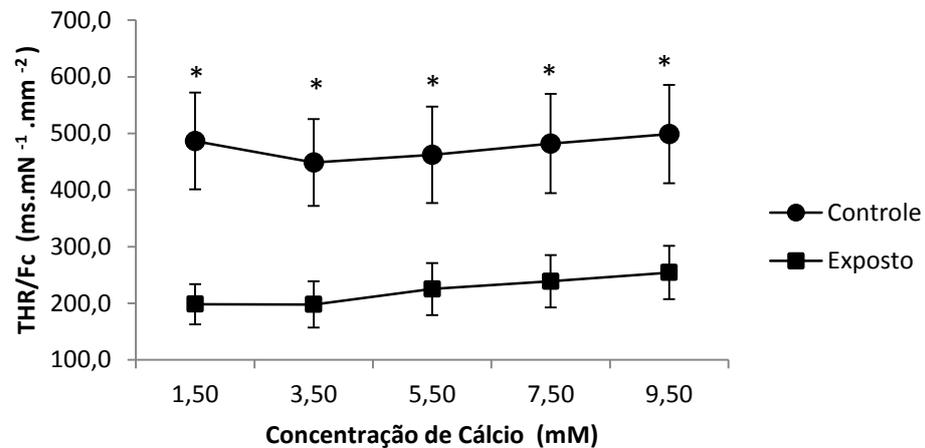


Figura 45. Efeito dos incrementos na concentração de cálcio na relação THT/Fc ($\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$) de tiras ventriculares de *H.regani* dos grupos controle ($n = 12$) e exposto ($n = 12$). Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios ± 1 EPM.

5.7. Aumento da frequência de estimulação

Os valores médios da Fc desenvolvida pelas tiras ventriculares, quando sujeitas a incrementos na frequência de estimulação (Hz) até que registros se tornassem irregulares, estão representados em valores numéricos na tabela 27 e graficamente na figura 46. Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) são apresentados nas figuras 47 e 48 e nas tabelas 28 e 29, respectivamente.

O grupo exposto foi capaz de manter contrações regulares até a frequência de 2,6 Hz, enquanto o grupo controle atingiu apenas até a frequência de 2,0 Hz. Ambos os grupos experimentais não apresentaram alterações significativas ao longo dos incrementos de frequência em relação a frequência inicial (0,4 Hz). Adicionalmente, grupo exposto apresentou valores de Fc significativamente maiores em relação ao grupo controle em todas as frequências de estimulação.

Os valores de TPT obtidos a partir da frequência de estimulação de 0,8 Hz no grupo exposto e 1,0 Hz no grupo controle foram significativamente inferiores aos valores na frequência inicial de 0,4 Hz.

Em ambos os grupos experimentais os valores de THR sofreram reduções significativas, em relação a frequência inicial, a partir da frequência de 1,0 Hz. O grupo exposto apresentou valores de THR significativamente inferiores em relação ao grupo controle nas frequências de 0,4; 0,6 e 0,8 Hz.

A análise da relação entre os parâmetros tempo-dependentes e a força de contração em cada grupo experimental estão representadas graficamente nas figuras 49 (TPT/Fc) e 50 (THR/Fc), e nas tabelas 28 e 29.

O grupo exposto apresentou valores da relação TPT/Fc significativamente menores quando comparados ao grupo controle até a frequência de 1,6 Hz. Adicionalmente, os valores da relação THR/Fc do grupo exposto foram significativamente menores quando comparados aos do grupo controle em todas as frequências de estimulação.

Tabela 27. Valores de força de contração (Fc) desenvolvidas pelas tiras ventriculares de *H. regani* sob incrementos da frequência de estimulação dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Frequência (Hz)	Fc (mN.mm ⁻²)	
	Controle	Exposto
0,4	1,27 \pm 0,18	2,20 \pm 0,41
0,6	1,25 \pm 0,18	2,2 \pm 0,31
0,8	1,2 \pm 0,17	2,18 \pm 0,31
1	1,18 \pm 0,17	2,21 \pm 0,31
1,2	1,19 \pm 0,17	2,28 \pm 0,32
1,4	1,12 \pm 0,17	2,27 \pm 0,33
1,6	1,14 \pm 0,17	2,24 \pm 0,33
1,8	1,13 \pm 0,17	2,16 \pm 0,34
2	1,18 \pm 0,19	2,02 \pm 0,34
2,2		2,02 \pm 0,32
2,4		1,84 \pm 0,35
2,6		1,65 \pm 0,33
0,4	1,49 \pm 0,23	3,00 \pm 0,29

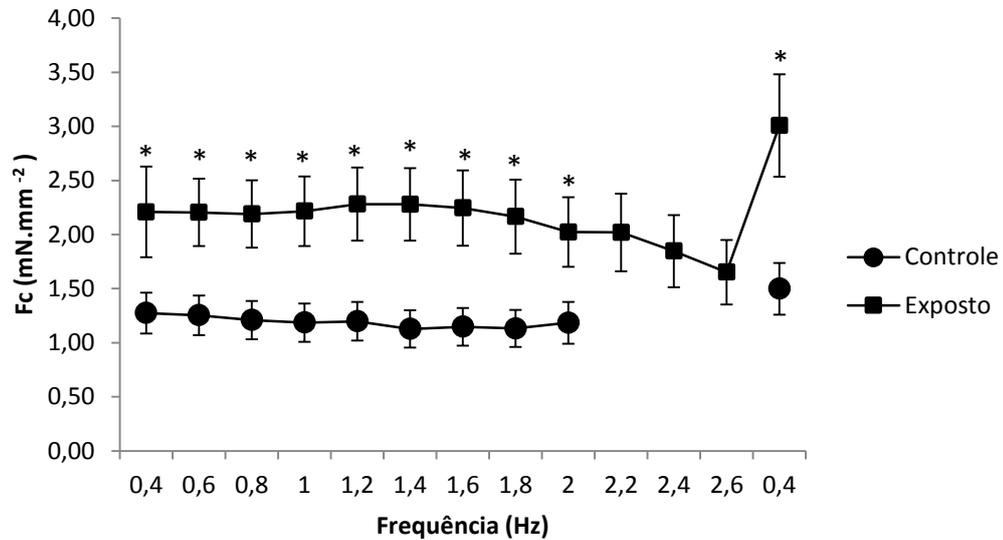


Figura 46. Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração (Fc) de tiras ventriculares de *H. regani*, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Valores médios \pm 1 EPM.

Tabela 28. Valores de tempo para o pico que o pico de tensão (TPT) seja atingido e da relação tempo de contração/força (TPT/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* sob incrementos na frequência de estimulação dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Frequência (Hz)	TPT (ms)		TPT/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0,4	292,98 \pm 7,86	283,92 \pm 5,3	341 \pm 45	183 \pm 23
0,6	294,82 \pm 8,33	271,10 \pm 4,9	350, \pm 50	177 \pm 23
0,8	271,87 \pm 7,08	262,71 \pm 3,8	340 \pm 49	176 \pm 23
1	258,39 \pm 4,33	256,60 \pm 7,84	347 \pm 52	171 \pm 22
1,2	246,21 \pm 4,5	242,53 \pm 4,05	316 \pm 46	160 \pm 23
1,4	228,76 \pm 3,6	228,60 \pm 3,92	324 \pm 49	154 \pm 24
1,6	219,54 \pm 3,7	215,92 \pm 3,47	304 \pm 57	152 \pm 26
1,8	210,10 \pm 3,07	208,25 \pm 3,97	268 \pm 45	157 \pm 30
2	194,63 \pm 4,5	200,69 \pm 3,11	244 \pm 58	168 \pm 35
2,2	-	191,65 \pm 2,85	-	172 \pm 44
2,4	-	179,41 \pm 2,65	-	150 \pm 32
2,6	-	171,11 \pm 3,13	-	160 \pm 38
0,4	263,14 \pm 9,62	262,59 \pm 4,66	275 \pm 47	131 \pm 17

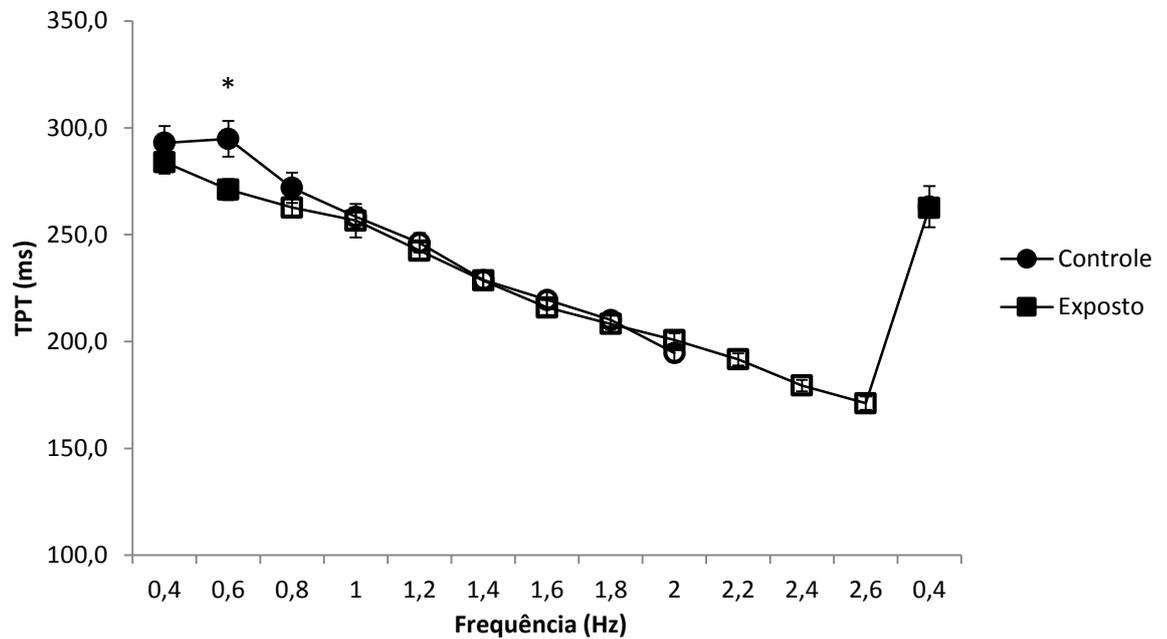


Figura 47. Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão (TPT - ms) de tiras ventriculares de *H. regani*, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. Valores médios \pm 1 EPM.

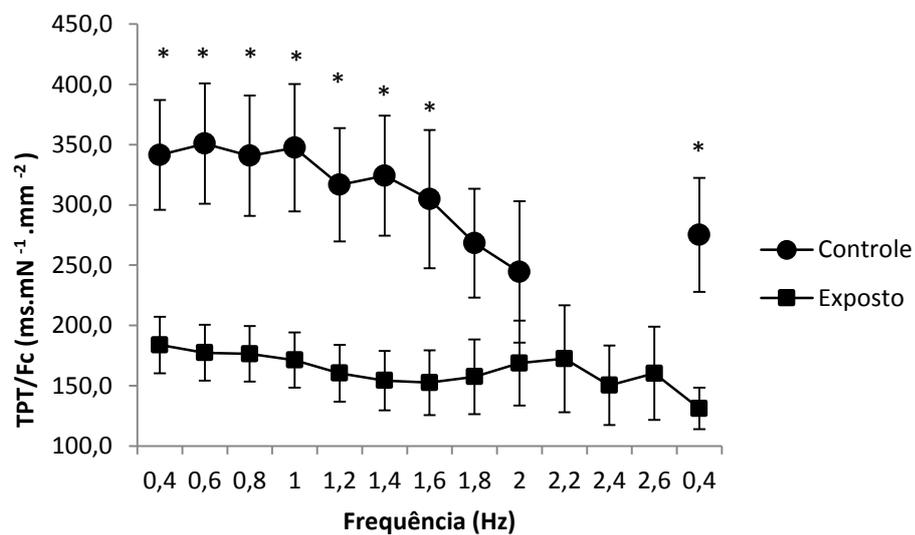


Figura 48. Efeito do aumento da frequência de estimulação na relação TPT/Fc ($\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$) e de tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Valores médios \pm 1 EPM.

Tabela 29. Valores de tempo para que metade do relaxamento seja atingido (THR) e da relação tempo de contração/força (THR/Fc) das tiras ventriculares de *H. regani* sob incrementos na frequência de estimulação dos grupos controle (n = 12) e exposto ao Fnp (n = 12). Valores médios \pm 1 EPM.

Frequência (Hz)	THR (ms)		THR/Fc (ms.mN ⁻¹ .mm ⁻²)	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto
0,4	221 \pm 10	192 \pm 8	468 \pm 60	228 \pm 33
0,6	205 \pm 9	183 \pm 7	435 \pm 52	217 \pm 29
0,8	204 \pm 10	169 \pm 7	449 \pm 56	203 \pm 30
1	185 \pm 7	165 \pm 6	436 \pm 57	203 \pm 31
1,2	172 \pm 7	155 \pm 6	418 \pm 54	181 \pm 30
1,4	154 \pm 5	149 \pm 4	428 \pm 60	177 \pm 31
1,6	148 \pm 4	142 \pm 4	367 \pm 55	171 \pm 29
1,8	130 \pm 4	133 \pm 2	340 \pm 56	170 \pm 29
2	128 \pm 3	123 \pm 2	353 \pm 78	174 \pm 35
2,2		117 \pm 2		170 \pm 45
2,4		110 \pm 2		187 \pm 48
2,6		103 \pm 1		199 \pm 56
0,4	195 \pm 7	180 \pm 6	423 \pm 64	161 \pm 23

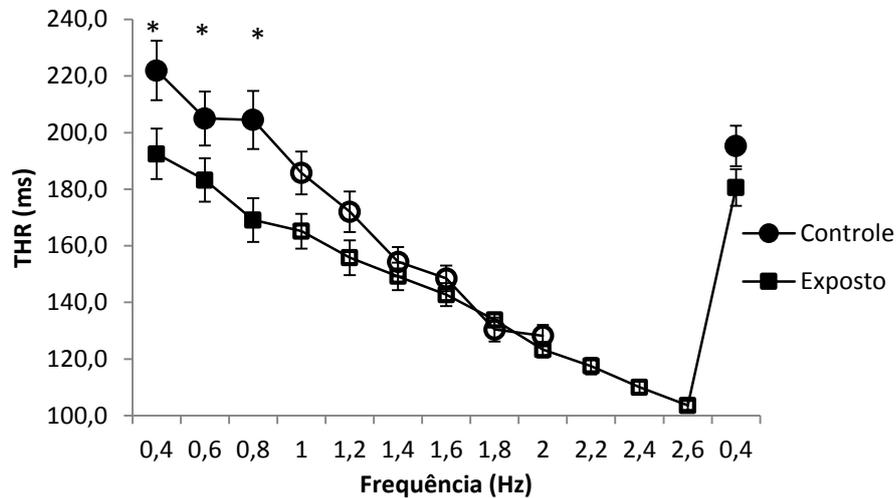


Figura 49. Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para 50% do relaxamento de tiras ventriculares de *H. regani*, dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Valores médios \pm 1 EPM.

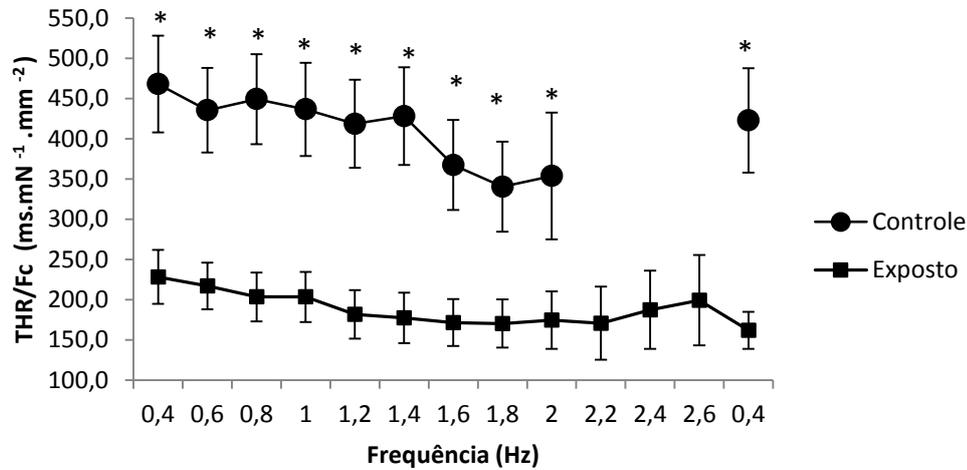


Figura 50. Efeito do aumento da frequência de estimulação na relação THR/Fc ($\text{ms.mN}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$) e de tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle ($n = 12$) e exposto ($n = 12$). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Valores médios ± 1 EPM.

5.8. Capacidade de Bombeamento Cardíaco

Os valores da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}$) das tiras ventriculares de *H. regani* dos dois grupos experimentais durante aumento na frequência de estimulação elétrica estão apresentados na tabela 30 e graficamente na figura 51.

O CBC do grupo controle apresentou aumento significativo a partir da frequência 1,4 Hz. Já no grupo exposto, o CBC apresentou aumento significativo a partir da frequência 1,6 Hz. A comparação entre os grupos revelou que o grupo exposto apresenta valores de CBC significativamente maiores em relação ao grupo controle em todas as frequências de estimulação.

Tabela 30. Valores da capacidade de bombeamento cardíaco das tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle ($n = 12$) e exposto ($n = 12$). Valores médios ± 1 EPM.

Frequência (Hz)	CBC (mN.mm ⁻² .min)	
	Controle	Exposto
0,4	0,58±0,11	0,97±0,15
0,6	0,87±0,16	1,45±0,22
0,8	1,10±0,19	1,92±0,30
1	1,36±0,24	2,44±0,39
1,2	1,62±0,28	3,03±0,49
1,4	1,77±0,30	3,53±0,57
1,6	2,07±0,36	4,01±0,68
1,8	2,24±0,36	4,37±0,76
2	2,36±0,39	4,56±0,80
2,2		5,07±0,98
2,4		5,05±0,98
2,6		4,58±0,91
0,4	0,39±0,07	0,68±0,12

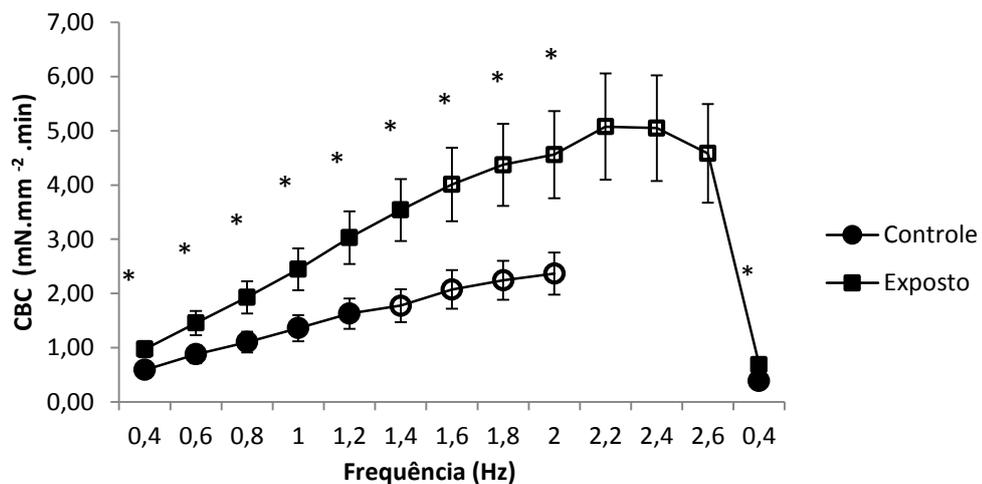


Figura 51. Capacidade de bombeamento cardíaco (CBC - mN.mm⁻².min⁻¹) de tiras ventriculares de *H. regani* dos grupos controle (n = 12) e exposto (n = 12). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos. Valores médios ± 1 EPM.

5.9. Análise de Western Blot.

A técnica de Western Blot foi realizada para verificar a expressão da proteína SERCA2 no músculo ventricular dos grupos controle e exposto de *H. regani*. Quando expressa, a SERCA indica a presença de retículo sarcoplasmático (RS) no tecido cardíaco.

A figura 52 mostra o resultado da análise para a proteína SERCA2, onde não detectada expressão da proteína SERCA2 em ambos os grupos experimentais de *H. regani*.

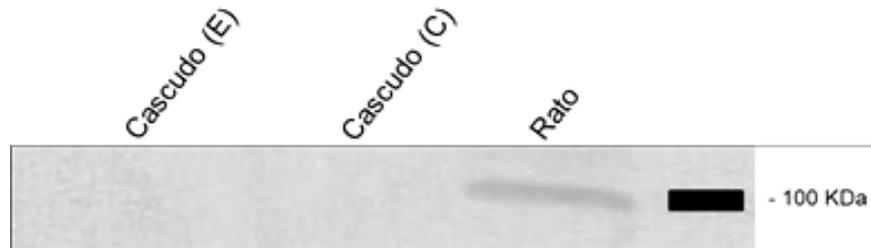


Figura 52. Análise da expressão da proteína SERCA2 por Western blotting no ventrículo do cascudo *H. regani* e no ventrículo esquerdo do Rato Wistar (*Rattus Norvegicus*).

6. Discussão

6.1. Massa Ventricular Relativa

O músculo cardíaco é reconhecido pela sua notória capacidade de remodelamento em resposta a diferentes demandas funcionais e metabólicas. A hipertrofia do miocárdio é um complexo processo que varia de acordo com o tipo de estímulo, grau e duração em que é aplicado, localização em que ele atua, assim como outros mecanismos compensatórios intraespecíficos (COOPER, 1987). A hipertrofia cardíaca pode ocorrer por dois mecanismos distintos: a hipertrofia patológica, que é associada a um prejuízo na contratilidade, sem necessariamente levar à insuficiência cardíaca; e a hipertrofia fisiológica, associada à manutenção ou melhora da contratilidade (WIKMAN-COFFELT et al,1979).

O débito cardíaco (volume de sangue bombeado pelo coração por minuto) é o produto do volume sistólico pela frequência cardíaca (WHITERS; HILLMAN, 2001). Variações do volume sistólico podem ser reflexos de alterações da massa ventricular (HILLMAN, 1976; HILLMAN 1985).

Alterações na demanda imposta ao coração, como o treinamento físico, podem levar a processos hipertróficos neste órgão, que evitam uma sobrecarga por ocasião de alterações metabólicas. A hipertrofia cardíaca pode ser resultante do aumento de proteínas contráteis, o que diminui o estresse na parede das câmaras cardíacas devido ao espessamento do miocárdio, melhorando a capacidade de bombeamento (COOPER, 1987; BABICK e DHALLA, 2007). No entanto, as informações acerca do potencial benefício desse processo são controversas, uma vez que há indícios de que hipertrofias cardíacas prolongadas podem levar à insuficiência cardíaca (KANNEL, 1969; LEVY et al., 1990; VAKILI, 2001).

Nos miócitos de peixes não há a presença de túbulos transversos (túbulos T), dessa maneira, a hipertrofia pode aumentar a distância de difusão de cálcio extracelular, limitando a contratilidade muscular (CLARK e RODNICK, 1998).

A exposição a pesticidas também pode desencadear alterações na massa ventricular relativa desses animais. Thomaz et al (2009) verificaram aumento da MVR em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) expostas por 96 horas a 0,5 mg.L⁻¹ do inseticida organofosforado Triclorfon (Neguvon[®]), provavelmente desencadeado por uma hipertensão arterial sistêmica, ou devido ao estresse oxidativo, induzido por este pesticida. Em outro estudo, a exposição crônica (12 semanas seguidas) a doses subletais do organofosfatado metamidofos provocou hipertrofia nos miócitos cardíacos de ratos, ocasionada provavelmente

pela hipertensão arterial, ou pela estimulação adrenérgica durante a exposição (CALORE et al., 2007).

Apesar do efeito inotrópico positivo encontrado no grupo exposto ao Fpn, não foi encontrada diferença significativa da MVR entre os grupos controle e o exposto ao Fpn. Não existem dados disponíveis na literatura a respeito dos efeitos de inseticidas fenil-pirazóis no coração de vertebrados. Porém, as hipóteses de que as alterações metabólicas desencadeadas pela exposição ao Fpn em *H. regani*, ou que o tempo de exposição (96 h) não tenham sido suficientes para desencadear alterações na MVR de tal espécie não podem ser descartadas.

6.2. Experimentos *In Vitro*

Efeito do Tempo Experimental

O protocolo do efeito do tempo experimental foi realizado para avaliar se há alterações no desenvolvimento de força de contração no decorrer dos protocolos experimentais, que tiveram um tempo máximo de 40 minutos.

Tanto o grupo controle quanto o grupo exposto apresentaram Fc constante ao longo do tempo experimental, não tendo sido apresentado qualquer efeito inotrópico negativo devido à deterioração das tiras ventriculares, indicando que o tempo de 40 minutos é adequado para a realização dos protocolos, o que assegura que qualquer alteração que possa ocorrer nos parâmetros analisados é devida ao protocolo experimental.

Apesar da ausência de hipertrofia ventricular, houve diferença significativa entre a Fc dos grupos experimentais. Surpreendentemente, o grupo exposto apresentou Fc maior que o grupo controle ao longo dos 40 minutos. Além disso, os valores das relações entre os parâmetros tempo dependentes e a força de contração (TPT/Fc e THR/Fc) do grupo exposto mostraram-se inferiores aos do grupo controle. Tais resultados indicam um inotropismo positivo e uma melhor dinâmica do acoplamento excitação-contração dos animais expostos ao Fpn. Entretanto, a maior parte dos estudos de contratilidade envolvendo exposição do animal a pesticidas indicam prejuízo na capacidade cardíaca.

Thomaz et al (2009) encontraram uma redução de 70% na Fc de preparações ventriculares de Tilápia-do-nilo após 96 horas de exposição ao organofosforado Triclorfon (Neguvon[®]), além de aumento dos valores dos parâmetros tempo dependentes TPT/Fc e THR/Fc, provavelmente resultado da inibição da Ca²⁺-ATPase sarcolemmal.

Estudos da contratilidade miocárdica de matrinxãs (*B. cephalus*) em situação controle, e expostos ao organofosforado metil-paration por 96 horas na concentração subletal de 2 mg.L^{-1} , indicaram que a exposição a tal inseticida reduziu a força de contração ventricular em aproximadamente 2 vezes em relação ao grupo controle. Além disso, também foi verificado aumento na velocidade de relaxamento (THR) do grupo exposto. Tais alterações foram atribuídas a reduções na concentração intracelular de Na^+ e Ca^{2+} (OLLE, 2007).

Waldemarin et al (2011) investigaram a ação da exposição de tilápias-do-nilo ao sulfato de cobre (CuSO_4), frequentemente usado como algicida e fungicida, a uma concentração de 1 mg.L^{-1} por 96 horas. Esses autores verificaram redução na força de contração e aumento dos parâmetros TPT/Fc e THR/Fc, resultados estes explicados pela redução da atividade de enzimas mitocondriais e depleção de ATP nos miócitos cardíacos.

Possíveis causas dos maiores valores Fc apresentados pelo grupo exposto ao Fpn no presente trabalho serão discutidos adiante.

Tensão Pós-Pausa

Vários podem ser os fatores que influenciam na força de contração do miocárdio. Segundo Chapman (1983) a variação da força de contração pode decorrer de um número variável de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, que irão requerer quantidades variáveis de íons Ca^{2+} . Conforme já descrito anteriormente, o Ca^{2+} pode ser proveniente tanto de reservas intracelulares do retículo sarcoplasmático (RS) quanto do influxo pela sarcolema, através dos canais lentos de cálcio (canais L) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) agindo no seu modo reverso (HOVE-MADSEN et al.,2000). Para o relaxamento, é necessária a redução dos níveis citosólicos de Ca^{2+} até os níveis diastólicos de repouso, podendo este ser armazenado no RS pela atividade da Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA), e/ou ser transportado para o meio extracelular através do NCX, agindo no seu modo normal, e pela Ca^{2+} -ATPase sarcolemal.

Estudos com microscopia eletrônica mostraram grandes diferenças no grau de desenvolvimento do RS no miocárdio de diferentes espécies de peixes (SANTER, 1985). Entretanto, o RS do miocárdio de peixes é, em geral, menos desenvolvido anatomicamente e menos representativo no acoplamento E-C do que o RS de mamíferos. No bacalhau *Gadus virens*, o RS corresponde a 0,6% do volume do cardiomiócito, e em mamíferos esse valor pode variar de 3,5% a 7% (HELLE, 1983; LEKNES, 1984). Infelizmente, não há dados na

literatura sobre a morfologia dos miócitos ventriculares de *H. regani* que permitam a inferência sobre a presença e grau de desenvolvimento de RS nesta espécie.

A ausência de estudos sobre o efeito de inseticidas fenil-pirazóis no coração de vertebrados dificulta sobremaneira a interpretação dos resultados obtidos no presente estudo. Uma provável causa do inotropismo positivo do grupo exposto ao Fpn poderia ser um manejo de cálcio diferenciado em relação ao grupo controle.

O protocolo de tensão pós-pausa foi realizado para verificar alterações nos valores de Fc e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT, TPT/Fc, THR, THR/Fc) da primeira contração após a pausa diastólica prolongada em comparação com as contrações antes da pausa. O desenvolvimento de uma potenciação da Fc na primeira contração após um período de repouso está relacionada com um maior armazenamento de cálcio intracelular pelo RS e, conseqüentemente, a liberação de uma maior quantidade de Ca^{2+} nessa primeira contração (COSTA et al., 2002).

Ambos os grupos não apresentaram aumento significativo da primeira contração após a pausa de 5 min em comparação com as contrações antes da pausa, indicando que provavelmente o cálcio utilizado para a contração provém do meio extracelular e não de reservas do RS. Corroborando com esses dados, a comparação dos valores de pós-pausa de tiras ventriculares em solução controle e em solução com lítio (onde o NCX encontra-se bloqueado), os valores da Fc pós-pausa em solução com lítio são significativamente menores do que os obtidos em solução controle, indicando que provavelmente o principal fornecedor de Ca^{2+} para a contração das tiras ventriculares de *H. regani* é o NCX atuando no modo reverso.

Os valores de TPT e THR na primeira contração após a pausa mostraram-se significativamente maiores em relação aos valores pré-pausa, indicando a ocorrência de uma acentuada redução da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) durante a pausa. Desta forma, os tempos para atingir a quantidade de Ca^{2+} transiente suficiente para contração e para o relaxamento tornaram-se maiores na pós-pausa do que para as contrações pré-pausa (onde as tiras ventriculares encontram-se em uma frequência de estimulação contínua de 0,4 Hz), considerando-se que os mecanismos de transporte de cálcio trans-sarcolemais são mais lentos que os do RS (BERS, 1991).

Na maioria das espécies de teleósteos de ambientes temperado estudadas, a principal corrente de cálcio ativador da contração do miocárdio provém dos canais do tipo L e do NCX no modo reverso (TIBBITS et al, 1992; VORNANEN, 1997; 1998). Essa afirmação é fundamentada em algumas características dos cardiomiócitos de peixes, como: 1) miócitos

de pequeno diâmetro, facilitando a ativação dos miofilamentos através do influxo de Ca^{2+} pela sarcolema; 2) ausência de túbulos T; 3) insensibilidade à rianodina, alcalóide conhecido por seu efeito inibidor da função do RS (DRIEDZIC e GESSER, 1988; HOVE-MADSEN, 1992). No entanto, em algumas espécies de peixes como os atuns (família Scombridae), o RS pode atuar como principal fornecedor do Ca^{2+} para a contração sob determinadas condições como temperaturas supra-fisiológicas e frequências de estimulação sub-fisiológicas (KEEN et al., 1992; SHIELS e FARREL, 2000).

A musculatura cardíaca de várias espécies de peixes como a carpa *Carassius carassius* (VORNANEN, 1989), o “sea-raven” *Hemitripterus americanus*, o bacalhau *Gadus morhua* (DRIEDZIC e GESSER, 1988), a tilápia-do-nilo *O. niloticus* (COSTA et al, 2000), e o amboré de poças de maré *Bathygobius soporator* (RANTIN et al, 1998), mostrou-se insensível à rianodina. Entretanto, nas espécies ativas como a cavala-do-pacífico *Scomber japonicus* (SHIELS e FARREL, 2000) e nos atuns “skipjack”, *Katsuwonus pelamis* (KEEN, 1992), e “yellowfin”, *Thunnus albacares* (SHIEL et al, 1999), a rianodina reduziu significativamente o desenvolvimento de força, mostrando que o RS dessas espécies é importante para o fornecimento de Ca^{2+} para as contrações do miocárdio.

A participação do RS no manejo de cálcio de espécies de regiões tropicais tem se mostrado mais variável, não seguindo uma correlação direta entre nível de atividade do animal e funcionalidade de seu RS. A exemplo disto podemos citar espécies Neotropicais como a traíra, *Hoplias malabaricus* (OLLE, 2003; RIVAROLI et al., 2006), o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (ANELI-JR et al., 2004), o curimatá, *Prochilodus lineatus* (RIVAROLI, 2006), o muçum, *Synbranchus marmoratus* (ROCHA et al, 2007), e para o dipnoico piramboia, *Lepidosiren paradoxa* (COSTA et al., 2004), cujos RS mostraram-se funcionais, independente do grau de atividade das espécies. Tais resultados sugeriram que a filogenia da espécie pode ser um fator determinante da funcionalidade do RS (RIVAROLI, 2006).

A atividade do RS também pode ser alterada pela exposição a agrotóxicos. Em um trabalho estudando o RS do músculo esquelético de coelhos, os inseticidas organofosforados paration e o azinphos, e os organoclorados DDT e aldrin, elevaram a atividade e a hidrólise de ATP da SERCA (ANTUNES-MADEIRA e MADEIRA, 1982). E outro estudo, a SERCA de ventrículos de ratos respondeu de forma dose-dependente à exposição aos inseticidas aldrin e endrin, sendo que baixas concentrações (25 μM) aumentaram sua atividade e altas concentrações (100 μM) inibiram a mesma (MEHROTRA et al., 1989).

Análise da expressão da SERCA2 no ventrículo de *H. regani*

Os vertebrados apresentam três genes responsáveis por codificar três isoformas da SERCA, enquanto a maioria dos invertebrados apresentam somente 1 gene. Adicionalmente, cada gene pode sofrer splicing alternativo, o que pode resultar em 10 proteínas SERCA: SERCA 1a/b, SERCA 2a/b, e SERCA 3a/b/c/d/e/f. Essas isoformas e suas variações demonstram ser expressas em tecidos específicos. A SERCA 1a é expressa em fibras musculares de contração rápida em adultos, e a SERCA 1b em neonatos (Brandl et al, 1987). A SERCA 2a é expressa prioritariamente no RS de músculo cardíaco e em fibras de contração lenta, embora também seja encontrada em músculo liso e em células de Purkinje no cerebelo. As SERCAs 2b e 3 são encontradas em vários tipos celulares, como em linfócitos, epitélio, endotélio, mastócitos, e em células de Purkinje no cerebelo (WUYTACK et al., 2002).

A análise de Western blot foi realizada para verificar a expressão da SERCA2 no músculo ventricular de *H. regani* em condições controle e exposto ao Fpn e, dessa forma, inferir sobre a participação e funcionalidade do RS na contratilidade cardíaca dessa espécie. O resultado do experimento de Western blot revelou que ambos os grupos experimentais não expressaram tal proteína, o que indica que o RS não é funcional para a contratilidade cardíaca dessa espécie nas condições experimentais utilizadas tanto no grupo controle como no exposto. Tal resultado corrobora com os resultados encontrados no protocolo *in vitro* de tensão pós-pausa, discutidos acima.

Embora no presente trabalho tenha sido utilizado anticorpo para mamífero (anti-cabra), este mesmo anticorpo ligou-se na SERCA2 de outros peixes como bagre-africano e traíra (dados não publicados) e matrinxã (RIVAROLI, 2011). Além disso, Landeira-Fernandez et al. (2004), utilizando o anticorpo específico para coelho, verificou a expressão da SERCA2 no músculo ventricular de 4 espécies de peixes (*Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares*, *Thunnus alalunga*, e *Scomber japonicus*).

Papel do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) na contratilidade miocárdica

Para avaliar importância do Ca^{2+} extracelular para a contração das tiras ventriculares do cascudo *H. regani*, a atividade do NCX foi bloqueada por meio da substituição do NaCl da solução fisiológica pelo LiCl.

O NCX é uma proteína transmembrana que transporta Na^+ e Ca^{2+} e é um importante regulador da contratilidade cardíaca em mamíferos, transportando 1 íon Ca^{2+} para o meio extracelular e 3 íons Na^+ para o meio intracelular, contribuindo para a redução do Ca^{2+}

no interior da célula e, conseqüentemente, para o relaxamento do miócito. A direção do movimento dos íons através do NCX depende do gradiente químico para estes íons, podendo ser revertida, havendo assim influxo de Ca^{2+} através deste trocador, contribuindo para a contração cardíaca (MULLINS, 1979).

O NCX apresenta elevada importância no relaxamento das células musculares cardíacas quando funcionando no seu modo normal, sendo o principal mecanismo para o efluxo de Ca^{2+} após a contração (VORNANEN, 1999). Porém, em espécies com RS, o influxo de Ca^{2+} pelo NCX no modo reverso pode desencadear uma liberação massiva de Ca^{2+} pelo RS, processo conhecido como “liberação de cálcio cálcio-induzida” (CICR) (VORNANEN et al, 1994; LEVI et al, 1994). Nas espécies de vertebrados basais que dependem do Ca^{2+} extracelular para a contração cardíaca, a corrente deste íon através do NCX atuando no modo reverso pode ser um importante mecanismo para o influxo de cálcio para a contração, mesmo na presença da corrente de cálcio pelos canais do tipo L (MULLINS 1979, FAN et al.1996).

O NCX se torna inativo na presença de cátions monovalente inorgânicos como o lítio, íon que é frequentemente utilizado em solução livre de sódio para estudar a atividade deste trocador (PALTY et al., 2004).

A substituição do NaCl pelo LiCl na solução fisiológica causou redução da Fc dos grupos controle e exposto, quando comparados com seus respectivos valores de Fc em solução controle, já a partir do 10º minuto do protocolo efeito do. O mesmo pôde ser observado com os valores de TPT e THR no 20º minuto. Além disso, como já dito anteriormente, os valores de Fc pós-pausa em solução com lítio foram significativamente menores que os obtidos em solução controle. Adicionalmente, os valores de THR pós-pausa em solução com lítio foram significativamente maiores que os obtidos em solução controle. Estes resultados apontam para uma grande importância do NCX, atuando no modo reverso, como fornecedor de Ca^{2+} para a ativação dos miofilamentos contráteis de *H. regani*, e, atuando no seu modo normal, para a extrusão de cálcio no relaxamento cardíaco, tanto no grupo controle quanto no grupo exposto ao Fpn.

Corroborando os resultados encontrados no presente estudo, experimentos com miócitos ventriculares de carpa crassiana (*Carassius carassius*) indicaram que o NCX sozinho pode ativar contrações quando o RS está bloqueado pela rianodina e os canais tipo L da sarcolema estão bloqueados com verapamil e Cd^{2+} . De maneira semelhante, em ratos neonatos o NCX no modo reverso disponibiliza aproximadamente 50% da entrada de cálcio pela sarcolema (VORNANEN, 1999). Dessa maneira, é possível que os canais do tipo L e o NCX (no modo reverso) sejam capazes de mediar um influxo de Ca^{2+} suficiente para o

desenvolvimento da Fc máxima do ventrículo de carpa crussiana, sem participação do RS (TITU e VORNANEN, 2001). No entanto, trabalhos vêm apontando que em algumas espécies o RS pode apresentar funcionalidade em condições fisiológicas distintas, como variação de temperatura ou frequência de estimulação (SHIELS, 2002).

A importância do efluxo de cálcio pela sarcolema através do NCX é muito maior nos cardiomiócitos de peixes do que de mamíferos. Na carpa crussiana, onde a funcionalidade do RS é insignificante, o NCX atuando no seu modo normal é parece ser o principal responsável pela retirada de cálcio intracelular. A elevada razão superfície/volume dos cardiomiócitos de peixes claramente facilita o efluxo de Ca^{2+} , assim o influxo deste íon (HOVE-MADSEN et al, 1998; VORNANEN, 1999). No entanto, não se pode descartar o envolvimento da bomba Ca^{2+} -ATPase da sarcolema na extrusão de cálcio, cuja representatividade ainda é desconhecida (SHIELS et al., 2002).

A comparação entre os grupos experimentais em solução com LiCl mostrou que houve um inotropismo negativo ao longo dos 20 minutos. No entanto, somente o grupo exposto ao Fpn apresentou uma redução significativa da Fc, no 20º minuto em relação ao valor de força apresentado no tempo inicial, enquanto o grupo controle não apresentou tal resultado, não apresentando redução significativa da Fc. Outro resultado importante foi encontrado na relação TPT/Fc, onde os valores do grupo exposto apresentaram significativo aumento no 20º minuto, enquanto no grupo controle não ocorreu tal comportamento. No THR e na relação THR/Fc, ambos os grupos apresentaram comportamento semelhante, com aumento significativo de seus valores ao longo dos 20 minutos. Estes resultados evidenciam que o grupo exposto apresenta uma maior dependência do NCX para a manutenção da Fc em relação ao grupo controle. Portanto, pode-se sugerir que o inotropismo positivo e a melhor dinâmica de contração do grupo exposto ao FPN em relação ao grupo controle, encontrados no presente trabalho, devem-se a uma maior expressão e/ou atividade do NCX (atuando tanto no modo normal quanto no reverso) no grupo exposto.

Papel da bomba de Na^+/K^+ -ATPase na contralateralidade miocárdica

O gradiente de íons mantido pela sarcolema é essencial para a funcionalidade das células musculares, uma vez que origina um potencial de repouso que, ao ser revertido pelo recebimento de potenciais de ação, permite a ativação de canais específicos e o transito de íons. A manutenção desse gradiente é um processo ativo que pode consumir de 50% a 60% do ATP em células excitáveis. (SCHRAMM; KLIEBER; DAUT, 1994; ROLFE; BROWN, 1997; BOUTILIER, 2001). A maior parte deste ATP é utilizado pelo movimento de Na^+ e K^+

pela bomba de Na^+/K^+ -ATPase, que movimenta 3 íons Na^+ para o meio extracelular, e 2 íons K^+ para o meio intracelular. (PAAJANEN; VORNANEN, 2003).

Experimentos com imunolocalização indicaram que a bomba Na^+/K^+ -ATPase compõe um complexo com o NCX, sendo que a atividade do NCX e da bomba Na^+/K^+ -ATPase estão intimamente associadas (FUJIOKA e BAN, 1998).

A concentração de sódio intracelular no cardiomiócito é muito importante na modulação da atividade elétrica e contrátil. Isto ocorre porque a alta concentração de sódio intracelular pode inibir a atividade do NCX no modo normal, promovendo maior acúmulo de Ca^{2+} no meio intracelular, que é um fator determinante no desenvolvimento de força do miocárdio (BERS e DESPA, 2003).

Os glicosídeos cardíacos são substâncias que interagem com a bomba Na^+/K^+ -ATPase gerando profundas mudanças no comportamento fisiológico das células cardíacas. A interação de glicosídeos cardíacos (ex. ouabaína) com a bomba Na^+/K^+ -ATPase é de particular interesse uma vez que pode tanto causar efeitos inotrópicos positivos quanto efeitos tóxicos. Geralmente, respostas inotrópicas positivas são produzidas em baixas concentrações de ouabaína, enquanto que efeitos tóxicos resultam de elevadas concentrações. Contudo, ambos efeitos podem ser produzidos em uma mesma concentração de ouabaína, dependendo da atividade da preparação, o que levou à sugestão, por vários pesquisadores, de que as atividades mecânica, química e elétrica dos cardiomiócitos podem contribuir para as diferenças na sensibilidade das preparações à ouabaína (para uma revisão, ver STIMERS et al., 1990).

Lee (1985) e Schwartz et al. (1998) verificaram que o efeito inotrópico da ouabaína resulta do bloqueio da bomba Na^+/K^+ -ATPase, gerando um aumento na concentração de Na^+ intracelular que tende a aumentar a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via NCX, enquanto que os efeitos tóxicos ocorrem quando a ocupação dos receptores pela ouabaína se eleva a tal ponto que o aumento exacerbado de Na^+ reduz significativamente o gradiente deste íon, interferindo em todos os mecanismos regulatórios sódio-dependentes.

Diversos estudos demonstraram um efeito inotrópico positivo da ouabaína no miocárdio de porquinho da índia (BENTFELD et al., 1977; HERZIG e MOHR, 1984; PYTKOWSK, 1988), bezerros e ovelhas (MÜLLER, 1965), ratos (PEACOCK e MORAN, 1963) humanos (SCHWINGER et al., 1993).

No presente estudo, a adição de ouabaína na solução fisiológica não provocou alterações nas menores concentrações (10^{-8} e 10^{-7} M), entretanto, nas maiores concentrações (10^{-6} M e 10^{-5} M) a ouabaína reduziu significativamente a Fc do grupo exposto, enquanto o

grupo controle sofreu redução da Fc somente na maior concentração (10^{-5} M). A relação TPT/Fc do grupo exposto sofreu aumento significativo, assim como a relação THR/Fc em ambos os grupos.

Como não foi encontrado um aumento significativo da RT, o inotropismo negativo encontrado nas maiores concentrações de ouabaína poderia ser atribuído a uma possível sobrecarga (“*overload*”) de cálcio intracelular. O excesso de cálcio no miócito pode gerar hipercontratura, arritmias, depleção de ATP e morte celular por necrose ou apoptose (BERS, 2008).

Quando ocorre uma sobrecarga de cálcio intracelular, a mitocôndria pode armazenar parte desse íon. No entanto, a alta concentração de Ca^{2+} na mitocôndria ativa os poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM). Os poros PTPM abertos desacoplam a fosforilação oxidativa e provocam dilatação da matriz mitocondrial, levando a ruptura da membrana externa de tal organela. Isto causa a liberação de *citocromos c*, contribuindo para a ativação de proteínas caspases e, conseqüentemente, a apoptose (CROW et al., 2004). As caspases são uma família conservada de cisteína-proteases, que são efetoras universais de apoptose. Uma vez ativadas, as caspases induzem apoptose pela quebra e alteração de diversas proteínas intracelulares (HOLLY et al., 1999).

A sobrecarga de cálcio também pode ativar proteases cálcio-dependentes (denominadas calpaínas), que podem quebrar proteínas cruciais para a contração, como a troponina I, a cadeia leve de miosina e, provavelmente, a troponina T, (BARTA et al., 2005). Em situações de isquemia e reperfusão, as calpaínas também quebram proteínas da família Bid, o que pode levar à liberação de *citocromo c* pela mitocôndria, gerando apoptose (CHEN et al., 2001).

Muitos trabalhos utilizam elevadas concentrações de ouabaína para induzir sobrecarga de cálcio e, assim, estudar maneiras de prevenir tal processo (ISHIDA et al, 2001; RUCH, NISHIO, WASSERSTROM, 2003). Ishida et al (2001) verificou um aumento de 51% nas hipercontraturas em miócitos ventriculares isolados de ratos tratados com ouabaína. Baartscheer et al (2003), estudando o manejo de cálcio em miócitos ventriculares isolados de coelho tratados com ouabaína, observou um aumento de 28% na $[Ca^{2+}]_i$ durante a diástole, associado a uma redução em 46% na amplitude do Ca^{2+} transiente, sendo tais alterações similares às encontradas em coelhos com insuficiência cardíaca.

No presente estudo, ambos os grupos experimentais apresentaram inotropismo negativo com os sucessivos acréscimos de ouabaína na solução fisiológica. No entanto, o grupo exposto ao Fpn apresentou redução significativa da Fc na concentração 10^{-6} M,

enquanto o grupo controle só apresentou tal comportamento na maior concentração, de 10^{-5} M. Tal efeito poderia ser atribuído a uma possível expressão e/ou atividade aumentada do NCX no grupo exposto. Com a inibição da bomba Na^+/K^+ -ATPase, seguida por um aumento da concentração de Na^+ intracelular, o NCX deve atuar prioritariamente no modo reverso, e como o grupo exposto provavelmente apresenta uma maior expressão/atividade do NCX, a concentração de 10^{-6} M foi suficiente para provocar uma sobrecarga de Ca^{2+} e, conseqüentemente, a redução significativa da Fc, enquanto no grupo controle somente a maior concentração (10^{-5} M) foi capaz de provocar tal efeito.

Pode-se sugerir que as concentrações iniciais de ouabaína (10^{-8} M e 10^{-7} M) não foram suficientes para a geração de respostas inotrópicas, em virtude de um reduzido, ou ausente, bloqueio das bombas Na^+/K^+ -ATPase sarcolemas. Em contrapartida, a concentração seguinte, 10^{-6} M (mil vezes maior), pode ter bloqueado totalmente o conjunto dessas bombas, provocando uma possível sobrecarga de cálcio e, por conseqüência, o inotropismo negativo. Talvez, uma concentração intermediária (ex.: 5×10^{-7}) pudesse promover efeitos inotrópicos diferentes dos encontrados no presente trabalho, por um possível bloqueio parcial do conjunto de bombas Na^+/K^+ -ATPase sarcolemas, que permitam o aumento do cálcio transiente.

Efeito do cálcio extracelular na contratilidade miocárdica

Segundo Chapman (1983), a geração de força do músculo cardíaco é promovida por um número variável de pontes entre os filamentos de actina e miosina, que, por sua vez, requerem íons Ca^{2+} para a geração de força. Alterações na Fc podem ser obtidas, por exemplo, com a alteração na quantidade disponível deste íon. O aumento na concentração de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) pode favorecer o aumento do influxo deste íon através da sarcolema sem a atuação de qualquer via de transdução de sinal, diferente do que ocorre com a estimulação adrenérgica (SHIELS e FARRELL, 1997).

Muitos estudos indicam que a contratilidade cardíaca da maioria dos peixes depende da concentração do cálcio extracelular, comprovando a importância dos movimentos de Ca^{2+} através da sarcolema para o acoplamento E-C desses animais (TIBBITS et al., 1992, DRIEDZIC e GESSER, 1994; VORNANEN, 1996).

Costa et al (2000), estudando a contratilidade de tiras ventriculares de *O. niloticus*, verificou que o tratamento com rianodina não influenciou no inotropismo cardíaco, indicando que o RS parece não ser representativo no acoplamento E-C do miocárdio dessa espécie. Além disso, a elevação gradual da $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (de 1,25 mM até 9,25 mM) provocou um inotropismo positivo sugerindo que, em *O. niloticus*, a disponibilidade de cálcio para a

contração do aparato contrátil depende principalmente do influxo e efluxo deste íon pela sarcolema.

No presente estudo, os valores de Fc de ambos os grupos experimentais se elevou ao longo dos incrementos de cálcio na solução, no entanto, esse aumento foi significativo somente no grupo exposto. Tais resultados indicam que o grupo exposto ao Fpn apresenta uma dinâmica melhorada nos mecanismos de influxo de cálcio pela sarcolema, provavelmente pela ação do NCX no modo reverso.

Os valores das relações TPT/Fc e THR/Fc não se alteraram significativamente ao longo dos incrementos de cálcio em relação a concentração inicial. Entretanto, os valores de TPT/Fc e THR/Fc no grupo exposto foram significativamente menores que o grupo controle em todas as concentrações de Ca^{2+} . Tais resultados, em conjunto com os da análise da Fc ao longo dos incrementos de Ca^{2+} , corroboram a hipótese de que o efeito cardiotônico ocorrido com a exposição ao Fpn está intimamente relacionado com os mecanismos sarcolemais de transporte de cálcio, provavelmente pela atividade do NCX.

Efeito dos incrementos na frequência de estimulação sobre a contratilidade miocárdica

A força de contração desenvolvida pelo miocárdio está intimamente relacionada com a frequência de estimulação e sua regularidade. A análise do intervalo entre uma contração e a contração precedente é de fundamental importância para a determinação de tensão (HAJDU, 1969).

Muitos estudos analisaram a relação entre a força de contração e a frequência de estimulação em diversas espécies de peixes. O coração da maioria das espécies de teleósteos apresenta uma redução na Fc em resposta ao aumento da frequência de estimulação. Em altas frequências, antes das contrações se tornarem irregulares, a Fc se reduz de 50% a 90% no músculo cardíaco de grande parte dos teleósteos estudados. Este comportamento, conhecido como relação força-frequência negativa (SHIELS; VORNANEN; FARREL, 2002), limita a capacidade de elevação do débito cardíaco durante aumentos na frequência de contração e pode ser o motivo pelo qual muitos peixes variam o volume sistólico para atender alterações na demanda cardíaca (FARREL e JONES, 1992).

A relação força-frequência negativa está relacionada a uma obtenção insuficiente de Ca^{2+} insuficiente para a manutenção da força de contração em elevadas frequências de estimulação, seja a partir de reservas intracelulares ou pelos mecanismos sarcolemais, determinando indiretamente o grau de eficiência do músculo cardíaco (DRIEDZIC e GESSER, 1985).

O relaxamento é outro importante fator na manutenção da Fc em altas frequências de estimulação, devido à dificuldade em diminuir a concentração de Ca^{2+} intracelular pela sarcolema (SHIELS; FARREL, 1997). Outros fatores como a distância de difusão intracelular para o cálcio alcançar os miofilamentos e a velocidade na qual este íon é removido do meio intracelular até promover o relaxamento completo do miocárdio são cruciais para a manutenção do inotropismo em altas frequências de contração (KEEN et al, 1992).

Driedzic e Gesser (1988) verificaram que o aumento da frequência de estimulação em elasmobrânquios resultou em uma elevação inicial da força de contração, seguida por uma redução de tal parâmetro. O ápice da tensão isométrica foi atingido na faixa fisiológica de frequências de contração dessas espécies. Bers (1991) apontou a resposta positiva da força de contração no coração de mamíferos, ao longo de incrementos na frequência, como uma evidência indireta da participação do RS no acoplamento E-C.

A resposta frente o aumento da frequência de estimulação pode variar de acordo com as condições experimentais. Costa et al (2002) estudando a contratilidade de tiras ventriculares de piramboia (*Lepidosiren paradoxa*) nas temperaturas de 15°C, 25°C e 35°C, observou mecanismos diferenciais de transporte de Ca^{2+} nas diferentes temperaturas ao longo dos incrementos de frequência. A 35°C, a Fc se manteve constante até 1,8 Hz, reduzindo-se durante os incrementos de frequências subsequentes. Nesta condição, a rianodina não provocou efeito algum, indicando um aumento da atividade do NCX para assegurar a eficiência do inotropismo nesta temperatura. Entretanto, nas temperaturas 15°C e 25°C, a rianodina intensificou a redução da Fc ao longo de sucessivas elevações da frequência, sugerindo a importância do RS para esta espécie em temperaturas mais baixas.

No presente estudo, ao contrário do encontrado na maioria dos teleósteos, a Fc de ambos os grupos experimentais não sofreu alteração significativa ao longo dos incrementos de frequência até a frequência máxima atingida. Além disso, o grupo exposto suportou frequências de estimulação mais elevadas (2,6 Hz – 156 bpm) em relação ao grupo controle (2,0 Hz – 120 bpm). Os valores de TPT e THR reduziram-se significativamente com o aumento da frequência em ambos os grupos experimentais, e as relações TPT/Fc e THR/Fc não sofreram alterações significativas. Tais resultados apontam para uma grande eficiência do acoplamento E-C em *H. regani*, mesmo sob elevadas frequências de estimulação. Considerando que, provavelmente, o RS não é representativo para o acoplamento E-C dessa espécie nas condições experimentais estudadas (constatado através dos experimentos de tensão pós-pausa e de Western blot), os resultados encontrados no protocolo força-frequência

apontam para os mecanismos sarcolemais como sendo primordiais na manutenção da força diante dos incrementos na frequência de estimulação.

Subramani et al (2005), estudando a relação força-frequência em tiras ventriculares da espécie de rã *Rana hexadactyla*, verificou um aumento na amplitude da Fc ao longo dos incrementos de frequência de estimulação nas tiras controle, e também em tiras expostas a rianodina. Com a exposição das tiras à ouabaína, e em solução com baixa concentração de Na^+ , a relação força-frequência foi negativa. Os autores desse trabalho concluíram que, para a essa espécie, o NCX atuando no modo normal, durante todo o período da diástole, é fundamental para o desenvolvimento de uma força-frequência positiva, pois promove um relaxamento completo e conseqüentemente um acoplamento E-C eficiente, mesmo em altas frequências de estimulação.

Em anfíbios, assim como em teleósteos, a razão superfície/volume do cardiomiócito é até 10 vezes superior à de mamíferos, diminuindo a distância e o tempo necessário para a difusão do Ca^{2+} até os miofilamentos, e a maior afinidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} possibilita que esses animais mantenham um acoplamento E-C eficiente (TIBITIS et al, 1992), o que pode refletir em uma relação força-frequência positiva, mesmo na ausência de um RS anatomicamente desenvolvido.

Semelhante ao encontrado no presente trabalho, Costa et al (2007), expuseram girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeiana*) ao herbicida Roundup Original® e verificaram uma relação força-frequência positiva no grupo controle e também no grupo exposto ao Roundup®. No entanto, a Fc do grupo controle reduziu-se a partir da frequência 0,8 Hz e o grupo exposto ao Roundup® continuou elevando sua Fc com os incrementos de frequência até 1,2 Hz. Os autores deste trabalho sugeriram que estes resultados são decorrentes de um possível efeito do surfactante aniônico polioxietileno amina (POEA), presente no Roundup®, o qual pode ter aumentado a produção de óxido nítrico (NO) através da ativação da enzima NO sintase e, assim, ter influenciado o acoplamento E-C da rã-touro.

Não se pode descartar a hipótese de que a formulação comercial do Fpn utilizada no presente estudo (Regent 800 WG®) possa atuar nas vias de síntese de NO, nem tampouco que os ingredientes ditos “inertes” presentes em sua composição possam estar atuando de alguma forma sobre o acoplamento E-C de *H. regani*. Infelizmente, não há, na literatura, dados sobre o efeito desse inseticida na contratilidade cardíaca de vertebrados.

Capacidade de bombeamento cardíaco - CBC

Um importante índice de rendimento do miocárdio ao longo de alterações na frequência de estimulação é a capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), que é obtida através do produto da força de contração pela respectiva frequência de estimulação. De acordo com Matikainen e Vornanen (1992), os valores de CBC podem ser utilizados como representação indireta do débito cardíaco (que é o produto do volume sistólico pela frequência cardíaca).

Ambos os grupos apresentaram aumento do CBC conforme a frequência foi aumentada, indicando que o miocárdio de *H. regani* é capaz de atender eficientemente possíveis demandas metabólicas, mesmo em frequências elevadas. O grupo exposto apresentou CBC mais elevada que o grupo controle em todas as frequências de estimulação. Além disso, a curva do CBC do grupo exposto ao Fpn foi deslocada para a direita em relação ao grupo controle, evidenciando que a frequência onde o grupo exposto apresenta maior CBC é superior que a do grupo controle. Estes resultados corroboram a possível expressão e/ou atividade aumentada do NCX no grupo exposto, já discutido acima.

O aumento da Fc e a maior dinâmica no acoplamento E-C encontrada no grupo exposto pode ser um mecanismo compensatório em resposta a possíveis alterações metabólicas desencadeadas pela exposição ao inseticida. Carpas (*Cyprinus carpio*) expostas por 15 dias a uma concentração de 0,14 mg.L⁻¹ de Fpn apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas, dentre elas um significativo aumento do cortisol sérico (ZACIKOVA, et al., 1999). Em outro trabalho, a exposição de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Paulistinha (*D. rerio*) a concentrações de Fpn entre 0,1 mg.L⁻¹ a 1 mg.L⁻¹ promoveu alterações comportamentais como hiperatividade e natação errática (CELLA, 2009). Tais resultados apontam para uma possível situação de estresse causada pela exposição dessas espécies ao Fpn. Ademais, Demers e Bayne (1997) observaram que situações de estresse em truta arco-íris desencadeiam a elevação nos níveis de adrenalina e cortisol séricos. Sabe-se que a estimulação adrenérgica em ratos provoca aumentos no nível de expressão gênica e na atividade do NCX (REINECKE, VETTER, DREXLER, 1997). Se tais respostas tiverem ocorrido nos exemplares de *H. regani* expostos ao Fpn, as mesmas poderiam explicar a possível expressão/atividade diferenciada do NCX neste grupo experimental.

O débito cardíaco pode ser elevado com o aumento na força de contração, bem como com variações na frequência cardíaca. Como citado anteriormente, o coração dos peixes pode aumentar significativamente o débito cardíaco através da modulação do volume

sistólico, assim dependendo menos de variações na frequência cardíaca (FARREL e JONES, 1992).

Sabe-se que os inseticidas piretróides retardam a ativação e inativação de canais de Na⁺ voltagem-dependentes das membranas, interferindo nos potenciais de ação de tecidos excitáveis (HAVERINEN e VORNANEN, 2013). Estima-se que os insetos são 15000 vezes mais sensíveis aos piretróides do que os mamíferos (NARAHASHI et al, 2007). Entretanto, concentrações de 0,1 a 10 µM do piretróide Decametrina, em preparações atriais de cobaias, provocou um inotropismo positivo acompanhado por aumento na taxa de contração e de relaxamento. Tais resultados foram justificados pela liberação de catecolaminas pelo nervo simpático terminal no tecido cardíaco quando exposto a Decametrina (BERLIN et al.,1984).

Haverinen e Vornanen (2013) estudaram o efeito do piretróide Deltametrina na contratilidade do miocárdio de truta arco-íris (*O. mykiss*) e observaram vários distúrbios na presença do inseticida. As concentrações de 10⁻⁷ M até 3 x 10⁻⁵ M do inseticida elevaram a frequência de despolarização do nodo sinoatrial em até 19 vezes, geraram contrações arrítmicas e prolongamento do potencial de ação do ventrículo dessa espécie. A cardiotoxicidade causada pela deltametrina é provavelmente devida ao impacto da inativação da corrente de Na⁺, o que resulta em um acúmulo de Na⁺ subsarcolemal e alterações na excitabilidade dos cardiomiócitos.

Alterações no acoplamento E-C e no manejo de cálcio e sódio intracelular podem exercer um papel crítico na fisiopatologia da insuficiência cardíaca de mamíferos (HASENFUSS, 1998). Muitos estudos indicam que cardiomiócitos de corações com insuficiência cardíaca apresentam elevada concentração de Na⁺ intracelular (DESPA et al.,2002; BAARTSCHEER et al.,2002). Studer et al. (1994), estudando corações humanos com insuficiência cardíaca, verificaram o aumento da expressão do NCX em 55%, e a redução da expressão da SERCA em 41%. Essas alterações podem levar a distúrbios da função cardíaca e ao desenvolvimento de arritmias em pacientes com insuficiência cardíaca (HASENFUSS, 1998). Em cães com insuficiência cardíaca, a expressão da SERCA e do fosfolambano reduziram-se em 28% e a expressão do NCX elevou-se em 104% (WINSLOW et al., 1999).

Diversos resultados relevantes foram encontrados em um estudo da contratilidade cardíaca de ratos transgênicos com superexpressão do NCX em comparação com uma linhagem de ratos selvagens. Este aumento na expressão do NCX em ratos transgênicos elevou a contratilidade cardíaca basal (desenvolvimento de pressão pelo

ventrículo esquerdo, $+dP/dt_{max}$ e $-dP/dt_{min}$) em comparação a ratos selvagens. Além disso, após uma situação de isquemia/reperfusão induzida, os ratos transgênicos apresentaram menor recuperação da contratilidade cardíaca e das quantidades de ATP e creatina-fostato e apresentaram maior ocorrência de alternância mecânica (“*mechanical alternans*” - alternância na amplitude das contrações cardíacas batimento-a-batimento) em relação a linhagem selvagem. Tais resultados indicam que a superexpressão do NCX, além de elevar a contratilidade basal, pode aumentar a suscetibilidade do animal a danos em uma situação de isquemia e reperfusão (CROSS et al., 1998).

Eigel et al. (2004), estudando miócitos ventriculares isolados de porquinho-da-índia, observaram que o NCX tem importante participação no desencadeamento de apoptose após um período de hipóxia e reoxigenação. De acordo com esses autores, um acúmulo de Na^+ intracelular durante a hipóxia estimula o NCX a atuar no modo reverso, levando a uma sobrecarga de cálcio. No presente trabalho, foi observado aumento da contratilidade ventricular do grupo exposto ao Fpn, provavelmente pela maior expressão e/ou da atividade do NCX e, como sugerido pelos trabalhos supracitados, aumentos na atividade e expressão do NCX podem gerar prejuízos à contratilidade cardíaca.

A maior força de contração desenvolvida pelo miocárdio ventricular dos exemplares de *H. regani* expostos ao Fpn no presente trabalho pode induzir à ideia de que este inseticida é benéfico para o coração e, portanto, devem ser analisados com cautela. É importante ressaltar que preparações *in vitro* não refletem a condição *in vivo*, dado que os possíveis efeitos do inseticida sobre o sistema nervoso e, conseqüentemente, sobre o controle nervoso da função cardíaca, são suprimidos. Desta forma, mais estudos sobre os efeitos do Fpn na contratilidade cardíaca de peixes, utilizando diferentes concentrações do inseticida, diferentes tempos de exposição e estudos de seus efeitos *in vivo* devem ser realizados. Além disso, estudos comparando o efeito do fipronil e das formulações comerciais são de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de ação deste inseticida em peixes.

7. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho a partir da análise do miocárdio ventricular do cascudo *H. regani* em condição controle e após a exposição por 96 horas ao Fpn em sedimento artificial, na concentração de 4,23 μ /Kg, permitiram as seguintes conclusões:

- A exposição ao Fpn não provocou alterações na MVR.
- A análise de Western blot revelou que a proteína SERCA2 não é expressa em ambos os grupos, nas condições estudadas.
- Os experimentos indicaram que o cálcio para a contração ventricular provém do meio extracelular, principalmente pelo NCX no modo reverso, e não de reservas do RS.
- A exposição ao Fpn provocou um efeito inotrópico positivo e reduziu os valores de TPT/Fc e THR/Fc das tiras ventriculares de *H. regani* nos protocolos experimentais realizados, devido a provável expressão e/ou atividade aumentada do NCX do grupo exposto.
- As tiras ventriculares de *H. regani* não apresentaram alterações na Fc ao longo de aumentos na frequência de estimulação.
- O bloqueio da bomba Na⁺/K⁺-ATPase provocou um inotropismo negativo em ambos os grupos experimentais, tal efeito ocorreu por uma provável sobrecarga de Ca²⁺ intracelular.
- O grupo exposto ao Fpn foi capaz de contrair regularmente até frequências mais elevadas e atingiu maiores valores de CBC em relação ao grupo controle, provavelmente pela expressão e/ou atividade aumentada do NCX do grupo exposto.

8. Referências Bibliográficas

ABRAMOFF, M.D., MAGALHAES, P.J., RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, p. 36-42, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>. Acesso em maio de 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16/02/2011.

AHO, E.; VORNANEN, M. Ca^{2+} -ATPase activity and Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation. **J.Exp. Biol.**, v. 201, p. 525-532, 1998.

ALLEN, D.; KENTISH, J. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. **J. Mol Cell Cardiol.**, v. 9, p. 821-840. 1985.

ANELLI-JR, L.C., OLLE, C.D., COSTA, M.J., RANTIN, F.T., KALININ, A. L. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus*. **J. Therm. Biol.**, v. 29, p. 103-113, 2004

ANTUNES-MADEIRA, M. C., MADEIRA, V. M. C. Interaction of insecticides with the Ca^{2+} pump activity of sarcoplasmic reticulum. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 17, n. 2, p. 185-190, 1982.

ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 14, p.1-80, 2004

ARRATE, J. A., PILAR, R., MARTINEZ-MADRID, M. Tubifex tubifex chronic toxicity test using artificial sediment: methodological issues. **Limnetica**, v. 23, p. 25-36 ,2004.

AMARAL, R. B. Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica. Tese de doutorado (Doutorado em ciências, área de concentração: Química analítica e inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

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

BAARTSCHEER, A. et al. Increased Na^+/H^+ exchange activity is the cause of increased $[\text{Na}]_i$ and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 1015–1024, 2003.

BABICK, A.P., DHALLA, N.S. Role of Subcellular Remodeling in Cardiac Dysfunction due to Congestive Heart Failure. **Med.Princ.**, v.16, p. 81-89, 2007.

BAILEY, JR; DRIEDZIC, W.R. Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimatation. **J. Exp Biol.**,v. 149, p. 239-254, 1990.

BAIRD, C. (2002). Química Ambiental – Segunda Edição. Porto Alegre. Editora Bookman, 622p.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. Trace determination of pesticide and their degradation products in water. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997. 542p.

BARTA J, TOTH A, EDES I, VASZILY M, PAPP JG, et al. Calpain-1-sensitive myofibrillarproteins of the human myocardium. **Mol. Cell Biochem.**, v. 278, p.1–8, 2005.

BEELER, A.; SCHLENK, D.K. (2001) Synthesis of fipronil Sulfide, an Active metabolite, from the parent insecticide fipronil. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 5371–5372, 2001.

BEGGEL, S.; WERNER, I.; CONNON, R. E.; GEIST, J. P. Impacts of the phenylpyrazole insecticide fipronil on larval fish: time-series gene transcription responses in fathead minnow

(*Pimephales promelas*) following short-term exposure. **Science of the total environment.**, v. 426, p. 160-165. 26 April 2012.

BERLIN, J. R., BRODY, T. M., MATSUMURA, F. The inotropic effects of a synthetic pyrethroid decamethrin on isolated guinea pig atrial muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 98, p. 313-322, 1984.

BERS DM, BARRY WH, DESPA S. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. **Cardiovasc Res.**, v. 57, p.897–912, 2003.

BERS, D. M. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. **Annu. Rev. Physiol.** V. 70, p. 23–49, 2008.

BERS, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling (Insight review articles). **Nature**, vol. 415: pp. 198-205, 2002.

BERS, D.M. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers (2a ed.), p.258, 1991.

BERS, D.M. Ryanodine and the calcium content of cardiac SR assessed by caffeine and rapid cooling contractures. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. 408-C415, 1987.

BOBE, A., COOPER, J-F., COSTE, C.M . Factors Influencing the adsorption of fipronil on soils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 4861-4865, 1997.

BOBE, A., COOPER, J-F., COSTE, C.M., MULLER, M-A. (1998). Behavior of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pestic. Sci.** 52: 275-281.

BOUTILIER, R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. **J. Exp. Biol.**, v. 204, p. 3171–3181, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **An. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S; LOPES, B.S. Peixes do Pantanal: Manual de identificação. Brasília, Embrapa, 1999.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. In: Poluição e Piscicultura, notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura. São Paulo, FSPUSP e Instituto de Pesca. p.79-108, 1972.

BURGESS WE (1989) An Atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. T.F.H. Publications Neptune City, N.Y.

BURNETTE W.N. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981.

CARDOSO et al.; Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. **Zootaxa**, v. 3453, p. 69–83, 2012.

CALORE, E. E.; PEREZ, N.M.; HERMAN, M. M. Morphometric studies of cardiac myocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 447-450, 2007.

CARY, T. L.; CHANDLER, G. T.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S. & FERRY, J. L. Phenylpyrazole Insecticide Fipronil Induces Male Infertility in the Estuarine Meiobenthic Crustacean *Amphiascus tenuiremis*. **Environmental Science and Technology**, v. 98, p. 522 – 528, 2004.

CELLA, A. N. Ecotoxicologia do agrotóxico fipronil em pacu (*Piaractus mesopotomicus*) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Corumbataí. Tese (Defesa de Doutorado). Centro de energia nuclear na agricultura. Universidade de São Paulo, 2009.

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

CHEBIB, M. et al. (3-Aminocyclopentyl) methylphosphonic acids: novel GABA_A receptor antagonists. **Neuropharmacology**. v. 52, p. 779-787, 2007.

CHEBIB, M., GRAHAM, J. A. R. The 'abc' of gaba receptors: a brief review, **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, p. 937-940, 1999.

CHEN M, HE H, ZHAN S, KRAJEWSKI S, REED JC, et al. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. **J. Biol. Chem.**, v.276, p. 30724–28, 2001.

CLARK, R.J.; RODNICK, K.J. Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1541-1552, 1998.

CLASEN, BÁRBARA. et al. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: implications for rice. **Ecotoxicology and environmental safety**., v. 77, p. 45-51. 09 nov. 2011.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução CONAMA n. 20 de 18 de junho de 1986, classifica segundo seus usos preponderantes as águas do Território Nacional em águas doces, salobras e salinas em 9 classes. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de julho de 1986. Seção I.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de março de 2005. Seção I.

CONNELLY, P. Environmental fate of Fipronil. California Environmental Protection Agency. 17p. Sacramento, CA 95812-4015, 2001.

COOPER, C.M. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems - a review. **J. Environ. Qual.**, v. 22, p. 402-408, 1993.

COOPER, G. Cardiocyte adaptation to chronically altered load. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 49, p. 501-518, 1987.

CORONADO, R. et al. Structure and function of ryanodine receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 246, n. 35, p. 1485-1504, 1994.

COSTA, M.J., et al. Cardiac tissue function of the telesot fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. **J. Therm. Biol.**, v. 25, p. 373-379, 2000.

COSTA, M.J., et al. Effect of acute temperature transitions on chronotropic and inotropic responses in the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 39-45, 2002.

COSTA, M.J., et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153-163, 2007.

COSTA, M.J.; OLLE, C.D.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Role of the sarcoplasmic reticulum in calcium dynamics of the ventricular myocardium of *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi) at different temperatures. **J. therm. Biol**, v. 29, pp. 81-89, 2004.

COVAIN R, FISCH-MULLER, S. The genera of neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae); a practical key and synopsis, **Zootaxa.**, v. 1462, p. 1-40, 2007.

COVAIN R, FISCH-MULLER S, MONTOYA-BURGOS J. I. Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, p. 986-1002, 2008.

CROSS, H. R., LU, L., STEENBERGEN, C., PHILIPSON, K. D., MURPHY, E. Overexpression of the Cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger increases susceptibility ischemia/reperfusion injury in male, but not female, transgenic mice. **Circ Res.**, v. 83, p. 1215-1223, 1998.

CROW MT, MANI K, NAM Y. J, KITSIS R.N. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. **Circ. Res.**, v. 95, p. 957–70, 2004.

CUNHA-SANTINO, M., BIANCHINI, I., J. Tropical macrophyte degradation dynamics in freshwater sediments: relationship to greenhouse gas production. **Jornal of Soils and Sediments**, 13:1461 – 1468, 2013.

DELGADO, L., SCHMACHTENBERG, O. Immunohistochemical Localization of GABA, GAD65, and the Receptor Subunits $\text{GABA}_{A\alpha 1}$ and GABA_{B1} in the Zebrafish Cerebellum. **The Cerebellum**, v. 7, n. 3, p. 444-450, 2008.

DEMERS, N. E., BAYNE, C. J., The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme i rainbow trout. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, No. 4, p. 363-373, 1997.

DESPA, S., ISLAM, M.A., POGWIZD, S.M., BERS, D.M. Intracellular $[\text{Na}]_i$ and Na/K-pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. **J Physiol** ., v. 539, p. 133-143, 2002.

DIERKES-TIZEK, U. et al. Effect of organophosphates on rat heart ATPases. **Arzneim. Forsch.**, v. 34, n. 66, p. 671-678, 1984.

DORES, E.F.G.C.; FREIRE, E.M.L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Quím. Nova**, v. 24, p. 27-36, 2001.

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.

DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Ca²⁺ protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. **J. Comp. Physiol.**, v. 156B, p. 135-142, 1985.

DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. **J. Exp. Biol.**, v. 140, p. 227-241, 1988.

EDWARDS, C.A. Persistent pesticides in the environment. 2th. ed. U.S.A: CRC. Press, 1973. 170p.

EIGEL, B. N., GURSAHANI, H., HADLEY, R. W. Na⁺/Ca²⁺exchanger plays a key role in inducing apoptosis after hypoxia in cultured guinea pig ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 287, p. H1466–H1475, 2004.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. (2012). Species of Fishes by family/subfamily. Versão online datada de 10/05/2012. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp>>.

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

FAN J., SHUBA, Y.M., MORAD, M. Regulation of cardiac sodium–calcium exchanger by beta-adrenergic agonists. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v 93, p. 5527–5532, 1996.

FARRELL, A.P., JONES, D.R. The Heart. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. & Farrell, A.P. Fish Physiology, v. XII(A): **The Cardiovascular System. Academic Press, Inc., New York.** p. 1-88, 1992.

FÁVARO LF, CHAVES P.T.C. Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus cf. tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó I. **Acta Biol. Par.**, v. 28, p. 125-139, 1999.

FERRARIS CJ (2003) Subfamily Loricariinae (Armored catfishes). In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America (Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, orgs.); EDIPURCS, p 330-350, Porto Alegre, RS.

FERRARIS CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform types, **Zootaxa**, 1418:p. 1-628, 2007.

FEUNG, C. S.; YENNE, S. P. Fipronil: Aerobic Aquatic Metabolism. Rhône-Poulenc Agricultural Limited, 1997. Data Package ID N° 169043. DPR Document N°52062-180.

FINK S.V., FINK W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: Interrelationships of fishes (Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD eds.). Academic Press, 209-49, 1996.

FUJIOKA Y, MATSUOKA S, BAN T, NOMA A. Interaction of the Na⁺-K⁺ pump and Na⁺-Ca²⁺ exchange via [Na⁺]_i in a restricted space of guinea-pig ventricular cells. **J Physiol.**, ;v. 509(Pt 2): p. 457-70,1998.

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

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Fundamentos da Psicofarmacologia. Editora Atheneu: São Paulo- SP, 2001.

GUNASEKARA, A. S., TROUNG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of Fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32 (3): 189-199, 2007.

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.

HAINZL, D.; CASIDA, J.E. (1996) fipronil Insecticide: Novel Photochemical Desulfinylation with retention of Neurotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences: Agricultural Sciences. 93 12764-12767.

HAJDU, S. Mechanism of the Wood worth staircase phenomenon in heart and skeletal muscle. **Am. J. Physiology.**, v. 216, n. 1, p. 206-214, 1969.

HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and Hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 39, p. 60–76, 1998.

HAVERINEN, J., VORNANEN, M. Effects of deltamethrin on excitability and contractility of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 159, p. 1–9, 2014.

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

HILLMAN, S.S. Cardiovascular correlates of maximal oxygen consumption rates in anuran amphibians. **J Com Physiol** ., v. 109, p. 199–207, 1976.

HILLMAN S.S., WITHERS P.C., HEDRICK M.S., KIMMEL P.B. The effects of erythrocythemia on blood viscosity, maximal systemic oxygen transport capacity and maximal rates of oxygen consumption in an amphibian. **J Com Physiol.**, v. 155, p. 577–581, 1985.

HOLLY, T. A. et al., Caspase Inhibition Reduces Myocyte Cell Death Induced by Myocardial Ischemia and Reperfusion *In Vivo*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 31, p. 1709–1715, 1999.

HOVE-MADSEN, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and force-frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. **Journal of Exp. Biol**, v. 167, p. 47-60, 1992. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1709–1715 ,1999.

HOVE-MADSEN, L., LLACH, A., TORT, L. Na⁺/Ca²⁺-exchange activity regulates contraction and SR Ca²⁺ content in rainbow trout atrial myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. 1856-1864, 2000.

HOVE-MADSEN, L., LLACH, A., TORT, L. Quantification of Ca²⁺ uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 44, p. 2070-2080, 1998.

ISHIDA, H. et al., Opening of Mitochondrial K_{ATP} Channels Attenuates the Ouabain-Induced Calcium Overload in Mitochondria. **Circulatoin Research**, v. 89, p. 856-858, Out de 2001.

JOHANSEN, K.; BURGGREN, W.W. Cardiovascular function in the lower vertebrates. In *Hearts and Heart-like Organs*, Vol. 1 (ed. G. H. Bourne), New York: Academic Press. pp. 61-117, 1980.

JONES, L.R. et al. Ryanodine-induced stimulation of net Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Pharmacol. Epx. Ther.**, v. 209, n.1, p. 48-55, 1979.

JORGENSON, J.L. Aldrin and dieldrin: a review of research on production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, p. 113-139, 2001.

KANNEL, W.B; GORDON, T.; OFFUTT, D. Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. **Ann, Intern. Med.**, v. 71, p. 89-105, 1969.

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 a kip jack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **Canadian of Journal Zoology**, v. 70, p. 1211-1217, 1992.

KIDD, H; JAMES, D. The agrochemicals handbook. Cambridge, 3 th ed. Royal Society of Chemistry Information Services, U.K., 1991.

LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M., MORRISSETTE, J. M., BLANK, J. M., BLOCK, B. A. Temperature dependence of the Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in the ventricles of tuna and mackerel. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 286, p. R398–R404, 2004.

LEE, C. O. 1985. 200 years of digitalis: the emerging central role of the sodium ion in the control of cardiac force. **American Journal of Physiology**, v. 249, p. C367-C378, 1985.

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

LEVI, A.J.; K. SPITZER, W., KOHMOTO, O.; BRIDGE, J.H. Depolarization-induced Ca²⁺ entry via Na–Ca exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 266, p. 1422–1433, 1994.

LEVY, D.; GARRISON, R.J.; SAVAGE, D.D.; KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, p. 1561-55, 1990.

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

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 43-49, 1998.

MANRIQUE, WILSON GÓMEZ. Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guaru (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. 2009. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Jaboticabal.

MASUTI, C.S.M; MERMUT, A.R. Degradation of fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. Part B. 42, p. 33-43, 2007.

MASUTI, C.S.M; MERMUT, A.R. Sorption of fipronil and its sulfide derivative by soils and goethite. **Geoderma**, v. 140 (1-2), p. 01-07, 2007.

MATIKAINEN, N.;VORNANEN, M. Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. **J. Exp. Boil.**, v. 167, p. 203-220, 1992.

MEHROTRA, B. D. et al., Effects of cyclodiene compounds on calcium pump activity in rat brain and heart. **Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 17-29, 1989.

MING-HU, H., YING, L., XIONG-LI, Y., Desensitizing GABAC receptors on carp retinal bipolar cells. **Neuroreport**, v. 8, n. 6, p. 1331-1335, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Estatística. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>>. Acesso em: 30/06/2014.

MONTEIRO, D. A. Impacto de diferentes vias de contaminação por mercúrio inorgânico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, a função cardio-respiratória e o potencial de bioconcentração e biomagnificação em matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e em traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2011.

MULLINS, L. J. The generation of electric currents in cardiac fibers by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. **Am. J. Physiol.**, v. 236, p. 103–110, 1979.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J.A.; RESGALLA Jr. C. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Pesticidas: Rev. Ecotox. Meio Amb.**, v.16, p.93–100, 2007.

NARAHASHI, T. et al. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Human and Experimental Toxicology**. v. 26, p. 361-366, 2007.

NARAHASHI, T. Nerve membrane ion channels as the target site of environmental toxicants. **Environ. Health Perspect.**, v. 71, p. 25-29, 1987.

NECKÁR, J. et al. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC–delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 288: H1566–H1572, 2005.

NELSON S.J. Editorial and introduction: the species concept in fish biology. **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 9; p. 277-280, 2006.

NELSON J. A., RIOS F. S., SANCHES, J. R., FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T. Environmental influences on the respiratory and gut chemistry of a facultatively air-breathing, tropical herbivorous fish, *Hypostomus regalis* (Ihering, 1905). **Fish Respiration and Environment**. Universidade da Califórnia, Science Publishers, 2007., p. 191-217.

NETO, A.J.S.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.

NIMMO, D.R. Pesticides. Pesticides. In: RAND, G.M., PETROCELLI, S.R., (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. New York: Hemisphere, p.335-373, 1985.

OHI, M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J. M. ; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 121-127, 2004.

OLLE, C. D. Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600Br[®]) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo Matrinxã, *Brycon cephalus*. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, 2007.

OLLE, C.D. Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR[®]) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus*. 2007. 130 p. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

OLLE, C.D. Função cardíaca do teleósteo *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) submetido a diferentes condições térmicas. São Carlos, SP, 2003. 94p. Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos.

OYAKAWA, O.T.; AKAMA, A.; ZANATA, A.M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa.**, v. 921, p. 1-27, 2005.

PAANAJEN, V., VORNANEN, M. Effects of Chronic Hypoxia on Inward Rectifier K⁺ Current (I_{K1}) in Ventricular Myocytes of Crucian Carp (*Carassius carassius*) Heart. **The Journal of Membrane Biology**, v. 194, p. 119–127, 2003.

PALTY, R.; OHANA, E.; HERSHFINKEL, M.; VOLOKITA, M.; ELGAZAR, V.; BEHARIER, O.; SILVERMAN, W.F.; ARGAMAN, M.; SEKLER, I. Lithium-Calcium Exchange Is Mediated by a Distinct Potassium-independent Sodium-Calcium Exchanger. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, Inc. Vol. 279, No. 24, June 11, pp. 25234–25240, 2004

PEACOCK, W. F., MORAN, N. C. Influence of Thyroid State on Positive Inotropic Effect of Ouabain on Isolated Rat Ventricle Strips. **Exp Biol Med**, v. 113, 1963.

PERET, A. M. Quantificação do pesticida fipronil em uma lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu e a cinética de sua degradação por microrganismos aquáticos. 2009. 104f. (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

PERET, A. M.; OLIVEIRA, L. F.; BIANCHINI JR., I.; SELEGHIM, M. H. R.; PERET, A. C., MOZETO, A. A. Dynamics of fipronil in Óleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo-Brazil. **Chemosphere**, v. 78, p. 1225 – 1229, 2010.

PIMENTEL, D., LEVITAM, L. Pesticide: amounts applied and amounts reaching plants. **BioScience**, v. 36, p. 86-91, 1986.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; JANIS, C.M.. A Vida dos Vertebrados. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.

RAHEJA, G., GILL, K.D. Calcium homeostasis and dichlorvos induced neurotoxicity in rat brain. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 232, p. 13-18, 2002.

RAMSDORF, WANESSA. Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes.2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

RAND, G.M. Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment, 2^a ed. New York-NY. Taylor e Francis, p. 1124, 1995.

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.

RATRA, G.S., CASIDA, J.E. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. **Toxicology Letters**, vol. 122, p. 215-222, 2001.

RAYMOND-DELPECH, V. et al. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. **Invertebr. Neurosci.**, v. 5, p. 119-133, 2005.

RAYTON, M.; AAJOU, A.; WILLISON, J. C.; AOUADI, H.; TISSUT, M.; RAYANEL, P.; Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n.13, p. 4151-4157, 2006.

REINECKE H., VETTER R., DREXLER H. Effects of alpha-adrenergic stimulation on the sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺exchanger in adult rat ventricular cardiocytes. **Cardiovasc. Res**, v. 36, p. 216-222, 1997.

RISSATO, S.R. et al. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). *Quim. Nova*, v. 27, p. 739-743, 2004.

RIVAROLI, L. Respostas cronotrópicas e inotrópicas do miocárdio ventricular de três espécies de peixes tropicais ecologicamente distintas: Curimbatá, *Prochilodus lineatus*; Traíra, *Hoplias malabaricus*; e Cascudo, *Hypostomus regani*. 91f. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

RIVAROLI, L. avaliação da função cardíaca do teleósteo neotropical matrinxã, *Brycon amazonicus*: uma análise mecânica e biomolecular. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

RIVAROLI, L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimbata, *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae) and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei:Erythrinidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 145A, p. 322-327, 2006.

ROCHA, M. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Importance of the sarcoplasmic reticulum and adrenergic stimulation on the cardiac contractility of the neotropical teleosts *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions. **J. Comp. Physiol.**, v. 177B, p. 713-721, 2007.

ROLFE, D.F.S., BROWN, G.C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 731–758, 1997.

ROUSSEAU, E.; SMITH, J.S.; SULLIVAN, L. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca²⁺ release channel. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. 364-368, 1987.

RUCH, S. T., NISHIO, M., WASSERSTROM, J. A., Effect of Cardiac Glycosides on Action Potential Characteristics and Contractility in Cat Ventricular Myocytes: Role of Calcium

Overload. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 307, p. 419–428, 2003.

SANTER, R. M. Morphology and innervation of the fish heart. **Anat. Embryol. Cell. Biol.**, v. 89, p.1-102, 1985.

SANTER, R.M., COBB, J.L. The fine structure of the heart of the teleost, *Pleuronectes platessa* L. **Z Zellforsch Mikrosk Anat.**,v. 131, p. 1-14, 1972.

SCHRAMM, M., KLIEBER, H.-G., DAUT, J. The energy expenditure of actomyocytosin-ATPase, Ca²⁺-ATPase and Na⁺ K⁺ ATPase in guinea pig cardiac ventricular myocytes. **J. Physiol.**, v. 481, p. 647–662, 1994.

SCHWARTZ A, GRUPP G, WALLICK E, et al. Role of the Na⁺/K⁺ ATPase in the cardiotoxic action of cardiac glycosides. **Prog Clin Biol Res.**, v. 268, p. 321–38, 1998.

SETTI, A. A. Diagnóstico sobre a situação dos mananciais dos 20 municípios selecionados dos Estados do Acre, Pará, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás e Proposta de Estruturação do Programa de Preservação e Conservação de Mananciais. Relatório Técnico: PNMA, Contrato nº96/9596, 1998. 383p.

SHIELS, H.A., FARREL, A.P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing Ca²⁺ to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 1607-1621, 1997.

SHIELS, H.A., FARRELL, A.P. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from Pacific mackerel (*Scomber japonicus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 125, p. 331-341, 2000.

SHIELS, H.A., FREUND, E.V., FARREL, A.P., BLOCK, B.A. The sarcoplasmic reticulum plays a medial role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p. 881-890, 1999.

SHIELS, H.A., VORNANEN, M., FARREL, A.P. Temperature-dependence of L-type Ca^{2+} channel current in atrial myocytes from rainbow trout. **The J. of Exp. Biol.**, v.203, p. 2771-2780, 2000.

SHIELS, H.A., VORNANEN, M., FARRELL, A.P. The force–frequency relationship in fish hearts - A review. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132(A), p. 811-826, 2002.

SHIELS, H.A.; WHITE, E. Temporal and spatial properties of cellular Ca^{2+} flux in trout ventricular myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 288, p. R1756 -R1766, 2005

STEHR, C. M.; LIMBO, T.; INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. **Toxi. Sci.**, v. 92, n.1, p.270-278, 2006.

STEVENS, M.M; HELLIWELL, S.;WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, v. 57, n. 2, p. 195–207, 1998.

STUDER, R., et al., Gene expression of the cardiac $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchanger in end-stage human heart failure. **Circulation Research**., v. 75,p. 443-453, 1994.

SUBRAMANI, S.; BALAKRISHNAN, S.; JYOTI, T.; SATHISHKUMAR, S.; MOHAMMED, A.A.; ARASAN, S.; VIJAYANAND, C. Force–frequency relation in frog-ventricle is dependent on the direction of sodium/calcium exchange in diastole. **Acta Physiologica Scandinavica**, v 185, n 3, p. 193–202, 2005.

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

THOMAZ, J.M.; MARTINS, N.D.; MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Cardiorespiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON). **Ecotoxicology and environmental safety**; v. 72(5), p. 1413-24, 2009.

TIBBITS, G.F., HOVE-MADSON, 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.

TITU, V., VORNANEN, M. Cold adaptation suppresses the contractility of both atrial and ventricular muscle of the crucian carp heart. **J. Fish Biol.**, v. 59, p. 141–156, 2001.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, p. 135-142, 2002.

VAKILI, B.A.; OKIN, P.M.; DEVEREUX, R.B. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. **Am. Heart J.**, v. 41, p. 334-41, 2001.

VORNANEN, M. Effect of extracellular calcium on the contractility of warm and cold-acclimated crucian carp heart. **J. Comp. Physiol.**, v. 165B, p. 507-517, 1996.

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.

VORNANEN, M. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in ventricular myocytes of fish heart: Contribution to sarcolemmal Ca^{2+} influx. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p. 1763-1775, 1999.

VORNANEN, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 94, n. 2, p. 477-483, 1989.

VORNANEN, M. Sarcolemmal Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 41, p. 1432-1440, 1997.

VORNANEN, M., SHEPHERD, N., ISENBERG, G. Tension-voltage relations of single myocytes reflect Ca release triggered by Na/Ca exchange at 35 °C but not 23 °C. **Am. J. Physiol**, v. 267, p. C623-C632, 1994

VORNANEN, M.; SHIELS, H. A.; FARRELL, A. P. Plaslasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132, p. 827-846, 2002.

WALDEMARIN, K.C.A.; ALVEZ, R.N.; BELETTI, M.E.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Copper sulfate affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cardiomyocytes structure and contractile function. **Ecotoxicology**, v. 21, p 783-794, 2012.

WALSE, S. S.; PENNINGTON, P. L.; SCOTT, G. I.; FERRY, J. L. The fate of fipronil in a modular estuarine mesocosm. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 6, p. 58-64, 2004.

WEBER, C. Subfamily Hypostominae. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Ed. Edipucrs, 2003, 729 p.

WIER, W.G. Cytoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. **Annual. Rev. Physiol.**, v. 52, p. 467-485, 1990.

WIKMAN-COFFELT, J.; KAMIYAMA, T.; SALEL, A.F.; MASON, D.T. Differential responses of canine myosin ATPase activity and tissue gases in the pressure-overloaded ventricle dependent upon degree of obstruction: Mild versus severe pulmonic and aortic stenosis. **Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism**, v. 12, p. 367-372, 1979.

WINSLOW, R., et al., Mechanisms of Altered Excitation-Contraction Coupling in Canine Tachycardia-Induced Heart Failure, II: Model Studies. **Circulation Research**, v. 84, p. 571-586, 1999.

WIRTH, E.F.; PENNINGTON, P.L., LAWTON, J.C., DELORENZO, M.E., BEARDEN, D.; SHADDRIX, B., SIVERTSEN, S., FULTON, M.H. The Effects of contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. **Environmental Pollution**, v. 131, p. 365-371, 2004.

WUYTACK, F., RAEYMAEKERS, L., MISSIAEN, L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. **Cell Calcium**, v. 32, p. 279-305, 2002.

YING, G.G.; KOOKANA, R. S. Sorption of fipronil and its metabolites on soils from south Australia. **Journal of Environmental Science Health**, v. 36, p. 545-558, 2001.

YUE, D.T. Intracellular $[Ca^{2+}]$ related to rate of force development in twitch contraction of heart. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. 760-770, 1987.

ZACIKOVA, L.; KVETNANSKY, R.; KRIZANOVA, O. Increased expression of the Na^+/Ca^{2+} exchanger in the rat heart after immobilization stress is not induced by cortisol. **FEBS Letters**, v. 457, n. 3, p. 423–428, 1999.

Zawadzki, C.H.; Weber, C.; Pavanelli, C.S. A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 8 (4), p. 719-725, 2010.

ZHAO, X., YEH, J.Z., SALGADO, V.L., NARAHASHI, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, p. 192–201, 2004.

ZHOU-PEI, Lu Yitong, LIU BAOFENG, JAY GAN. Dynamics of fipronil in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v. 57, p. 1691-1696, 2004.

ZHU, G., WU, H., GUO, J., KIMARO, F. M. E. 2004. Microbial degradation of fipronil in clay loam soils. **Water Air Soil Pollution**, v. 153, p. 35-44, 2004.

ZILBERMAN, I. Introdução à engenharia ambiental. Canoas: ULBRA, 1997. 103 p.