

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

**O REFLEXO BAROSTÁTICO EM TELEÓSTEOS: CONTROLE  
CARDIORRESPIRATÓRIO, INFLUÊNCIA DO HABITAT E PADRONIZAÇÃO DO  
MÉTODO DA SEQUÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DO GANHO BARORREFLEXO**

**VINICIUS ARAÚJO ARMELIN**

**SÃO CARLOS – SP**  
**2019**

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

**O REFLEXO BAROSTÁTICO EM TELEÓSTEOS: CONTROLE  
CARDIORRESPIRATÓRIO, INFLUÊNCIA DO HABITAT E PADRONIZAÇÃO DO  
MÉTODO DA SEQUÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DO GANHO BARORREFLEXO**

**VINICIUS ARAÚJO ARMELIN**

**Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo  
Coorientador: Prof. Dr. Tobias Wang Nielsen**



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Vinicius Araújo Armelin, realizada em 18/03/2019:

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo  
UNESP

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin  
UFSCar

---

Prof. Dr. Claudia Regina Bonini Domingos  
UNESP

---

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro  
UFSCar

---

Prof. Dr. Wilfried Klein  
USP

*Aos meus pais, Cláudio e Vigoneti,  
e ao meu irmão, Leonardo, dedico  
esse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu prezado amigo e orientador, Luiz Henrique Florindo, por toda a confiança, ensinamentos, incentivo, liberdade e todas as oportunidades concedidas desde minha graduação.*

*Ao meu também amigo e coorientador, Tobias Wang, por todo o acolhimento, ensinamentos e experiências escandinavas proporcionadas. More akvavit and Carlsberg, please!... Skål!*

*Aos professores do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fisiologia Comparada, pelos incríveis cursos ministrados e organizados que tanto acrescentaram em minha formação. Ana Kalinin, André Cruz, Augusto Abe, Bill Milsom, Cléo Leite, Dane Crossley, David McKenzie, Diana Monteiro, José Eduardo de Carvalho, Kênia Bicego, Luciane Gargaglioni, Tadeu Rantin, Ted Taylor e Wilfried Klein.*

*Aos colegas do Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Elinton Vasconcelos, Felipe Blasco, Lucas Zena, Luís Gustavo Patrone, Nathan Martins, Rafael “Z”, Renato Filogonio, Thiago Belão e Vivian Zeraik. Agradecimentos estendidos também aos membros do Conselho de Pós-graduação e ao Alexandre, por todos os serviços prestados durante esses anos.*

*Aos amigos Catherine Williams, Charlie Hewitt, Lauren James, Mikkel Thomsen e Nino Praisler, por todas as aventuras vividas no Reino da Dinamarca.*

*Aos amigos e companheiros do laboratório, pelo convívio e incondicional parceria – tanto quanto pelo frequente acolhimento e por todas as risadas nessa última década. Aline Frushio, Amanda Silva, Ariela Crestani, Bianca Morrison, Carlos Sousa, Gabrielle Pimentel, Igor Noll, Isadora Anello, João Vitor Quatroqui, Leonardo Sanches, Mariana Teixeira, Natalia Troiano e Victor Braga.*

*Ao meu sempre amigo e companheiro Willian Barberino, pelo incondicional apoio, compreensão e paciência – assim como por todas as experiências intensamente compartilhadas.*

*Aos amigos Alice Araújo, Ana Gauy, Cássio Souza, Felipe Dorigão, Gisele Carrocini, Ivã Guidini, Kaio Alevi, Lara Fanali, Larissa Venâncio, Lidianne Torres, Luís Felipe Valêncio, Maitê Oliva, Marcela Bolognesi, Patrícia Masuno, Poatan Pinoti, Rafael Graciani, Renan Oliveira, Rodolfo Pelinson, Rogério Botion e Yuri Grandinete, por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, tanto no país quanto no exterior (Processo DS 001 e PDSE 88881.133009/2016-01). E também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da presente pesquisa (Processo Conjunto 08/57712-4).*

*A todos aqui não citados, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional nesses quatro anos de doutoramento.*

*Sobre o ombro de gigantes...*

→ *August Krogh*

↳ *Per Scholander*

↳ *Kjell Johansen*

↳ *Tadeu Rantin*

↳ *Luiz Florindo*

↳ *Vinicius Armelin*



*“Para cada problema em fisiologia existe  
um animal modelo adequado ao seu estudo”*

*Schack August Steenberg Krogh*

## RESUMO GERAL

A regulação da pressão arterial ( $P_A$ ) pelo reflexo barostático é uma condição *sine qua non* para a manutenção de um suprimento sanguíneo tecidual adequado e para a prevenção de lesões orgânicas na maioria dos vertebrados. Os peixes, assim como os demais gnatostomados, controlam a  $P_A$  por meio de ajustes na frequência cardíaca e na resistência vascular sistêmica – promovendo alterações nessas variáveis inversamente proporcionais às alterações ocorridas na  $P_A$ . Concomitantemente a esses ajustes, alguns vertebrados tetrápodes também apresentam ajustes ventilatórios inversamente proporcionais às alterações pressóricas, supostamente para ampliar as trocas gasosas na superfície respiratória desses animais. Entretanto, se respostas reflexas ventilatórias baseadas na  $P_A$  ocorrem ou não em teleósteos permanece uma questão a ser elucidada. Ademais, apesar das incontáveis evidências acerca da presença de respostas barorreflexas cardiovasculares em teleósteos, nenhuma descrição ampla e robusta desses ajustes foi realizada nesse grupo de vertebrados até os dias atuais. Nesse cenário, o presente trabalho objetivou: (1) verificar a existência do controle barorreflexo da ventilação em teleósteos; (2) realizar a primeira descrição ampla e robusta da função barorreflexa cardíaca de teleósteos, colocando-a em perspectiva com outras espécies de diferentes habitats, com ênfase na influência da terrestrialidade na evolução do reflexo barorreceptor; e (3) validar e padronizar um método alternativo-complementar para avaliação da sensibilidade barorreflexa em teleósteos, menos invasivo que o método farmacológico que constitui o paradigma atual. Para atingir o primeiro objetivo, foram realizadas manipulações farmacológicas na  $P_A$  para avaliação das respostas barorreflexas cardíacas e possivelmente ventilatórias no teleósteo de respiração bimodal *Pangasianodon hypophthalmus*. Para atingir o segundo objetivo, o mesmo método de manipulações farmacológicas na  $P_A$  foi realizado para avaliação das respostas barorreflexas cardíacas em teleósteos de habitats aquáticos (*Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus* – incapazes de realizar incursões terrestres) e anfíbios (*Clarias gariepinus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* – capazes de realizar incursões terrestres). Finalmente, para atingir o terceiro objetivo, o método farmacológico para avaliação da função barorreflexa cardíaca utilizado para completar os dois primeiros objetivos foi empregado em *H. malabaricus* e *O. niloticus*, assim como o método alternativo-complementar não-farmacológico denominado “Método da Sequência”, para validação e padronização desse último. Os resultados demonstraram que: (1) diferentemente de tetrápodes, o teleósteo *P. hypophthalmus* não apresenta um componente respiratório no reflexo barostático, sugerindo que o controle barorreflexo da ventilação evoluiu há menos de 450 milhões de anos, após a dicotomia Actinopterygii-Sarcopterygii; (2) teleósteos apresentam um barorreflexo cardíaco similar e tão responsivo quanto o de tetrápodes, adicionalmente, teleósteos capazes de realizar incursões terrestres (*C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*) apresentam maior sensibilidade barorreflexa e capacidade de responder à hipotensão arterial que teleósteos estritamente aquáticos (*H. malabaricus* e *O. niloticus*), sugerindo que a terrestrialidade representa uma importante força motriz na evolução da regulação pressórica barorreflexa em vertebrados; e (3) o Método da Sequência fornece estimativas confiáveis da sensibilidade barorreflexa em teleósteos, fornecendo resultados similares ao paradigma de avaliação farmacológica, constituindo um importante método alternativo ou complementar para avaliação da função barorreflexa nesses animais.

**Palavras-chave:** Barorreceptores. Fenilefrina. Método da Sequência. Método de Oxford. Nitroprussiato de sódio. Pressão arterial. Terrestrialidade.

## GENERAL ABSTRACT

The regulation of arterial blood pressure by the baroreflex is a *sine qua non* condition for the maintenance of adequate tissue perfusion and for the prevention of organic lesions in most vertebrates. Fish, as well as other gnathostomates, regulate  $P_A$  by adjusting heart rate and systemic vascular resistance, altering these variables in a manner inversely proportional to changes in  $P_A$ . Concomitantly to these cardiovascular adjustments, some tetrapods also exhibit ventilatory adjustments inversely proportional to changes in  $P_A$ , supposedly to enhance gas exchange in these animals' respiratory surface. However, whether such ventilatory reflex responses based on  $P_A$  occur in teleosts remains to be elucidated. In addition, despite the countless evidences on the presence of cardiovascular baroreflex responses in teleosts, no broad and robust description of these adjustments was performed in these animals. In this context, the present study aimed to: (1) verify the existence of baroreflex control of ventilation in teleosts; (2) perform the first broad and robust description of the baroreflex control of heart rate in teleosts, putting it in perspective with other species of different habitats, with emphasis on the influence of terrestriality on the evolution of the baroreceptor reflex; and (3) validate and standardize an alternative-complementary method for evaluating baroreflex sensitivity in teleosts, which is less invasive than the pharmacological method that constitutes the current paradigm for this task. To achieve the first objective, pharmacological manipulations of  $P_A$  were performed in order to allow the evaluation of cardiac and possibly ventilatory baroreflex responses in the teleost with bimodal respiration *Pangasianodon hypophthalmus*. To achieve the second objective, identical pharmacological manipulations of  $P_A$  were used to evaluate the cardiac baroreflex in exclusively aquatic teleosts (*Hoplias malabaricus* and *Oreochromis niloticus* – incapable of conducting terrestrial incursions) and amphibian teleosts (*Clarias gariepinus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus* – capable of conducting terrestrial incursions). Finally, in order to reach the third objective, the pharmacological method for evaluation of cardiac baroreflex used to complete the previous objectives was employed in *H. malabaricus* and *O. niloticus*, as well as the alternative-complementary non-pharmacological method called "Sequence Method", for validation and standardization of this new approach for use in teleosts. The results demonstrated that: (1) unlike tetrapods, the teleost *P. hypophthalmus* does not present a respiratory component in the barostatic reflex, suggesting that the baroreflex control of ventilation evolved less than 450 million years ago, after the Actinopterygii-Sarcopterygii separation; (2) teleosts have a baroreflex control of heart rate as responsive as that of tetrapods, in addition, teleosts that perform terrestrial incursions (*C. gariepinus* and *H. unitaeniatus*) present greater baroreflex sensitivity and capacity to respond to hypotension compared to strictly aquatic teleosts (*H. malabaricus* and *O. niloticus*), suggesting that terrestriality represents an important driving force for the evolution of a more sensitive baroreflex in vertebrates; and (3) the Sequence Method provides reliable estimates of baroreflex sensitivity in teleosts, providing results similar to that of the pharmacological method, constituting an important alternative or complementary method for evaluation of baroreflex function in these animals.

**Keywords:** Arterial blood pressure. Baroreceptors. Oxford Method. Phenylephrine. Sequence Method. Sodium nitroprusside. Terrestriality.



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1 – A PRESSÃO ARTERIAL E REFLEXO BAROSTÁTICO CARDIOVASCULAR.....	15
1.2 – O REFLEXO BAROSTÁTICO VENTILATÓRIO.....	19
1.3 – O REFLEXO BAROSTÁTICO EM TELEÓSTEOS.....	20
<b>2 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 2 – HAVERIA UM COMPONENTE RESPIRATÓRIO NO BARORREFLEXO DO TELEÓSTEO DE RESPIRAÇÃO BIMODAL <i>PANGASIANODON HYPOPHthalmus</i>? .....</b>	<b>27</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>28</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>29</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>30</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>32</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS.....</b>	<b>33</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
2.1 – OS ANIMAIS.....	36
2.2 – FÁRMACOS.....	36
2.3 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS.....	37
2.4 – AQUISIÇÃO DAS VARIÁVEIS CARDIORRESPIRATÓRIAS.....	38
2.5 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	39
2.6 – ANÁLISE DO BARORREFLEXO CARDÍACO E VENTILATÓRIO.....	39
2.7 – ESTATÍSTICA.....	41
<b>3 – RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 – CONTROLE BARORREFLEXO CARDÍACO E VENTILATÓRIO.....	41
3.2 – EFEITOS DA INFUSÃO DE VEÍCULO NAS VARIÁVEIS CARDIORRESPIRATÓRIAS..	47
3.3 – EFEITOS DOS FÁRMACOS VASOATIVOS APÓS BLOQUEIO AUTONÔMICO.....	47
<b>4 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>5 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

### **CAPÍTULO 3 – O REFLEXO BAROSTÁTICO EM TELEÓSTEOS DE DIFERENTES HABITATS:**

<b>A INFLUÊNCIA DA TERRESTRIALIDADE NA EVOLUÇÃO DO BARORREFLEXO .....</b>	<b>55</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>57</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>58</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>59</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>61</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
2.1 – OS ANIMAIS.....	65
2.2 – FÁRMACOS.....	66
2.3 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS.....	66
2.4 – AQUISIÇÃO DAS VARIÁVEIS CARDIOVASCULARES.....	67
2.5 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	67
2.6 – AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO CARDÍACO.....	68
2.7 – ESTATÍSTICA.....	70
<b>3 – RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
3.1 – CONTROLE BARORREFLEXO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	70
3.2 – EFEITOS DA INFUSÃO DE VEÍCULO NAS VARIÁVEIS CARDIOVASCULARES.....	75
3.3 – EFEITOS DOS FÁRMACOS VASOATIVOS APÓS BLOQUEIO AUTONÔMICO.....	75
<b>4 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
4.1 – O BARORREFLEXO CARDÍACO E O HABITAT EM VERTEBRADOS.....	76
4.2 – SÍTIO DE COLETA DA PRESSÃO ARTERIAL E O MÉTODO DE OXFORD.....	82
<b>5 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>

### **CAPÍTULO 4 – O USO DO MÉTODO DA SEQUÊNCIA COMO ESTRATÉGIA PARA**

<b>AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA EM TELEÓSTEOS .....</b>	<b>91</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>92</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>93</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>94</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>95</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS.....</b>	<b>96</b>

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>98</b>
2.1 – OS ANIMAIS.....	98
2.2 – FÁRMACOS.....	99
2.3 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS .....	99
2.4 – AQUISIÇÃO DAS VARIÁVEIS CARDIOVASCULARES.....	100
2.5 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	100
2.6 – ANÁLISE DO BARORREFLEXO POR MEIO DO MÉTODO DA SEQUÊNCIA ...	101
2.7 – ANÁLISE DO BARORREFLEXO POR MEIO DO MÉTODO DE OXFORD .....	103
2.8 – ESTATÍSTICA .....	104
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>4 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>117</b>
<b>1 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>118</b>

# **CAPÍTULO 1**

---

## **INTRODUÇÃO GERAL**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da relação entre a área de secção transversa vascular total (diretamente proporcional à resistência vascular) e a velocidade linear do fluxo sanguíneo (A), assim como da pressão sanguínea média em cada região da vasculatura sistêmica (B). Note que embora a área de secção transversal de um capilar individual seja diminuta, a ocorrência desse tipo de vaso no organismo é tão grande que sua área de secção transversa total é superior à de qualquer outro tipo de vaso. Fonte: adaptada de Hill et al. (2012) e Armelin (2015)..... 15
- Figura 2.** Esquema demonstrando as vias de retroalimentação do barorreflexo em situações de hipotensão e hipertensão arterial (A), e os efeitos das modificações da pressão arterial na taxa de disparo dos barorreceptores carotídeos de mamíferos (modo pelo qual esses receptores se comunicam com o sistema nervoso central) (B). DC: débito cardíaco; RVS: resistência vascular sistêmica; SNC: sistema nervoso central. Fonte: adaptada de Klabunde (2011) e Armelin (2015). ..... 16
- Figura 3.** Representações hipotéticas de curvas sigmóides descritoras do barorreflexo, que associam os valores da pressão arterial ( $P_A$ ) e da frequência cardíaca ( $f_H$ ) adquiridos anteriormente (ponto operante do barorreflexo; POB) e posteriormente administrações seriadas e crescentes de fármacos vasoativos que promovem hipertensão (fenilefrina; Fe) e hipotensão arterial (nitroprussiato de sódio; SNP). Note que a representação do primeiro exemplo (A) exhibe maior potencial regulatório para taquicardia barorreflexa (PRT) e menor potencial regulatório para bradicardia barorreflexa (PRB) que a representação no segundo exemplo (B). MÁX:  $f_H$  máxima atingida pelo barorreflexo; MÍN:  $f_H$  mínima atingida pelo barorreflexo;  $P_{A50}$ :  $P_A$  no centro da curva sigmóide, onde o ganho barorreflexo é máximo. Fonte: adaptada de Zena (2016)..... 18
- Figura 4.** Efeitos das alterações na pressão arterial média ( $P_A$  média) na frequência ventilatória ( $f_V$ ; A) e no volume corrente ( $V_C$ ; B) de *Rhinella schneideri* mantidos em 25°C e 35°C. Essa espécie apresenta uma  $P_A$  média basal de aproximadamente 4 kPa em ambas as temperaturas. Note o aumento e a redução nas variáveis ventilatórias durante situações de hipotensão e hipertensão, respectivamente. Fonte: adaptada de Zena et al. (2016b). ..... 19
- Figura 5.** Traçados originais da pressão arterial na artéria caudal ( $P_A$ ) e da pressão bucal ( $P_{\text{bucal}}$ ) do teleosteo *Piaractus mesopotamicus* denotando a sincronia cardiorrespiratória que ocorre nesses animais. As linhas verticais indicam o ponto de maior  $P_{\text{bucal}}$ , a qual é sempre concomitante com o início do aumento da  $P_A$  (que por sua vez representa a sístole ventricular). Fonte: adaptada de Leite et al. (2009). ..... 22

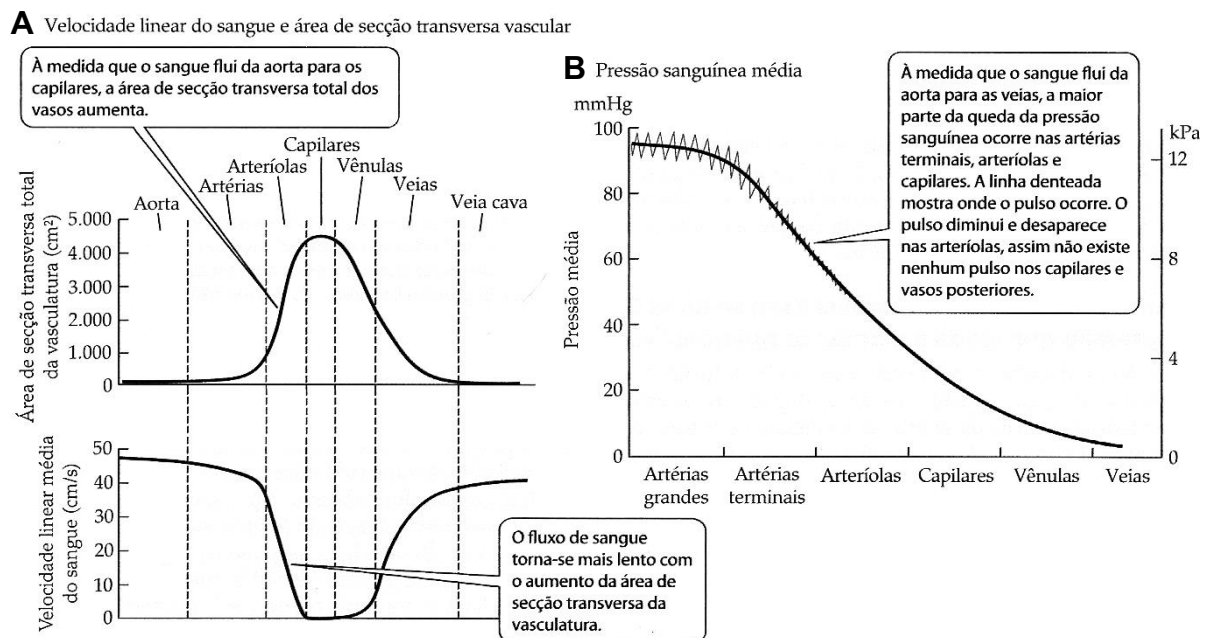
## LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS

$f_H$	Frequência cardíaca
<b>MÁX</b>	$f_H$ máxima atingida pelo barorreflexo
<b>MÍN</b>	$f_H$ mínima atingida pelo barorreflexo
$P_A$	Pressão arterial
$P_{A\ 50}$	$P_A$ no centro da curva sigmóide
<b>PRB</b>	Potencial regulatório para bradicardia barorreflexa
<b>PRT</b>	Potencial regulatório para taquicardia barorreflexa

## 1 – INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 – A PRESSÃO ARTERIAL E REFLEXO BAROSTÁTICO CARDIOVASCULAR

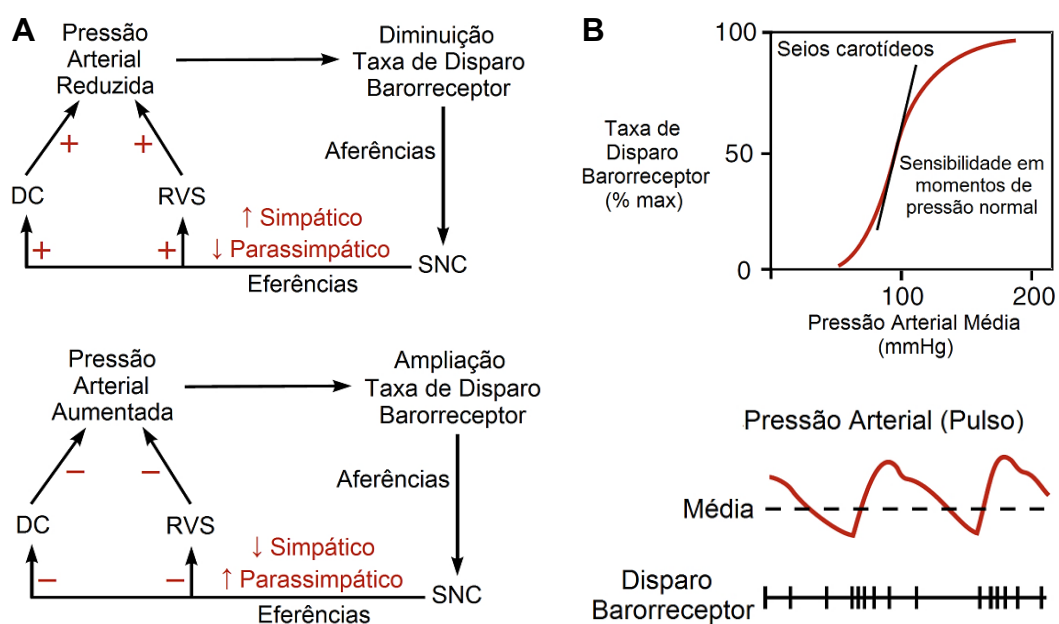
O sistema cardiovascular possui a fundamental função de suprir diversas necessidades dos tecidos corporais dos animais, promovendo trocas gasosas e transportando nutrientes, hormônios, metabólitos, agentes do sistema imune, entre outros fatores para todo o organismo. O transporte desses fatores ocorre por meio do sangue, um tecido conjuntivo líquido que circula pelos tecidos de um organismo através de vasos sanguíneos e tem sua propulsão determinada por um gradiente de pressão criado pelo coração. Nesse gradiente, observa-se uma pressão sanguínea maior nas artérias, a qual é reduzida progressivamente até valores próximos à zero nas veias devido à resistência vascular (Figura 1A, B; GUYTON E HALL, 2011; HILL et al., 2012).



**Figura 1.** Representação da relação entre a área de secção transversa vascular total (diretamente proporcional à resistência vascular) e a velocidade linear do fluxo sanguíneo (A), assim como da pressão sanguínea média em cada região da vasculatura sistêmica (B). Note que embora a área de secção transversal de um capilar individual seja diminuta, a ocorrência desse tipo de vaso no organismo é tão grande que sua área de secção transversa total é superior à de qualquer outro tipo de vaso. Fonte: adaptada de Hill et al. (2012) e Armelin (2015).

Para que a perfusão tecidual seja mantida, a pressão arterial ( $P_A$ ) deve ser elevada o suficiente para superar a resistência ao fluxo sanguíneo derivada de toda a vasculatura, assim como para sobrepujar a influência da atração gravitacional naqueles vasos em que o fluxo sanguíneo é ascendente. Porém, a  $P_A$  também deve ser reduzida o suficiente para prevenir edemas, rompimento de vasos sanguíneos e danos a órgãos sensíveis à hipertensão (como cérebro e rins) (BAGSHAW, 1985; SEYMOUR et al., 1993; VAN VLIET E WEST, 1994; GUYTON E HALL, 2011; CHAPLEAU, 2012). Naturalmente, tais demandas por valores pressóricos adequados, associadas às constantes perturbações nessa variável inerentes às atividades diárias dos animais, selecionaram importantes mecanismos reguladores da  $P_A$  ao longo da história evolutiva dos vertebrados (BAGSHAW, 1985).

O barorreflexo consiste no principal mecanismo de controle rápido da  $P_A$  na maioria vertebrados, atuando dentro de milissegundos a minutos, tal mecanismo tem início com o monitoramento da  $P_A$  por barorreceptores, os quais proveem constantemente informações sobre o estado dessa variável a regiões integradoras centrais por meio de conexões neurais aferentes. Qualquer aumento ou redução na  $P_A$  em relação a seu ponto de funcionamento normal promove respostas extremamente rápidas e inversamente proporcionais na frequência cardíaca ( $f_H$ ; regulando o débito cardíaco) e na resistência vascular sistêmica que tendem a restaurar a  $P_A$  (Figura 2A, B; BAGSHAW, 1985; DAMPNEY, 1994; VAN VLIET E WEST, 1994; KLABUNDE, 2011).



**Figura 2.** Esquema demonstrando as vias de retroalimentação do barorreflexo em situações de hipotensão e hipertensão arterial (A), e os efeitos das modificações da pressão arterial na taxa de disparo dos barorreceptores carotídeos de mamíferos (modo pelo qual esses receptores se comunicam com o sistema nervoso central) (B). DC: débito cardíaco; RVS: resistência vascular sistêmica; SNC: sistema nervoso central. Fonte: adaptada de Klabunde (2011) e Armelin (2015).

Os ajustes barorreflexos da  $f_H$  e da resistência vascular sistêmica são mediados pelas subdivisões simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo, que operam por meio da liberação de noradrenalina e acetilcolina em suas terminações nervosas, respectivamente (RANDALL et al., 2000). A taquicardia barorreflexa é gerada por uma ampliação na atividade simpática cardíaca aliada a uma redução na atividade parassimpática cardíaca, enquanto que a bradicardia barorreflexa é gerada por alterações autonômicas contrárias a essas (BAGSHAW et al., 1985; HEAD E MCCARTY, 1987; ALTIMIRAS et al., 1998; HAGENSEN et al., 2010). Similarmente, a vasoconstrição sistêmica barorreflexa é gerada por uma ampliação na atividade simpática vasomotora, enquanto que a vasodilatação sistêmica barorreflexa é gerada por uma redução na mesma (KLABUNDE, 2011).

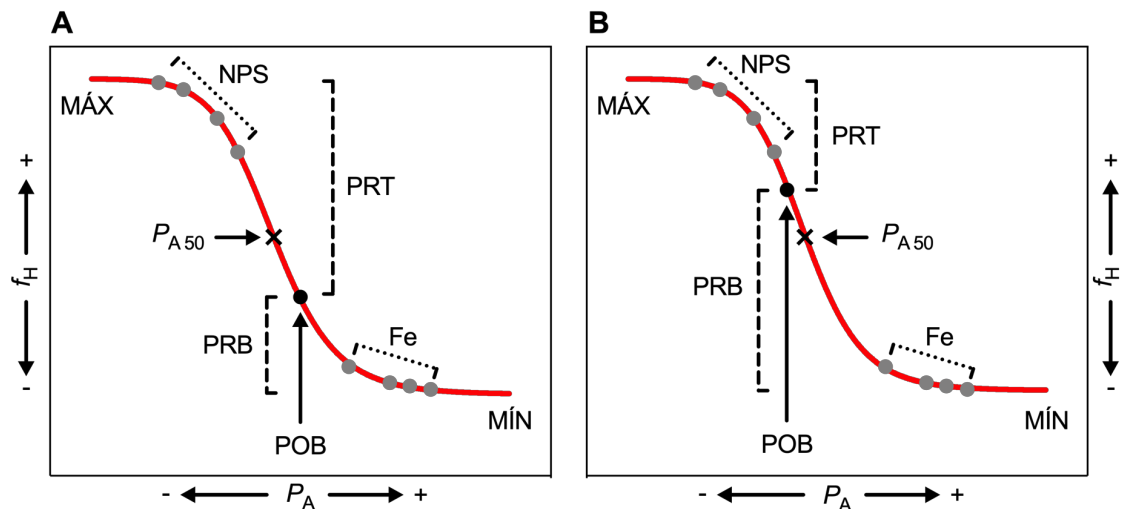


As respostas barorreflexas são desencadeadas especificamente pela interação dos neurotransmissores autonômicos com receptores específicos, particularmente os  $\alpha_1$ -adrenérgicos,  $\beta_1$ -adrenérgicos e os muscarínicos colinérgicos. Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos são encontrados na vasculatura sistêmica e quando estimulados pela noradrenalina promovem vasoconstrição. Já os receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos e muscarínicos colinérgicos são encontrados no coração, e quando estimulados pela noradrenalina e acetilcolina promovem taquicardia e bradicardia, respectivamente (RANDALL et al., 2000; RANG et al., 2016).

A função barorreflexa é comumente descrita por curvas sigmóides construídas utilizando os valores basais da  $P_A$  e da  $f_H$  dos animais (ponto operante do barorreflexo), assim como as respostas máximas dessas variáveis a administrações de fármacos vasoativos que promovem hipertensão e hipotensão arterial. Essas curvas descrevem exclusivamente a via cardíaca do barorreflexo, pois associam os valores da  $P_A$  com seus respectivos valores da  $f_H$ , de forma a retratar a relação estímulo-resposta existente entre essas variáveis e permitir a derivação de diversas informações acerca desse ajuste fisiológico, a saber: (1)  $f_H$  máxima atingida pelo barorreflexo (MÁX), referente à resposta cardíaca máxima à hipotensão; (2)  $f_H$  mínima atingida pelo barorreflexo (MÍN), referente à resposta cardíaca máxima à hipertensão; (3) faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$ , caracterizada pela diferença entre a MÁX e a MÍN; (4)  $P_A$  no centro da curva sigmóide ( $P_{A\ 50}$ ), a qual pode ou não coincidir com o ponto operante do barorreflexo e representa a circunstância cardiovascular em que a responsividade barorreflexa é máxima; (5) ganho barorreflexo, referente a magnitude da resposta na  $f_H$  por alteração unitária na  $P_A$ , também chamado de responsividade ou sensibilidade barorreflexa; (6) potencial regulatório para bradicardia barorreflexa (PRB), caracterizado pela diferença entre a  $f_H$  basal e a MÍN, referente à capacidade do organismo de responder à hipertensão; e (7) potencial regulatório para taquicardia barorreflexa (PRT), caracterizado pela diferença entre a  $f_H$  basal e a MÁX, referente à capacidade do organismo de responder à hipotensão (Figura 3A, B; KENT et al., 1972; REID, 1996; ALTIMIRAS et al., 1998; HEDRICK et al., 2015).

O agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina e o agente doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio são os fármacos mais utilizados para manipular a  $P_A$  e possibilitar a avaliação do reflexo barostático em diferentes vertebrados (HEAD E MCCARTY, 1987; REID, 1996; ALTIMIRAS et al., 1998; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b). A fenilefrina provoca uma vasoconstrição sistêmica por meio da estimulação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos vasculares, ao passo que o nitroprussiato de sódio provoca uma vasodilatação sistêmica por meio da liberação de moléculas de óxido nítrico que inativam cadeias de miosina pela via da guanilato ciclase endotelial (KLABUNDE, 2011; RANG et al., 2016). No entanto, manipulações

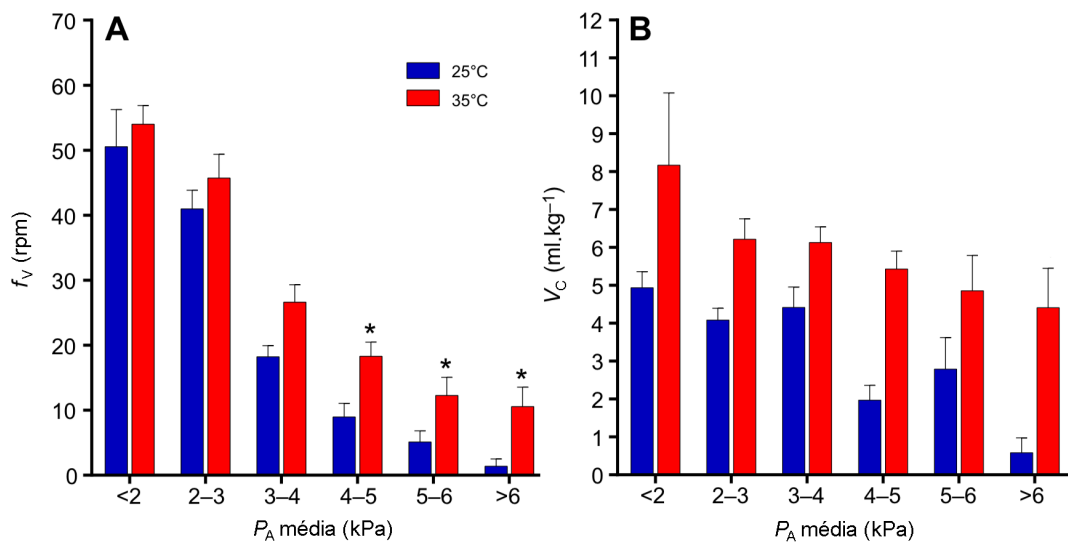
farmacológicas da  $P_A$  impedem a ocorrência da via vasomotora do barorreflexo, possivelmente sobrecarregando e superestimando a via cardíaca do barorreflexo (BERTINIERI et al., 1985).



Além de restringir a via vasomotora do barorreflexo, os fármacos vasoativos também podem exercer efeitos secundários diretos no sistema nervoso central e no nodo sinoatrial dos animais, o que pode influenciar os resultados finais (KLIMASCHEWSKI et al., 1992; ZENA et al., 2013). Por esses motivos, algumas investigações utilizam métodos mecânicos para gerar desequilíbrios pressóricos e possibilitar a avaliação da função barorreflexa, como alterações posturais súbitas do eixo horizontal para o eixo vertical (OGILVY E DUBOIS, 1982; LILLYWHITE, 1996), aplicação de pressão ou sucção em grandes artérias centrais (LUTZ E WYMAN, 1932; RISTORI, 1970; RISTORI E DESSAUX, 1970), e realização de bloqueios momentâneos do fluxo sanguíneo em grandes artérias centrais (SANDBLOM E AXELSSON, 2005). Porém, os métodos mecânicos tendem a ser altamente invasivos, e podem não alterar a  $P_A$  dos animais o suficiente para engatilhar a MÁX e o MÍN do barorreflexo – prejudicando a análise (FARRELL, 1986; ALTIMIRAS et al., 1998; SANDBLOM E AXELSSON, 2011). Dessa forma, na maioria das circunstâncias, o método farmacológico é considerado mais adequado e é mais amplamente empregado para a avaliação do reflexo barostático em vertebrados não-humanos (HEAD E MCCARTY, 1987; REID, 1996; ALTIMIRAS et al., 1998; CROSSLEY et al., 2003; HAGENSEN et al., 2010; SANDBLOM E AXELSSON, 2011; HEDRICK et al., 2015; SANDBLOM et al., 2016; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b).

## 1.2 – O REFLEXO BAROSTÁTICO VENTILATÓRIO

Concomitantemente às respostas barorreflexas cardíacas e vasomotoras, a estimulação e a desestimulação dos barorreceptores podem gerar respostas reflexas ventilatórias, as quais também consistem em respostas extremamente rápidas e inversamente proporcionais às mudanças ocorridas na  $P_A$  dos indivíduos (Figura 4A, B). Mesmo pouco compreendidas e investigadas, essas respostas barorreflexas ventilatórias já foram documentadas em mamíferos, crocodilianos e anfíbios (ALTIMIRAS et al., 1998; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; HEDRICK et al., 2013; ZENA et al., 2016b).



**Figura 4.** Efeitos das alterações na pressão arterial média ( $P_A$  média) na frequência ventilatória ( $f_v$ ; A) e no volume corrente ( $V_c$ ; B) de *Rhinella schneideri* mantidos em 25°C e 35°C. Essa espécie apresenta uma  $P_A$  média basal de aproximadamente 4 kPa em ambas as temperaturas. Note o aumento e a redução nas variáveis ventilatórias durante situações de hipotensão e hipertensão, respectivamente. Fonte: adaptada de Zena et al. (2016b).

Apesar disso, as reais influências das aferências barorreceptoras na ritmogênese respiratória dos animais já foram amplamente questionadas, principalmente por conta da possibilidade de as alterações ventilatórias observadas serem derivadas de efeitos secundários das oscilações pressóricas em quimiorreceptores. É sabido, por exemplo, que uma hipotensão arterial pode reduzir a perfusão sanguínea na superfície respiratória e na circulação sistêmica, prejudicando a oxigenação tecidual de forma a estimular quimiorreceptores e induzir uma hiperventilação quimiorreflexa (ALTIMIRAS et al., 1998; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b). Por outro lado, uma hipertensão arterial não é capaz de induzir uma hipoventilação quimiorreflexa porque a  $P_A$  elevada não altera a pressão parcial de oxigênio sanguínea e a oxigenação tecidual, assim, as inúmeras observações de hipoventilação após a indução de hipertensão arterial podem ser correlacionadas ao reflexo barorreceptor (MCMULLAN E PILOWSKY, 2010). Ademais, experimentos realizados em mamíferos cujos quimiorreceptores foram cirurgicamente inutilizados, constataram a presença tanto de uma

hiperventilação hipotensiva quanto de uma hipoventilação hipertensiva (BRUNNER et al., 1982; DOVE E KATONA, 1985; HOPP E SEAGARD, 1998; JUNG E KATONA, 1990), evidenciando que as aferências barorreceptoras *per se* engatilham respostas reflexas ventilatórias.

Atualmente, com exceção das aferências barorreceptoras, as vias de mediação do barorreflexo ventilatório são desconhecidas. Ao considerar que os centros neurais que coordenam a circulação e a ventilação são altamente integrados e estão em localizações adjacentes no sistema nervoso central, sugere-se que ambos são afetados pelas mesmas referências periféricas e centrais, gerando respostas cardiorrespiratórias consonantes às informações aferentes barorreceptoras (MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b). Ademais, a significância fisiológica dessas respostas orquestradas é tão obscura quanto suas vias de mediação. Especula-se que esse mecanismo amplie as trocas gasosas com o meio externo, especialmente em situações de hipotensão que reduzem o fluxo sanguíneo na superfície respiratória dos animais. No entanto, nenhuma evidência empírica sustenta essa hipótese e, devido a isso, alguns autores sugerem que as respostas baroventilatórias não apresentam relevância funcional em tetrápodes e simplesmente constituem um reflexo vestigial herdado de um ancestral comum provavelmente aquático – visto que a realização de trocas gasosas por meio da respiração aquática é menos eficiente em comparação com a respiração aérea (HUGHES E SHELTON, 1962; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; BAYLEY et al., 2019).

### 1.3 – O REFLEXO BAROSTÁTICO EM TELEÓSTEOS

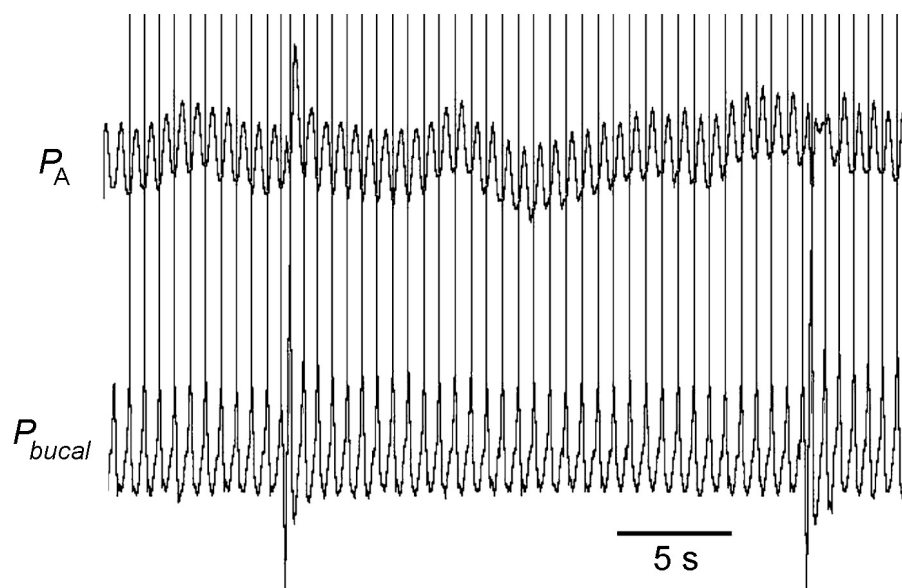
Há muito tempo sabe-se que o reflexo barostático cardíaco é uma característica presente em todos os vertebrados gnatostomados (BAGSHAW, 1985). A primeira evidência acerca da presença desse reflexo em teleósteos advém do estudo de McWilliam (1885), que reportou a ocorrência de uma bradicardia instantânea após estimulações elétricas, térmicas, químicas e mecânicas nas brânquias de *Anguilla anguilla*. Décadas depois, essas observações foram corroboradas e complementadas por Mott (1951), que aumentou artificialmente a  $P_A$  branquial de *A. anguilla* por meio de uma perfusão e verificou a ocorrência de uma bradicardia reflexa – assim como Ristori (1970) e Ristori e Dessaux (1970) observaram em *Cyprinus carpio*. Após, Randall e Stevens (1967) documentaram que uma administração intravenosa de adrenalina desencadeia uma elevação na  $P_A$  seguida de uma redução na  $f_H$  em *Oncorhynchus kisutch*. Finalmente, Wood e Shelton (1980) examinaram o processo inverso, e demonstraram que uma hipotensão arterial induzida por hemorragia ou por administração do antagonista  $\alpha$ -adrenérgico ioimbina desencadeia uma taquicardia reflexa em *Oncorhynchus mykiss*. Posteriormente, as constatações desses estudos pioneiros a respeito da proporcionalidade inversa entre a  $P_A$  e a  $f_H$

em teleósteos foram frequentemente reproduzidas (OLSON et al., 1981; OGILVY E DUBOIS, 1982; FARRELL, 1986; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; 2011; ARMELIN et al., 2016; SANDBLOM et al., 2016; SUNDELL et al., 2018).

Entretanto, quase a totalidade dos estudos supracitados versam apenas sobre as respostas barorreflexas cardíacas, negligenciando as respostas barorreflexas vasculares. Wood (1974) foi pioneiro na demonstração da capacidade de regulação vasomotora em teleósteos, verificando oscilações periódicas na  $P_A$  independentes da ventilação em *O. mykiss*, as quais foram completamente abolidas após uma administração do antagonista  $\alpha$ -adrenérgico ioimbina. Tais oscilações se assemelham às ondas de Mayer observadas em mamíferos, que refletem o funcionamento do sistema de retroalimentação negativa do barorreflexo no controle da  $P_A$  por meio da regulação da atividade da musculatura lisa vascular (HYNDMAN et al., 1971; BAGSHAW, 1985). Ogilvy e Dubois (1982) também proveram informações sobre a presença de respostas barorreflexas vasculares em teleósteos. Esses autores reportaram que, em situações de hipotensão prolongada, a espécie *Pomatomus saltatrix* exhibe elevações significativas na  $P_A$  mesmo após uma estabilização da taquicardia barorreflexa. Evidências mais contundentes foram documentadas por Sandblom e Axelsson (2005), os quais induziram uma hipotensão e uma hipertensão arterial nas regiões barorreceptoras de *O. mykiss* e verificaram que as mesmas foram acompanhadas de um aumento e uma redução na resistência vascular sistêmica, respectivamente. Contudo, nota-se que a via vasomotora do barorreflexo parece ser menos eficaz em ajustar a  $P_A$  durante situações de hipotensão em teleósteos do que em tetrápodes (LILLYWHITE E SEYMOUR, 1978; OGILVY E DUBOIS, 1982; BAGSHAW, 1985; LILLYWHITE, 1996).

Apesar dos dados atestando a presença do barorreflexo cardiovascular em teleósteos, os ajustes cardíacos que ocorrem frente aos desequilíbrios pressóricos nesses animais nunca foram adequadamente e completamente descritos. Até o momento, todos os estudos que objetivaram uma descrição ampla do barorreflexo cardíaco em teleósteos o fizeram utilizando o método farmacológico para indução de alterações na  $P_A$  associado à uma análise de regressão linear ao invés de uma análise de regressão logística sigmóide (FARRELL, 1986; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; 2011; ARMELIN et al., 2016; SANDBLOM et al., 2016; SUNDELL et al., 2018). Considerando que o barorreflexo apresenta limites em suas respostas cardíacas às alterações pressóricas (MÁX e MÍN), os quais não são equacionados em uma análise de regressão linear, pode-se concluir que tais descrições do reflexo barostático de teleósteos são pouco fidedignas e incompletas – pois não revelam o escopo dinâmico total desse ajuste fisiológico (MÁX, MÍN,  $P_{A50}$ , PRB e PRT) (KENT et al. 1972; HEAD E MCCARTY, 1987).

Com relação ao reflexo barostático ventilatório, é especulado que teleósteos também apresentam respostas reflexas na ventilação inversamente proporcionais às mudanças na  $P_A$  pelo fato de exibirem sincronia cardiorrespiratória (Figura 5; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010). Apesar da sincronia cardiorrespiratória não acontecer em determinadas circunstâncias (como durante hipóxia ambiental severa) (LEITE et al., 2009), o fato desses animais serem capazes de acoplar a frequência ventilatória à  $f_H$  torna concebível a previsão de que as variáveis ventilatórias acompanhariam tanto uma bradicardia barorreflexa hipertensiva quanto uma taquicardia barorreflexa hipotensiva nos mesmos (MCMULLAN E PILOWSKY, 2010). Todavia, tal questão permanece inexplorada, e caso as variáveis ventilatórias respondessem às alterações na frequência cardíaca independentemente da  $P_A$ , tal ajuste não poderia ser considerado um reflexo barorreceptor. Dessa forma, se teleósteos apresentam ou não um componente respiratório no barorreflexo permanece um enigma a ser elucidado.



**Figura 5.** Traçados originais da pressão arterial na artéria caudal ( $P_A$ ) e da pressão bucal ( $P_{buccal}$ ) do teleósteo *Piaractus mesopotamicus* denotando a sincronia cardiorrespiratória que ocorre nesses animais. As linhas verticais indicam o ponto de maior  $P_{buccal}$ , a qual é sempre concomitante com o início do aumento da  $P_A$  (que por sua vez representa a sístole ventricular). Fonte: adaptada de Leite et al. (2009).

Com base nas considerações expostas acima, o presente trabalho objetivou: (1) verificar a existência do controle barorreceptor da ventilação em teleósteos; (2) realizar a primeira descrição ampla e robusta da função barorreflexa cardíaca de teleósteos, colocando-a em perspectiva com outras espécies de diferentes habitats, com ênfase na influência da terrestrialidade na evolução do reflexo barorreceptor; e (3) validar e padronizar um método alternativo-complementar, menos invasivo que o método farmacológico para indução de alterações na  $P_A$ , para avaliação do ganho barorreflexo em teleósteos.

## 2 – REFERÊNCIAS

- ALTIMIRAS, J.; FRANKLIN, C. E.; AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2235-2242, 1998.
- ARMELIN, V. A. **Localização dos barorreceptores no tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei: Serrasalminae)**. 2015. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; TEIXEIRA, M. T.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L. Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Fish Biochemistry and Physiology**, v. 42, p. 1213-1224, 2016.
- BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60, p. 121-162, 1985.
- BAYLEY, M.; DAMSGAARD, C.; THOMSEN, M.; MALTE, H.; WANG, T. Learning to air-breathe: the first steps. **Physiology**, v. 34, p. 14-29, 2019.
- BERTINIERI, G.; DI RIENZO, M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U.; PEDOTTI, A.; MANCIA, G. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. **Journal of Hypertension**, v. 3, p. S79-S81, 1985.
- BRUNNER, M. J.; SUSSMAN, M. S.; GREENE, A. S.; KALLMAN, C. H.; SHOUKAS, A. A. Carotid sinus baroreceptor reflex control of respiration. **Circulation Research**, v. 51, p. 624-636, 1982.
- CHAPLEAU, M. W. Baroreceptor reflexes. In: ROBERTSON, D.; BIAGGIONI, I.; BURNSTOCK, G.; LOW, P. A.; PATON, J. F. R. (Eds.). **Primer on the Autonomic Nervous System**. Cambridge: Academic Press, 2012. p. 161-165.
- CROSSLEY II, D. A.; HICKS, J. W.; ALTIMIRAS, J. Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 2895-2902, 2003.
- DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 323-364, 1994.
- DOVE, E. L.; KATONA, P. G. Respiratory effects of brief baroreceptor stimuli in the anesthetized dog. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, p. 1258-1265, 1985.
- FARRELL, A. P. Cardiovascular responses in the sea raven, *Hemitripterus americanus*, elicited by vascular compression. **Journal of Experimental Biology**, v. 122, p. 65-80, 1986.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. A Circulação. In: \_\_\_\_\_. (Eds.). **Tratado de Fisiologia Médica**. Décima Segunda Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 165-297.
- HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 458-462, 2010.

- HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 21, p. 203-213, 1987.
- HEDRICK, M. S.; HILLMAN, S. S.; DREWES, R. C.; WITHERS, P. C. Lymphatic regulation in nonmammalian vertebrates. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, p. 297-308, 2013
- HEDRICK, M. S.; MCNEW, K. A.; CROSSLEY II, D. A. Baroreflex function in anurans from different environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 144-148, 2015.
- HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. Circulação. In: \_\_\_\_\_. (Eds.). **Fisiologia Animal**. Segunda Edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012. p. 611-642.
- HOPP, F. A.; SEAGARD, J. L. Respiratory responses to selective blockade of carotid sinus baroreceptors in the dog. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. R10-R18, 1998.
- HUGHES, G. M.; SHELTON, G. Respiratory mechanisms and their nervous control in fish. **Advances in Comparative Physiology and Biochemistry**, v. 1, p. 275-364, 1962.
- HYNDMAN, B. W.; KITNEY, R. I.; SAYERB, S. M. Spontaneous rhythms in physiological control systems. **Nature**, v. 233, p. 339-341, 1971.
- JUNG, R.; KATONA, P. G. Cardiovascular and respiratory responses to slow ramp carotid sinus pressures in the dog. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, p. 1465-1474, 1990.
- KENT, B. B.; DRANE, J. W.; BLUMENSTEIN, B.; MANNING, J. W. A mathematical model to assess changes in the baroreceptor reflex. **Cardiology**, v. 57, p. 295-310, 1972.
- KLABUNDE, R. E. Neurohumoral control of heart and circulation. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Cardiovascular Physiology Concepts**. Segunda Edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 117-139.
- KLIMASCHEWSKI, L.; KUMMER, W.; MAYER, B.; COURAUD, J. Y.; PREISLER, U.; PHILIPPIN, B.; HEYM, C. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. **Circulation Research**, v. 71, p. 1533-1537, 1992.
- LEITE, C. A. C.; TAYLOR, E. W.; GUERRA, C. D. R.; FLORINDO, L. H.; BELÃO, T.; RANTIN, F. T. The role of the vagus nerve in the generation of cardiorespiratory interactions in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Physiology Part A**, v. 195, p. 721-731, 2009.
- LILLYWHITE, H. B. Gravity, blood circulation, and the adaptation of form and function in lower vertebrates. **Journal of Experimental Zoology**, v. 275, p. 217-225, 1996.
- LILLYWHITE, H. B.; SEYMOUR, R. S. Regulation of arterial blood pressure in Australian tiger snakes. **Journal of Experimental Biology**, v. 75, p. 65-79, 1978.
- LUTZ, B. R.; WYMAN, L. C. Reflex cardiac inhibition of branchio-vascular origin in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. **Biological Bulletin**, v. 62, p. 10-16, 1932.



MCMULLAN, S.; PILOWSKY, P. M. The effects of baroreceptor stimulation on central respiratory drive: a review. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 174, p. 37-42, 2010.

MCWILLIAM, J. A. On the structure and rhythm of the heart in fishes, with especial reference to the heart of the eel. **Journal of Physiology**, v. 6, p. 232-245, 1885.

MOTT, J. C. Some factors affecting the blood circulation in the common eel (*Anguilla anguilla*). **Journal of Physiology**, v. 114, p. 387-398, 1951.

OGILVY, C. S.; DUBOIS, A. B. Effect of tilting on blood pressure and interstitial fluid pressures of blue fish and smooth dogfish. **American Journal of Physiology**, v. 242, p. R70-R76, 1982.

OLSON, K. R.; FLINT, K. B.; BUDDE, R. B. Vascular corrosion replicas of chemobaroreceptors in fish: the carotid labyrinth in Ictaluridae and Clariidae. **Cell and Tissue Research**, v. 219, p. 535-541, 1981.

RANDALL, D. J.; STEVENS, E. D. The role of adrenergic receptors in cardiovascular changes associated with exercise in salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 21, p. 415-424, 1967.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Comportamento: Iniciação, Padrões e Controle. In: \_\_\_\_\_. (Eds.). **Eckert - Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações**. Quarta Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. p. 374-430.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale's Pharmacology**. Oitava edição. London: Elsevier Churchill Livingstone, 2016.

REID, I. A. Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. **News in Physiological Science**, v. 11, p. 270-274, 1996.

RISTORI, M. T. Réflexe de barosensibilité chez un poisson téléostéen (*Cyprinus carpio* L.). **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 164, p. 1512-1516, 1970.

RISTORI, M. T.; DESSAUX, G. Sur l'existence d'un gradient de sensibilité dans les récepteurs branchiaux de *Cyprinus carpio* L. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 164, p. 1517-1519, 1970.

SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 821-829, 2005.

SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Autonomic control of circulation in fish: A comparative view. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 165, p. 127-139, 2011.

SANDBLOM, E.; EKSTRÖM, A.; BRIJS, J.; SUNDSTRÖM, L. F.; JUTFELT, F.; CLARK, T. D.; ADILL, A.; AHO, T.; GRÄNS, A. Cardiac reflexes in a warming world: thermal plasticity of barostatic control and autonomic tones in a temperate fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 2880-2887, 2016.

SEYMOUR, R. S.; HARGENS, A. R.; PEDLEY, T. J. The heart works against gravity. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. R715-R720, 1993.

- SUNDELL, E.; MORGENROTH, D.; BRIJS, J.; EKSTRÖM, A.; GRÄNS, A.; SANDBLOM, E. Seawater acclimation affects cardiac output and adrenergic control of blood pressure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-implications for salinity variations now and in the future. **Conservation Physiology**, v. 22, p. coy061, 2018.
- VAN VLIET, B. N.; WEST, N. H. Phylogenetic trends in the baroreceptor control of arterial blood pressure. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1284-1304, 1994.
- WOOD, C. M. Mayer waves in the circulation of a teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 189, p. 267-274, 1974.
- WOOD, C. H. M.; SHELTON, G. Cardiovascular dynamics and adrenergic responses of the rainbow trout *in vivo*. **Journal of Experimental Biology**, V. 87, n. 1, p. 247-270, 1980.
- ZENA, L. A. **Efeito da temperatura sobre as interações cardiorrespiratórias em sapos *Rhinella schneideri***. 2016. Tese de Doutorado – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Role of brain nitric oxide in the cardiovascular control of bullfrogs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 165, p. 263-271, 2013.
- ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 81-88, 2015.
- ZENA, L. A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; BÍCEGO, K. C. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 725-733, 2016a.
- ZENA, L. A.; SILVA, G. S. F.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Baroreflex regulation affects ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 3605-3615, 2016b.

## **CAPÍTULO 2**

---

**HAVERIA UM COMPONENTE RESPIRATÓRIO NO BARORREFLEXO DO  
TELEÓSTEO DE RESPIRAÇÃO BIMODAL *PANGASIANODON HYPOPHthalmus*?**

**Periódico alvo:** *Journal of Comparative Physiology – Part B (Research Article)*.

## RESUMO

Teleósteos, assim como outros vertebrados, são animais capazes de regular oscilações em curto prazo na pressão arterial por meio de alterações reflexas inversamente proporcionais na frequência cardíaca e resistência vascular sistêmica – um mecanismo de retroalimentação negativa denominado barorreflexo cardiovascular. Alguns tetrápodes, no entanto, também exibem o chamado barorreflexo ventilatório, caracterizado por alterações reflexas na ventilação inversamente proporcionais às mudanças ocorridas na pressão arterial – com a suposta significância fisiológica de ampliar as trocas gasosas na superfície respiratória dos animais. A existência do barorreflexo ventilatório já foi evidenciada em mamíferos, crocodilianos e anfíbios, porém, ainda é desconhecido se tal mecanismo está presente em peixes. Nesse contexto, o presente estudo objetivou testar a hipótese de que alterações na pressão arterial provocam mudanças na ventilação em um teleósteo de respiração bimodal, o *Pangasianodon hypophthalmus*. Para isso, uma imagem detalhada da via cardíaca e possivelmente ventilatória do barorreflexo dos animais foi obtida por meio de manipulações farmacológicas da resistência vascular e da pressão arterial dos mesmos. Os resultados demonstraram que *P. hypophthalmus* exibe um controle barorreflexo da frequência cardíaca tão responsivo quanto o de tetrápodes, indicando que tal ajuste fisiológico é altamente conservado em vertebrados. Adicionalmente, também foi demonstrado que a espécie em questão não apresenta um componente respiratório no reflexo barostático, sugerindo que o controle barorreflexo da ventilação evoluiu há menos de 450 milhões de anos – após a dicotomia Actinopterygii-Sarcopterygii.

**Palavras-chave:** Barorreceptores. Bloqueio autonômico. Fenilefrina. Nitroprussiato de sódio. Peixes. Quimiorreceptores. Quimiorreflexo.

## ABSTRACT

Teleosts, like other vertebrates, are capable of regulating short-term oscillations in arterial blood pressure through inversely proportional reflex changes in heart rate and systemic vascular resistance – a negative feedback mechanism called the cardiovascular baroreflex. Some tetrapods, however, also exhibit the so-called ventilatory baroreflex, characterized by reflex changes in ventilation that is inversely proportional to changes in arterial blood pressure – with the supposed physiological significance of enhancing gas exchange in the animals' respiratory surface. The presence of the ventilatory baroreflex has already been demonstrated in mammals, crocodylians and amphibians, but it is still unknown if such a mechanism is present in fish. In this context, the present study aimed to test the hypothesis that changes in arterial blood pressure cause reflex changes in ventilation in a teleost with bimodal respiration, the *Pangasianodon hypophthalmus*. To do so, a detailed evaluation of the cardiac and possibly ventilatory limbs of the baroreflex was obtained through pharmacological manipulations of the animals' vascular resistance and arterial blood pressure. The results demonstrated that *P. hypophthalmus* exhibits a baroreflex control of heart rate that is responsive as that of tetrapods, indicating that such physiological adjustment is highly conserved in vertebrates. Additionally, it was also demonstrated that this species does not present a respiratory component in the barostatic reflex, suggesting that the ventilatory baroreflex evolved after the separation of actinopterygian and sarcopterygian fish 450 million years ago.

**Keywords:** Autonomic blockade. Baroreceptors. Chemoreceptors. Chemoreflex. Fish. Phenylephrine. Sodium nitroprusside.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cladograma representando a ancestralidade comum mais recente de teleósteos e tetrápodes. O controle barorreflexo da ventilação já foi documentado em alguns grupos de tetrápodes e, caso esse controle seja observado também em teleósteos, a probabilidade mais parcimoniosa é que tal característica evoluiu anteriormente à dicotomia Actinopterygii-Sarcopterygii (constituindo uma homologia ao invés de uma homoplasia). No entanto, caso o controle barorreflexo da ventilação não exista em teleósteos, é possível que essa característica seja exclusiva de sarcopterígeos ou tetrápodes. Fonte: Maddison e Schultz (2007), modificado de acordo com Amemiya et al. (2013)..... 35
- Figura 2.** Fotografia de um exemplar de *P. hypophthalmus* instrumentalizado com cânula intrabucal (seta branca) e cânula aórtica (seta preta). Fonte: o autor. .... 37
- Figura 3.** Sinal representativo da pressão arterial na aorta ventral ( $P_{VA}$ ; A) e da pressão intrabucal (B) de *P. hypophthalmus*. ERA: evento de respiração aérea. Fonte: o autor. .... 38
- Figura 4.** Traçados originais da pressão arterial na aorta ventral ( $P_{VA}$ ), pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média), frequência cardíaca ( $f_H$ ), pressão intrabucal, amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ), frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ) e eventos de respiração aérea (ERA) de um indivíduo representativo de *P. hypophthalmus*, anteriormente e posteriormente à infusão de fenilefrina (Fe; 40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; A, C) e nitroprussiato de sódio (NPS; 80  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; B, D). Fonte: o autor. .... 42
- Figura 5.** Pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média; A, B), frequência cardíaca ( $f_H$ ; C, D), frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ; E, F), amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ; G, H), ventilação branquial total ( $V_T$ ; I, J) e eventos de respiração aérea (ERA; K, L) de *P. hypophthalmus* ( $N=6$ ) anteriormente e posteriormente as administrações das diferentes doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração (0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ;  $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor. .... 43
- Figura 6.** Curvas sigmóides barorreflexas individuais (A) e curva sigmóide barorreflexa média (B) de *P. hypophthalmus* ( $N=6$ ). Em A, símbolos diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos (valores absolutos). Em B, o símbolo preto corresponde às variáveis basais enquanto os símbolos cinza correspondem às respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo (média  $\pm$  EPM).  $P_{VA}$  média: pressão média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca. Fonte: o autor. .... 44

**Figura 7.** Efeitos individuais das alterações na pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) na frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ; A), amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ; B), ventilação branquial total ( $V_T$ ; C) e nos eventos de respiração aérea (ERA; D) de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ). Símbolos cinza diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos (valores absolutos). Símbolos vermelhos representam as variáveis basais médias dos animais (média  $\pm$  EPM). Fonte: o autor. .... 45

**Figura 8.** Regressões lineares médias demonstrando os efeitos das alterações na pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) na frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ; A), amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ; B), ventilação branquial total ( $V_T$ ; C) e nos eventos de respiração aérea (ERA; D) de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ). Símbolos pretos representam as variáveis basais dos animais. Símbolos azuis representam as respostas máximas à cada administração de nitroprussiato de sódio. Símbolos vermelhos representam as respostas máximas à cada administração de fenilefrina. Um asterisco indica que o coeficiente angular da regressão é significativamente diferente de zero ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor. .... 46

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variáveis cardiovasculares basais e variáveis barorreflexas derivadas das curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ). .....44
- Tabela 2.** Coeficientes angulares ( $B$ ) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das regressões lineares traçadas utilizando as variáveis cardiorrespiratórias basais e as respostas máximas às administrações de fenilefrina e nitroprussiato de sódio de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ). .....46
- Tabela 3.** Variáveis cardiorrespiratórias de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ) anteriormente e posteriormente administração intrarterial de solução salina (0,9% NaCl). .....47
- Tabela 4.** Variáveis cardiorrespiratórias de *P. hypophthalmus* ( $N = 4$ ) sob bloqueio autonômico com atropina e propranolol, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). .....47
- Tabela 5.** Ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ) e ganho barorreflexo normalizado ( $G_{N1}$ ;  $G_{N2}$ ) de diversas espécies de vertebrados em repouso mantidos em temperaturas compreendidas dentro de suas respectivas faixas ótimas .....49



## LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b><i>B</i></b>	Coefficiente angular
<b>ERA</b>	Eventos de respiração aérea
<b><i>f<sub>B</sub></i></b>	Frequência de ventilação branquial
<b><i>f<sub>H</sub></i></b>	Frequência cardíaca
<b><i>G<sub>50</sub></i></b>	Ganho máximo do barorreflexo
<b><i>G<sub>N1</sub></i></b>	<i>G<sub>50</sub></i> normalizado em relação as variáveis cardiovasculares basais
<b><i>G<sub>N2</sub></i></b>	Ganho barorreflexo em porcentagem da mudança na <i>f<sub>H</sub></i> por alteração pressórica unitária
<b>MÁX</b>	<i>f<sub>H</sub></i> máxima atingida pelo barorreflexo
<b>MÍN</b>	<i>f<sub>H</sub></i> mínima atingida pelo barorreflexo
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b><i>PO<sub>2</sub></i></b>	Pressão parcial de oxigênio
<b><i>P<sub>VA</sub></i></b>	Pressão arterial na aorta ventral
<b><i>P<sub>VA</sub> média<sub>50</sub></i></b>	<i>P<sub>VA</sub></i> média no centro da curva sigmóide
<b><i>R<sup>2</sup></i></b>	Coefficiente de determinação
<b><i>V<sub>AMP</sub></i></b>	Amplitude ventilatória branquial
<b><i>V<sub>T</sub></i></b>	Ventilação branquial total

## 1 – INTRODUÇÃO

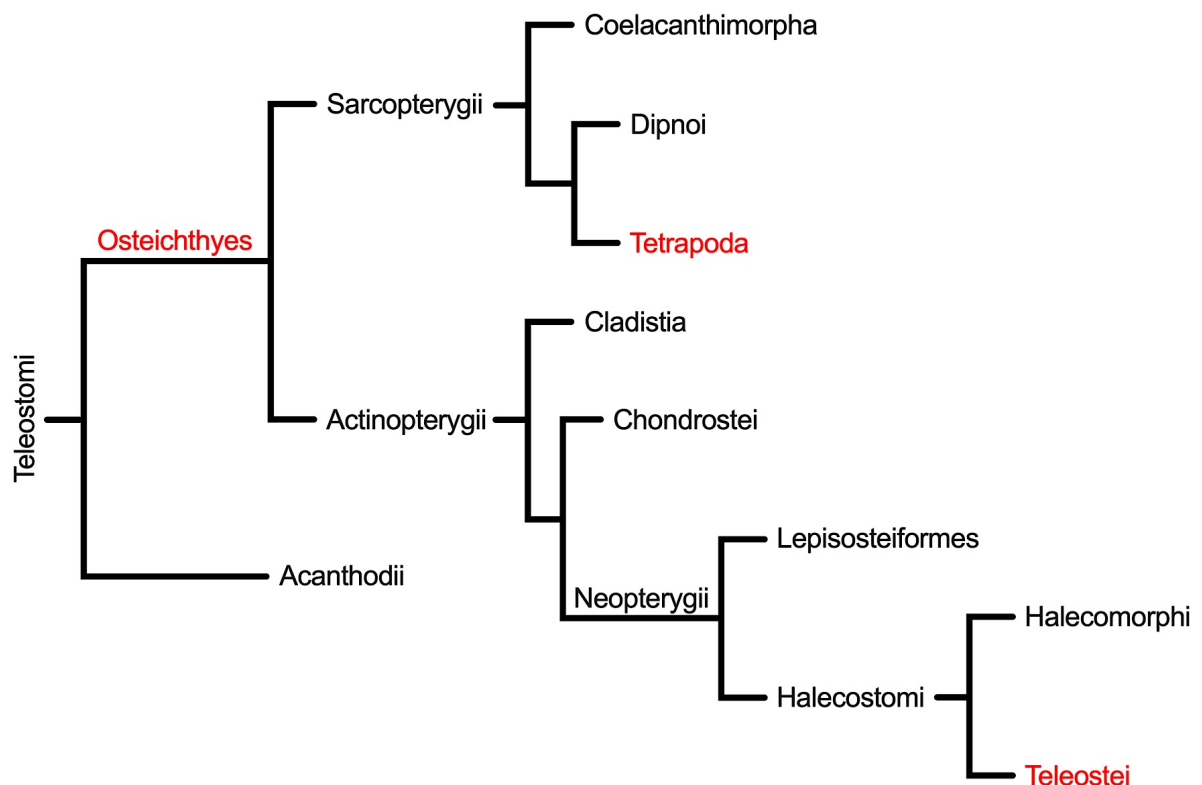
A maioria dos vertebrados são capazes de regular sua pressão arterial em um nível alto o suficiente para manter uma pressão de perfusão adequada para fornecer oxigênio e nutrientes aos tecidos metabolizadores, e baixa o suficiente para prevenir lesões vasculares, edemas e infartos associados ao aumento da pressão capilar (BAGSHAW, 1985; VAN VLIET E WEST, 1994). A regulação em longo prazo da pressão arterial é fortemente dependente da regulação endócrina do volume sanguíneo, ao passo que os desequilíbrios em curto prazo na pressão arterial (como os causados por exercício, alterações de temperatura ou de disponibilidade de oxigênio) são regulados por meio de mudanças reflexas no débito cardíaco e na resistência vascular sistêmica – denominados via cardíaca e vasomotora do barorreflexo, respectivamente (DAMPNEY, 1994).

O barorreflexo consiste em um mecanismo de retroalimentação negativa mediado por barorreceptores arteriais que fornecem informações aferentes para o sistema nervoso central, onde a informação é integrada e a frequência cardíaca ( $f_H$ ) e resistência vascular sistêmica ajustadas de forma inversamente proporcional à alteração pressórica ocorrida (ALTIMIRAS et al., 1998; BIANCHI-DA-SILVA et al., 2000; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; HAGENSEN et al., 2010; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b). Em mamíferos, esses barorreceptores estão localizados principalmente nas paredes da aorta e nos corpos carotídeos, enquanto que em outras classes de vertebrados essa localização é mais difusa (BAGSHAW, 1985; VAN VLIET E WEST, 1994). Porém, apesar da falta de informações acerca da localização dos barorreceptores em diversos vertebrados, mudanças na  $f_H$  recíprocas a mudanças na pressão arterial foram documentadas em todas as classes de gnatostomados (BAGSHAW, 1985; VAN VLIET E WEST, 1994).

A regulação cardiovascular está intimamente ligada à regulação ventilatória em vertebrados, e embora seja difícil definir exatamente como ambas regulações estão correlacionadas, tem sido proposto que a integração de estímulos aferentes dos barorreceptores influencia diretamente o impulso respiratório central em mamíferos, crocodilianos e anfíbios – gerando alterações reflexas na ventilação inversamente proporcionais às mudanças ocorridas na pressão arterial, com a suposta significância fisiológica de ampliar as trocas gasosas na superfície respiratória desses animais (ALTIMIRAS et al., 1998; HEDRICK et al., 2013; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b). Porém, é importante ter em mente que fatores que afetam a pressão arterial podem afetar a ventilação em vertebrados de forma presumivelmente independente dos barorreceptores, pois uma hipotensão arterial é capaz de estimular quimiorreceptores e induzir uma hiperventilação, o que dificulta ainda mais a definição de como

a regulação ventilatória e cardiovascular estão correlacionadas (MILSOM E BURLESON, 2007). Além disso, a ventilação também pode afetar a regulação cardiovascular nesse grupo de animais, o que é especialmente evidente em espécies que enfrentam períodos de apneia (como tetrápodes mergulhadores ou peixes com respiração aérea), em que a frequência cardíaca e o débito cardíaco tendem a aumentar drasticamente durante os episódios de respiração (BUTLER E JONES, 1997; GRAHAM, 1997; TEIXEIRA et al., 2015).

Considerando a falta de evidências acerca da existência de um componente respiratório no barorreflexo de teleósteos, o presente estudo objetivou investigar o reflexo barostático no peixe de respiração bimodal *Pangasianodon hypophthalmus* (Siluriformes, Pangasiidae), manipulando farmacologicamente a resistência vascular dos animais e obtendo uma imagem detalhada da via cardíaca e possivelmente ventilatória do reflexo barorreceptor nessa espécie. Ao testar a hipótese de que alterações na pressão arterial provocam mudanças na ventilação em teleósteos, assim como em tetrápodes, é possível verificar de forma preliminar a suposição de que essa característica evoluiu anteriormente à dicotomia Actinopterygii-Sarcopterygii (Figura 1).



**Figura 1.** Cladograma representando a ancestralidade comum mais recente de teleósteos e tetrápodes. O controle barorreflexo da ventilação já foi documentado em alguns grupos de tetrápodes e, caso esse controle seja observado também em teleósteos, a probabilidade mais parcimoniosa é que tal característica evoluiu anteriormente à dicotomia Actinopterygii-Sarcopterygii (constituindo uma homologia ao invés de uma homoplasia). No entanto, caso o controle barorreflexo da ventilação não exista em teleósteos, é possível que essa característica seja exclusiva de sarcopterígeos ou tetrápodes. Fonte: Maddison e Schulz (2007), modificado de acordo com Amemiya et al. (2013).

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – OS ANIMAIS

Foram utilizados seis espécimes de *P. hypophthalmus* (Sauvage, 1878; Siluriformes, Pangasiidae) de ambos os sexos, com massa de  $562,7 \pm 52,3$  g (média  $\pm$  EPM), obtidos no Centro de Aquicultura Credo Fisk (Nørresundby, Jutlândia Setentrional, Dinamarca). Os animais passaram por um período de aclimação mínimo de quatro meses em tanques de 1000 l mantidos em uma sala com fotoperíodo artificial controlado (12h:12h). Os tanques foram abastecidos com água sem cloro, constantemente aerada com ar atmosférico (normóxica, pressão parcial de oxigênio –  $PO_2$  – de  $\sim 18$  kPa), com potencial hidrogeniônico (pH) de 6,5 e temperatura de  $27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (média  $\pm$  EPM). A água dos tanques foi continuamente filtrada e renovada periodicamente.

Os animais foram alimentados diariamente até a saciedade com ração comercial para peixes (32% de proteína), exceto nas 72 h que precediam a realização dos experimentos, como forma de evitar a eliminação de fezes nas câmaras experimentais e impedir a ocorrência de alterações cardiovasculares associadas à digestão (SECOR, 2009; IVERSEN et al., 2010). Além disso, para prevenir vieses derivados de possíveis variações circadianas e sazonais nas variáveis fisiológicas estudadas (ALTIMIRAS, 1999; ZENA et al., 2016a), os experimentos foram desenvolvidos pela manhã (das 7h às 12h) durante as estações da primavera e verão (abril a julho). A presente etapa da pesquisa foi realizada na Universidade de Aarhus (Aarhus, Jutlândia Central, Dinamarca), mais especificamente na Seção de Zoofisiologia do Departamento de Biociências, em associação com os pesquisadores Mikkel Thy Thomsen, Mark Bayley e Tobias Wang. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normativas do Ministério Dinamarquês da Alimentação, Agricultura e Pesca (Protocolo 2016-15-0201-00865).

### 2.2 – FÁRMACOS

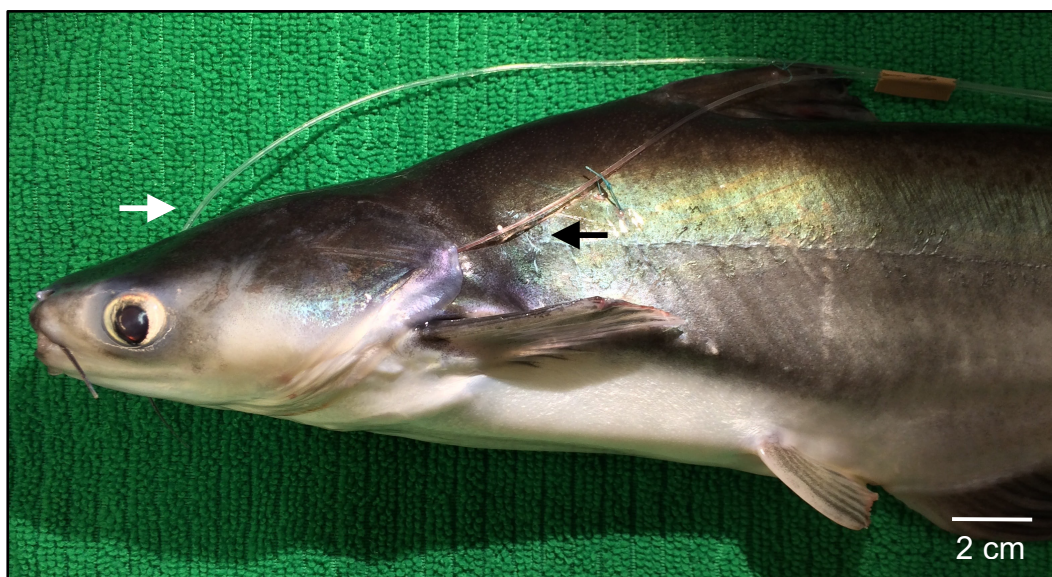
Benzocaína (anestésico), cloridrato de fenilefrina (agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico), sulfato de atropina (antagonista muscarínico), cloridrato de propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) e heparina sódica (anticoagulante) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). Todos os fármacos foram preparados no momento do uso e dissolvidos em água (benzocaína) ou solução salina estéril (0,9% NaCl) (demais compostos).

### 2.3 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS

Para indução anestésica, os peixes foram submersos em solução aquosa de benzocaína (150 mg.l<sup>-1</sup>) até apresentarem perda de equilíbrio e ausência de movimentos operculares. Então, os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica com um sistema de recirculação de solução de benzocaína, aerada e de concentração menor que a anterior (75 mg.l<sup>-1</sup>), a qual irrigava as brânquias dos animais constantemente para manter as trocas gasosas e a anestesia.

Subsequentemente, a região dorsal do palato dos indivíduos foi perfurada utilizando uma agulha de 14G (centralmente; 1 cm caudal às narinas), e uma cânula de polietileno (PE 100) foi inserida na cavidade bucal dos mesmos e fixada com dois flanges (um interno e um externo) (TEIXEIRA et al., 2015). Uma outra cânula (PE 50), preenchida com solução salina heparinizada (100 UI.ml<sup>-1</sup>, 0,9% NaCl), foi inserida na artéria branquial aferente do primeiro arco branquial esquerdo dos animais e avançada em direção à aorta ventral – essa segunda cânula foi fixada por meio de uma ligadura em volta de um flange e do arco branquial (Figura 2) (AXELSSON E FRITSCHKE, 1994).

As brânquias dos peixes foram então irrigadas com água isenta de anestésico até o aparecimento de movimentos reflexos e ventilação espontânea, e os mesmos foram transferidos para tanques individuais de 150 l abastecidos com água sem cloro, constantemente aerada com ar atmosférico (normóxica,  $PO_2 \sim 18$  kPa), com pH de 6,5 e temperatura de  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (média  $\pm$  EPM; compreendida dentro da faixa ótima da espécie estudada; RIEHL E BAENSCH, 1996). Todos os procedimentos supracitados foram realizados em  $\sim 20$  min, e os animais passaram por um período de recuperação pós-cirúrgica de 14-16 h anteriormente ao início dos experimentos.

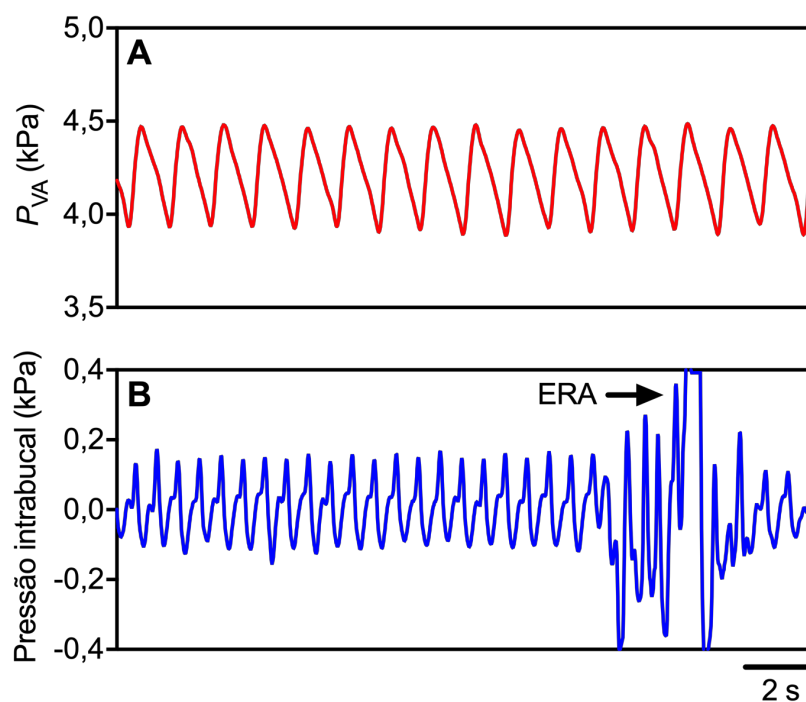


**Figura 2.** Fotografia de um exemplar de *P. hypophthalmus* instrumentalizado com cânula intrabucal (seta branca) e cânula aórtica (seta preta). Fonte: o autor.

## 2.4 – AQUISIÇÃO DAS VARIÁVEIS CARDIORRESPIRATÓRIAS

Após o período de recuperação cirúrgica, a cânula intrabucal e a cânula aórtica foram conectadas à transdutores de pressão (PX600, Irvine, Califórnia, EUA), previamente calibrados por meio de uma coluna estática de água, para adquirir continuamente valores de pressão à 100 Hz utilizando um sistema de aquisição de dados BIOPAC MP100 (BIOPAC Systems, Goleta, Califórnia, EUA). A cânula intrabucal permitiu a aquisição da pressão na cavidade bucal dos animais, a qual foi utilizada para avaliar a frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ; rpm), a amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ; kPa), a ventilação branquial total ( $V_T$ ; unidades arbitrárias) e os eventos de respiração aérea (ERA). Já a cânula aórtica permitiu a realização de administrações farmacológicas e a aquisição da pressão arterial na aorta ventral dos indivíduos ( $P_{VA}$ ), a qual foi utilizada para avaliar a pressão arterial média ( $P_{VA}$  média; kPa) e a  $f_H$  (bpm) dos mesmos.

A  $f_B$  foi obtida por meio da contagem dos pulsos de pressão intrabucal, a  $V_{AMP}$  foi obtida por meio do cálculo da amplitude dos pulsos de pressão intrabucal, a  $V_T$  foi obtida multiplicando-se a  $f_B$  pela  $V_{AMP}$ , e os ERA foram obtidos por meio da contagem dos súbitos aumentos da pressão intrabucal que ocorrem com cada respiração aérea. Finalmente, a  $P_{VA}$  média foi calculada como a média aritmética da  $P_{VA}$ , e a  $f_H$  foi obtida por meio da contagem dos pulsos da  $P_{VA}$  (Figura 3A, B).



**Figura 3.** Sinal representativo da pressão arterial na aorta ventral ( $P_{VA}$ ; A) e da pressão intrabucal (B) de *P. hypophthalmus*. ERA: evento de respiração aérea. Fonte: o autor.

## 2.5 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As variáveis cardiorrespiratórias dos animais foram coletadas até que permanecessem estáveis por 30 min (valores basais) e, então, 2 ml.kg<sup>-1</sup> de solução salina (0,9% NaCl) foi administrada via cânula aórtica para investigar possíveis influências de alterações volêmicas nas variáveis estudadas. Subsequentemente, doses seriadas e crescentes de cloridrato de fenilefrina (10, 20, 40, 80 µg.kg<sup>-1</sup>; 100 µg.ml<sup>-1</sup>) e de nitroprussiato de sódio (20, 40, 80, 160 µg.kg<sup>-1</sup>; 200 µg.ml<sup>-1</sup>) foram injetadas *in bolus* na aorta ventral dos animais. Cada administração foi seguida de um *flush* de 0,4 ml de solução salina heparinizada (100 UI.ml<sup>-1</sup>; 0,9% NaCl) para que os fármacos não permanecessem estagnados no interior da cânula. Entre uma administração farmacológica e outra foi aguardado tempo suficiente para que as variáveis cardiorrespiratórias retornassem aos valores basais (o que geralmente ocorria dentro de 30 min, exceto quando as maiores doses eram aplicadas).

Por fim, em quatro dos seis animais utilizados, sulfato de atropina (1,5 mg.kg<sup>-1</sup>; 1 mg.ml<sup>-1</sup>) e cloridrato de propranolol (1,5 mg.kg<sup>-1</sup>; 1 mg.ml<sup>-1</sup>) foram conjuntamente administrados via cânula aórtica e 30 min foram aguardados para que os mesmos exercessem seus efeitos. Então, as respostas cardiorrespiratórias ao cloridrato de fenilefrina (40 µg.kg<sup>-1</sup>; 100 µg.ml<sup>-1</sup>) e ao nitroprussiato de sódio (80 µg.kg<sup>-1</sup>; 200 µg.ml<sup>-1</sup>) foram avaliadas novamente para se verificar a origem autonômica dos ajustes barorreflexos observados. Ao findar do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados através de uma infusão intrarterial de pentobarbital sódico (800 mg.kg<sup>-1</sup>).

## 2.6 – ANÁLISE DO BARORREFLEXO CARDÍACO E VENTILATÓRIO

Para análise do barorreflexo cardíaco e ventilatório foram utilizadas as variáveis observadas anteriormente às administrações farmacológicas (valores basais) e posteriormente à administração de cada fármaco vasoativo (resposta máxima à cada fármaco). Similarmente, os ERA foram contabilizados ao longo de 10 min anteriormente às administrações farmacológicas e posteriormente à cada intervenção farmacológica.

Para avaliar o controle barorreflexo da  $f_H$ , os valores da  $P_{VA}$  média observados anteriormente e posteriormente cada administração de fármaco vasoativo foram representados graficamente com seus valores correspondentes da  $f_H$  para cada animal individual. A relação entre a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  de cada indivíduo foi analisada utilizando a função logística sigmóide de quatro variáveis descrita abaixo (KENT et al., 1972; REID, 1996):

$$f_H = \frac{(MÁX - MÍN)}{(1 + (P_{VA} \text{ média}/P_{VA} \text{ média}_{50})^B)} + MÍN$$

Em que MÁX é a  $f_H$  máxima atingida pelo barorreflexo (bpm), MÍN é a  $f_H$  mínima atingida pelo barorreflexo (bpm),  $B$  é o coeficiente angular máximo (na porção linear da curva sigmóide; bpm.kPa<sup>-1</sup>), e  $P_{VA}$  média<sub>50</sub> é a  $P_{VA}$  média no centro da curva sigmóide (kPa). A faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$  foi calculada como a diferença entre a MÁX e a MÍN. O ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ; bpm.kPa<sup>-1</sup>), que ocorre quando a  $P_{VA}$  média é igual à  $P_{VA}$  média<sub>50</sub>, foi calculado para cada animal utilizando a equação abaixo:

$$G_{50} = \left| \frac{-B (MÁX - MÍN)}{4 \cdot P_{VA} \text{ média}_{50}} \right|$$

Para permitir comparações fidedignas entre o ganho barorreflexo de *P. hypophthalmus* e de outros vertebrados previamente estudados, essa variável foi normalizada utilizando duas lógicas distintas: (1) normalização do  $G_{50}$  em relação aos valores basais da  $P_{VA}$  média e da  $f_H$  dos animais ( $G_{N1}$ ; unidades arbitrárias; CROSSLEY et al., 2003; ZENA et al., 2015); e (2) recálculo do ganho barorreflexo em porcentagem da mudança na  $f_H$  por alteração unitária na  $P_{VA}$  média ( $G_{N2}$ ; %.kPa<sup>-1</sup>; ALTIMIRAS et al., 1998).

$$G_{N1} = G_{50} \cdot \left( \frac{P_{VA} \text{ média basal}}{f_H \text{ basal}} \right) \qquad G_{N2} = 100 \cdot \left( \frac{B}{MÍN} \right)$$

Por último, para avaliar a existência do controle barorreflexo da ventilação, os valores da  $P_{VA}$  média observados anteriormente e posteriormente cada administração de fármaco vasoativo foram representados graficamente com seus valores correspondentes das variáveis ventilatórias ( $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA) para cada animal individual. A relação entre a  $P_{VA}$  média e as variáveis ventilatórias de cada indivíduo foram analisadas separadamente para os dados de fenilefrina e nitroprussiato de sódio por meio de regressão linear (ZENA et al., 2016b). Ressalta-se que tal tipo de regressão é válida para avaliação do barorreflexo ventilatório, visto que estudos anteriores sugerem que as respostas ventilatórias barorreflexas não apresentam claros platôs máximos e mínimos (MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b). Ambas as análises, de controle barorreflexo da  $f_H$  e da ventilação, foram realizadas utilizando o software Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, Califórnia, EUA).



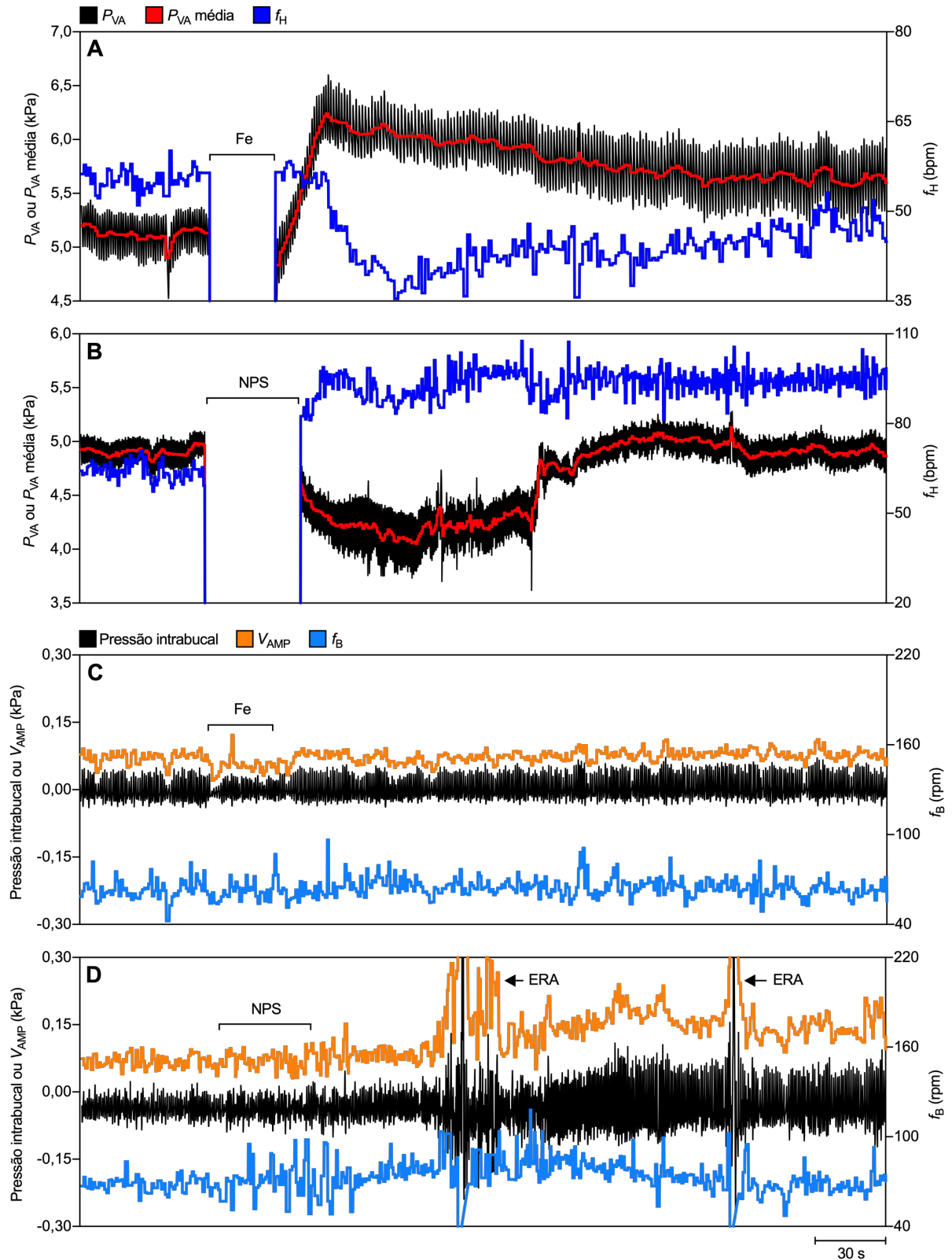
## 2.7 – ESTATÍSTICA

Uma análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas complementada pelo teste de comparações múltiplas de Fisher foi utilizada para comparar os valores das variáveis cardiorrespiratórias dos animais ( $P_{VA}$  média,  $f_H$ ,  $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA) observados anteriormente e posteriormente às infusões de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Uma ANOVA de via única para medidas repetidas complementada pelo teste de comparações múltiplas de Fisher foi utilizada para verificar se os  $B$  das regressões lineares entre a  $P_{VA}$  média e as variáveis ventilatórias ( $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA) dos animais eram diferentes de zero. Possíveis alterações nas variáveis cardiorrespiratórias ( $P_{VA}$  média,  $f_H$ ,  $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA) induzidas pela administração de solução salina foram avaliadas por meio de um teste t pareado bicaudal. As variáveis cardiorrespiratórias ( $P_{VA}$  média,  $f_H$ ,  $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA) observadas anteriormente e posteriormente às infusões de fenilefrina e nitroprussiato de sódio em animais sob bloqueio autonômico com atropina e propranolol foram comparadas por meio de uma ANOVA de via única para medidas repetidas complementada pelo teste de comparações múltiplas de Fisher. Para todos os testes foi adotado  $\alpha = 0,05$ , e a hipótese nula foi rejeitada quando  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no software Prism 7.0, assim como a construção dos gráficos. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

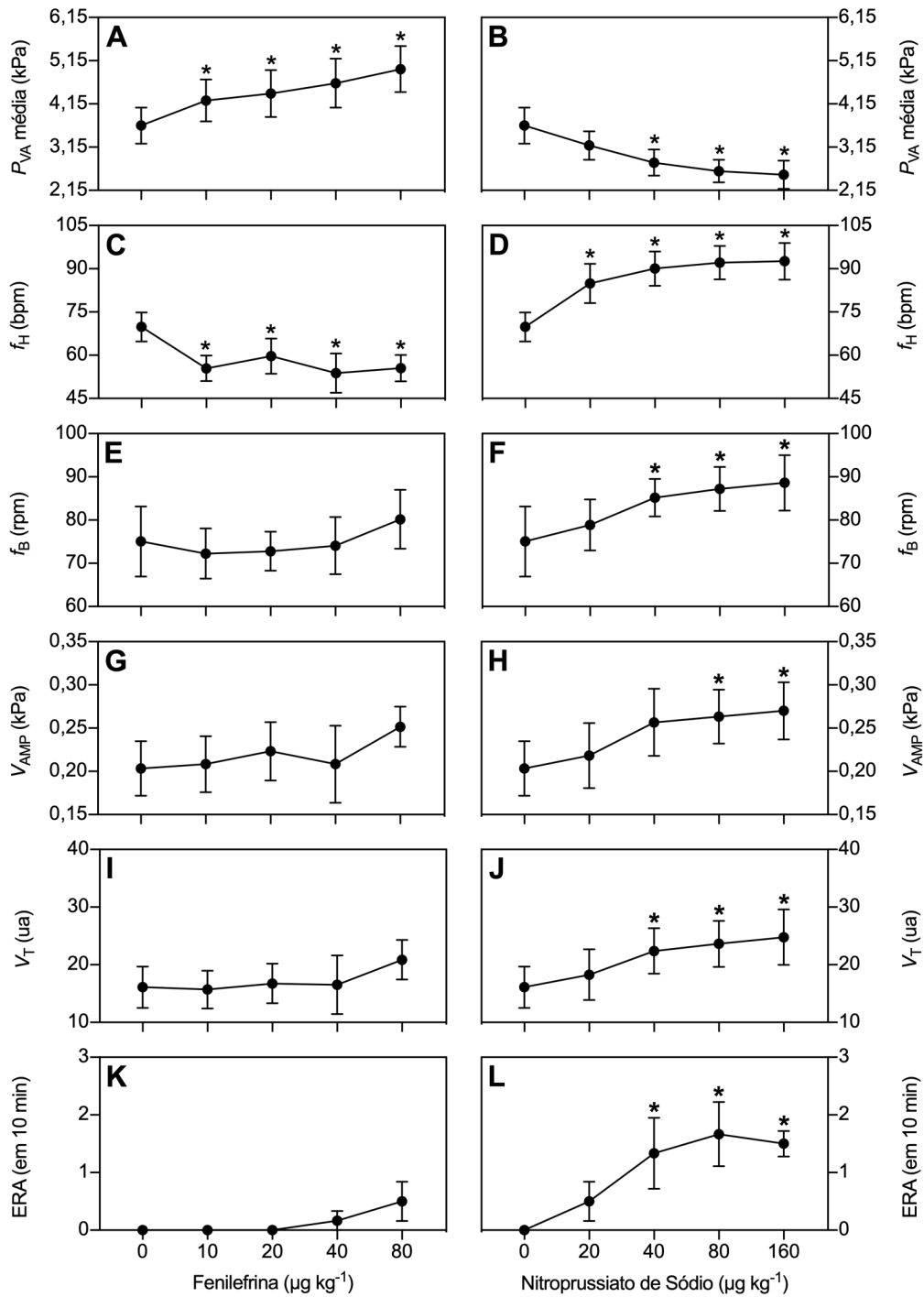
## 3 – RESULTADOS

### 3.1 – CONTROLE BARORREFLEXO CARDÍACO E VENTILATÓRIO

*P. hypophthalmus* apresentou claras respostas barorreflexas cardíacas às infusões de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, porém, respostas ventilatórias significativas foram observadas somente após as infusões de nitroprussiato de sódio (Figuras 4A-D e 5A-L). As administrações do agente vasoconstritor fenilefrina promoveram marcantes aumentos na  $P_{VA}$  média dos animais acompanhados de reduções na  $f_H$ , enquanto as variáveis ventilatórias ( $f_H$ ,  $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA) permaneceram inalteradas (Figuras 4A, C e 5A, C, E, G, I, K). Já as administrações do agente vasodilatador nitroprussiato de sódio promoveram marcantes reduções na  $P_{VA}$  média acompanhadas de aumentos na  $f_H$ ,  $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA (Figuras 4B, D e 5B, D, F, H, J, L).

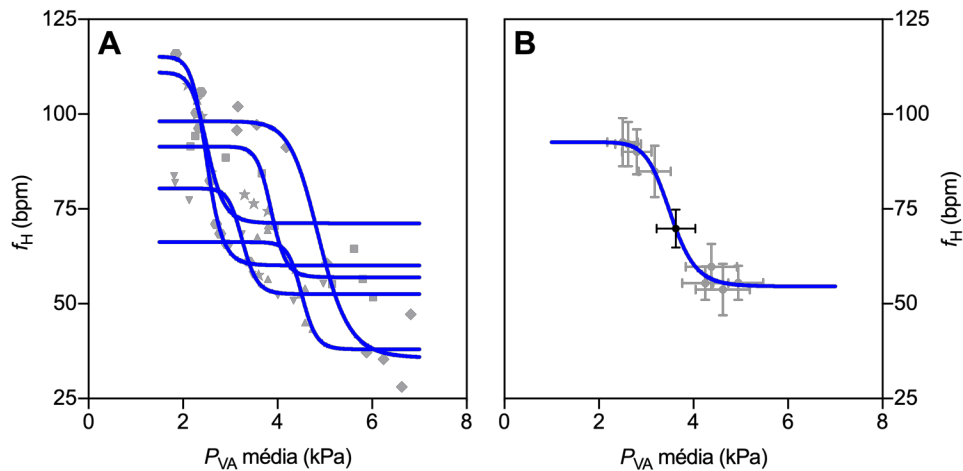


**Figura 4.** Traçados originais da pressão arterial na aorta ventral ( $P_{VA}$ ), pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média), frequência cardíaca ( $f_H$ ), pressão intrabucal, amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ), frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ) e eventos de respiração aérea (ERA) de um indivíduo representativo de *P. hypophthalmus*, anteriormente e posteriormente à infusão de fenilefrina (Fe;  $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; A, C) e nitroprussiato de sódio (NPS;  $80 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; B, D). Fonte: o autor.



**Figura 5.** Pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média; A, B), frequência cardíaca ( $f_H$ ; C, D), frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ; E, F), amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ; G, H), ventilação branquial total ( $V_T$ ; I, J) e eventos de respiração aérea (ERA; K, L) de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ) anteriormente e posteriormente às administrações das diferentes doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ;  $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.

As curvas sigmóides que descrevem a correlação entre a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  de *P. hypophthalmus* podem ser encontradas na Figura 6, enquanto as variáveis numéricas associadas ao barorreflexo cardíaco dessa espécie podem ser encontradas na Tabela 1. É possível observar que os seis indivíduos estudados exibiram típicas curvas descritoras do barorreflexo cardíaco, assim como considerável uniformidade na posição e na morfologia das mesmas (Figura 6A, B).



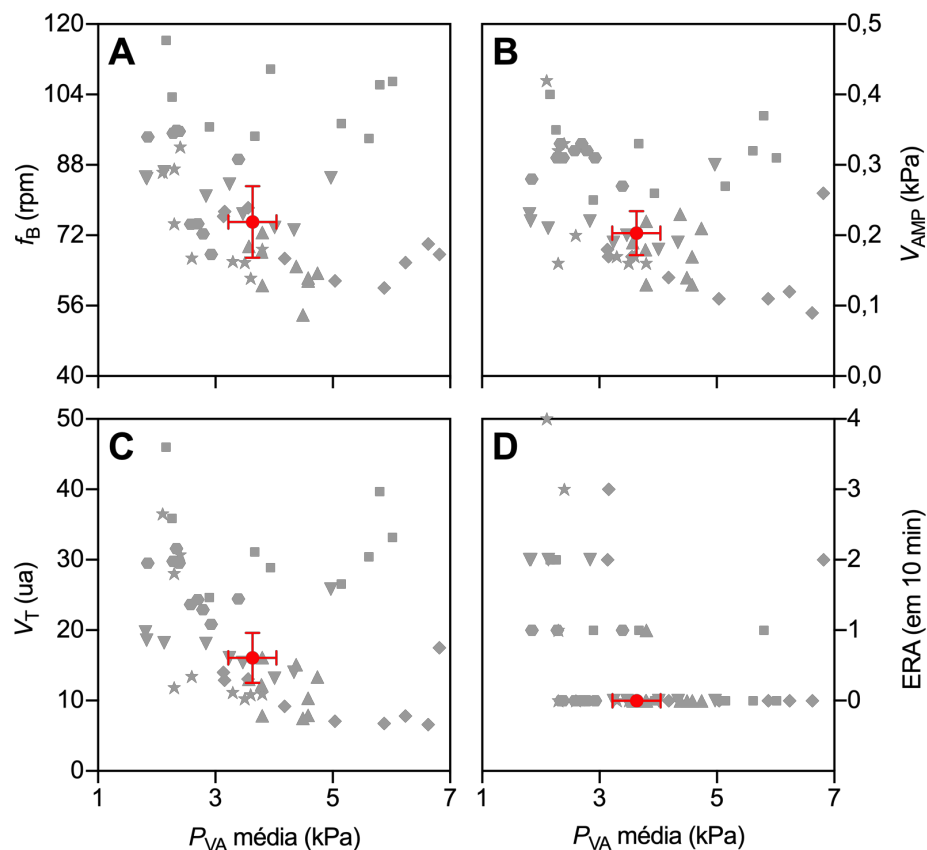
**Figura 6.** Curvas sigmóides barorreflexas individuais (A) e curva sigmóide barorreflexa média (B) de *P. hypophthalmus* ( $N=6$ ). Em A, símbolos diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos (valores absolutos). Em B, o símbolo preto corresponde às variáveis basais enquanto os símbolos cinza correspondem às respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo (média  $\pm$  EPM).  $P_{VA}$  média: pressão média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca. Fonte: o autor.

**Tabela 1.** Variáveis cardiovasculares basais e variáveis barorreflexas derivadas das curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo de *P. hypophthalmus* ( $N=6$ ).

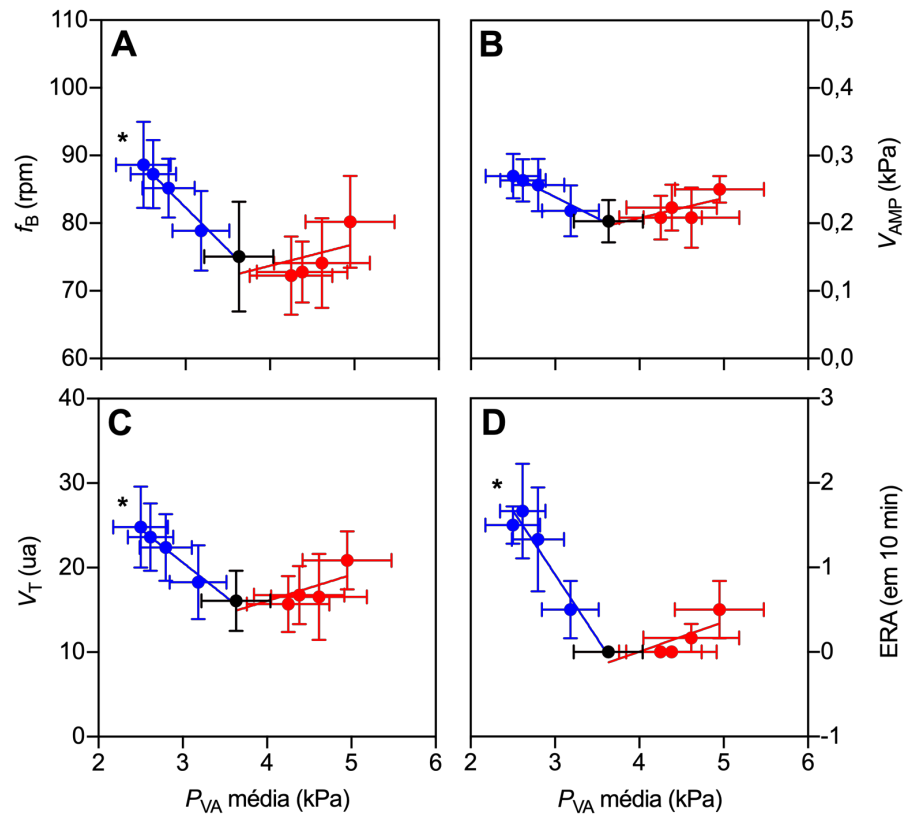
$P_{VA}$ média basal (kPa)	$3,63 \pm 0,41$
$f_H$ basal (bpm)	$69,8 \pm 5,0$
MÁX (bpm)	$93,6 \pm 7,5$
MÍN (bpm)	$52,4 \pm 5,5$
MÁX – MÍN (bpm)	$41,2 \pm 5,8$
$B$ (bpm.kPa <sup>-1</sup> )	$20,3 \pm 2,7$
$P_{VA}$ média <sub>50</sub>	$3,60 \pm 0,41$
$R^2$	$0,92 \pm 0,03$
$G_{50}$ (bpm.kPa <sup>-1</sup> )	$56,1 \pm 5,4$
$G_{N1}$ (ua)	$2,96 \pm 0,40$
$G_{N2}$ (%.kPa <sup>-1</sup> )	$42,3 \pm 8,8$

$P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca; MÁX:  $f_H$  máxima atingida pelo barorreflexo; MÍN:  $f_H$  mínima atingida pelo barorreflexo; MÁX – MÍN: faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$ ;  $B$ : coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide;  $P_{VA}$  média<sub>50</sub>:  $P_{VA}$  média no centro da curva sigmóide;  $R^2$ : coeficiente de determinação;  $G_{50}$ : ganho máximo do barorreflexo;  $G_{N1}$ :  $G_{50}$  normalizado em relação aos valores basais da  $P_{VA}$  média e da  $f_H$  dos animais;  $G_{N2}$ : ganho barorreflexo recalculado em porcentagem da mudança na  $f_H$  por alteração unitária na  $P_{VA}$  média. Dados expressos em média  $\pm$  EPM.

As regressões lineares entre a  $P_{VA}$  média e as variáveis ventilatórias de *P. hypophthalmus* podem ser encontradas nas Figuras 7 e 8 (dados individuais e dados médios, respectivamente). Já as variáveis numéricas associadas à tais regressões podem ser encontradas na Tabela 2. Os resultados demonstraram que as quatro variáveis ventilatórias estudadas não são sensíveis aos aumentos pressóricos promovidos pelas administrações de fenilefrina ( $B$  não é diferente de zero), porém, com exceção da  $V_{AMP}$ , tais variáveis são significativamente sensíveis às reduções pressóricas promovidas pelas administrações de nitroprussiato de sódio ( $B$  diferente de zero; Figura 8A-D e Tabela 2). Ademais, excetuando-se os ERA, os  $R^2$  das regressões lineares realizadas utilizando as respostas à fenilefrina se mostraram inferiores aos  $R^2$  das regressões lineares realizadas utilizando as respostas ao nitroprussiato de sódio (Tabela 2).



**Figura 7.** Efeitos individuais das alterações na pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) na frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ; A), amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ; B), ventilação branquial total ( $V_T$ ; C) e nos eventos de respiração aérea (ERA; D) de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ). Símbolos cinza diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos (valores absolutos). Símbolos vermelhos representam as variáveis basais médias dos animais (média  $\pm$  EPM). Fonte: o autor.



**Figura 8.** Regressões lineares médias demonstrando os efeitos das alterações na pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) na frequência de ventilação branquial ( $f_B$ ; A), amplitude ventilatória branquial ( $V_{AMP}$ ; B), ventilação branquial total ( $V_T$ ; C) e nos eventos de respiração aérea (ERA; D) de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ). Símbolos pretos representam as variáveis basais dos animais. Símbolos azuis representam as respostas máximas à cada administração de nitroprussiato de sódio. Símbolos vermelhos representam as respostas máximas à cada administração de fenilefrina. Um asterisco indica que o coeficiente angular da regressão é significativamente diferente de zero ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.

**Tabela 2.** Coeficientes angulares ( $B$ ) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das regressões lineares traçadas utilizando as variáveis cardiorespiratórias basais e as respostas máximas às administrações de fenilefrina e nitroprussiato de sódio de *P. hypophthalmus* ( $N = 6$ ).

	Fenilefrina	Nitroprussiato de Sódio
$f_B B$ (rpm.kPa <sup>-1</sup> )	4,18 $\pm$ 3,10	-14,14 $\pm$ 4,69 *
$f_B R^2$	0,21 $\pm$ 0,11	0,46 $\pm$ 0,11
$V_{AMP} B$ (kPa.kPa <sup>-1</sup> )	0,01 $\pm$ 0,02	-0,07 $\pm$ 0,06
$V_{AMP} R^2$	0,51 $\pm$ 0,14	0,55 $\pm$ 0,10
$V_T B$ (ua.kPa <sup>-1</sup> )	1,29 $\pm$ 1,25	-10,32 $\pm$ 5,59 *
$V_T R^2$	0,30 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,10
ERA $B$ (ERA.10 min <sup>-1</sup> .kPa <sup>-1</sup> )	0,36 $\pm$ 0,21	-1,87 $\pm$ 0,88 *
ERA $R^2$	0,70 $\pm$ 0,16	0,49 $\pm$ 0,11

$f_B$ : frequência de ventilação branquial;  $V_{AMP}$ : amplitude ventilatória branquial;  $V_T$ : ventilação branquial total; ERA; eventos de respiração aérea. Um asterisco indica que o coeficiente angular da regressão é significativamente diferente de zero ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM.

### 3.2 – EFEITOS DA INFUSÃO DE VEÍCULO NAS VARIÁVEIS CARDIORRESPIRATÓRIAS

Os dados referentes às variáveis cardiorrespiratórias observadas em *P. hypophthalmus*, anteriormente e posteriormente a administração intrarterial de solução salina, encontram-se apresentados na Tabela 3. Esses resultados demonstraram que possíveis alterações volêmicas promovidas pelas administrações farmacológicas não induziram mudanças significativas na  $P_{VA}$  média,  $f_H$ ,  $f_B$ ,  $V_{AMP}$ ,  $V_T$  e ERA dos animais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Variáveis cardiorrespiratórias de *P. hypophthalmus* ( $N=6$ ) anteriormente e posteriormente administração intrarterial de solução salina (0,9% NaCl).

	Pré salina	Pós salina
$P_{VA}$ média (kPa)	3,33 ± 0,47	3,39 ± 0,45
$f_H$ (bpm)	75,2 ± 6,8	74,3 ± 7,4
$f_B$ (rpm)	77,9 ± 6,1	77,3 ± 4,9
$V_{AMP}$ (kPa)	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,04
$V_T$ (ua)	14,6 ± 4,4	14,5 ± 3,7
ERA (em 10 min)	0,17 ± 0,17	0,00 ± 0,00

$P_{VA}$  média: pressão média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca;  $f_B$ : frequência de ventilação branquial;  $V_{AMP}$ : amplitude ventilatória branquial;  $V_T$ : ventilação branquial total; ERA: eventos de respiração aérea. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as variáveis cardiorrespiratórias observadas anteriormente e posteriormente a administração intrarterial de solução salina ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média ± EPM.

### 3.3 – EFEITOS DOS FÁRMACOS VASOATIVOS APÓS BLOQUEIO AUTONÔMICO

As variáveis cardiorrespiratórias observadas em *P. hypophthalmus* sob bloqueio autonômico com atropina e propranolol, anteriormente e posteriormente as administrações dos fármacos vasoativos, encontram-se apresentadas na Tabela 4. É possível observar que a administração de fenilefrina provocou um aumento na  $P_{VA}$  média que não foi acompanhado de alterações nas demais variáveis cardiorrespiratórias. Por outro lado, a administração de nitroprussiato de sódio provocou uma redução na  $P_{VA}$  média acompanhada de um aumento na  $f_B$ ,  $V_{AMP}$  e  $V_T$  – enquanto a  $f_H$  e os ERA permaneceram inalterados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Variáveis cardiorrespiratórias de *P. hypophthalmus* ( $N=4$ ) sob bloqueio autonômico com atropina e propranolol, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

	Pré administração	Pós fenilefrina	Pós nitroprussiato de sódio
$P_{VA}$ média (kPa)	3,72 ± 0,51	5,02 ± 0,82 *	2,95 ± 0,52 *
$f_H$ (bpm)	84,9 ± 7,8	84,9 ± 7,3	85,0 ± 7,2
$f_B$ (rpm)	77,1 ± 1,8	74,7 ± 3,3	99,9 ± 6,2 *
$V_{AMP}$ (kPa)	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,02 *
$V_T$ (ua)	13,1 ± 1,6	12,6 ± 1,4	24,9 ± 1,6 *
ERA (em 10 min)	1,00 ± 0,58	0,75 ± 0,48	1,00 ± 0,41

$P_{VA}$  média: pressão média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca;  $f_B$ : frequência de ventilação branquial;  $V_{AMP}$ : amplitude ventilatória branquial;  $V_T$ : ventilação branquial total; ERA: eventos de respiração aérea. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média ± EPM.

#### 4 – DISCUSSÃO

No presente estudo, as variáveis cardiorrespiratórias basais encontradas em *P. hypophthalmus* se mostraram similares àquelas reportadas por Damsgaard et al. (2018) para indivíduos da mesma espécie mantidos a 25°C (Tabela 1). A única diferença notável em relação aos achados de Damsgaard et al. (2018) foi a  $f_H$  basal inferior descrita por esses autores (~52 bpm), divergência que pode ser explicada pela massa corporal três vezes maior dos animais utilizados na referida investigação. Além disso, Thomsen et al. (2017) reportaram uma  $f_H$  basal de ~90 bpm em *P. hypophthalmus* com massa corporal de ~500 g mantidos a 33°C, observação que também está de acordo com os dados do presente estudo considerando que a influência da temperatura na  $f_H$  dessa espécie é da ordem de 2,7 bpm.°C (DAMSGAARD et al., 2018).

As alterações pressóricas hipertensivas e hipotensivas promovidas pelas administrações de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, assim como as respostas bradicárdicas e taquicárdicas reflexas observadas em *P. hypophthalmus*, coadunam com aquelas documentadas em estudos anteriores desenvolvidos com outros vertebrados (Figuras 4A, B e 5A-D; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; SANDBLOM et al., 2016; ZENA et al., 2016a; SUNDELL et al., 2018). Entretanto, ressalta-se que a despeito das investigações prévias acerca do barorreflexo em ectotérmicos, o presente estudo é o primeiro a explorar esse fenômeno em um teleósteo utilizando o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide (BAGSHAW, 1985; FARRELL, 1986; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; 2011; SANDBLOM et al., 2016; SUNDELL et al., 2018) – a qual descreve a interdependência existente entre a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  dos animais de forma mais fidedigna que a regressão linear, ao correlacionar tais variáveis considerando que as respostas cardíacas reflexas apresentam um limite fisiológico (MÁX e MÍN) (KENT et al. 1972; HEAD E MCCARTY, 1987).

Ainda com relação à metodologia utilizada, a tipicidade das curvas sigmóides realizadas entre a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  de *P. hypophthalmus* denota que as análises empregadas no presente estudo caracterizaram adequadamente o controle barorreflexo da  $f_H$  nesse teleósteo (Figura 6A, B; HEAD E MCCARTY, 1987; REID, 1996; ALTIMIRAS et al., 1998; CROSSLEY et al., 2003; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b; SANDBLOM et al., 2016; SUNDELL et al., 2018). Adicionalmente, o  $R^2$  dessas curvas também respalda o sucesso da metodologia, demonstrando que ~92% das alterações na  $f_H$  observadas após as infusões dos fármacos vasoativos podem ser explicadas por alterações na  $P_{VA}$  média nos indivíduos estudados (Tabela 1; ALTIMIRAS et al., 1998; ZENA et al., 2016a).



A Tabela 5 retrata o  $G_{50}$ ,  $G_{N1}$  e  $G_{N2}$  de *P. hypophthalmus* e de diversos tetrápodes previamente investigados utilizando o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide. Apesar da marcante diferença existente entre o  $G_{50}$  de *P. hypophthalmus* e da maioria das demais espécies, a homogeneidade interespecífica do  $G_{N1}$  e  $G_{N2}$  é notável. Há muito tempo é postulado que o barorreflexo cardíaco consiste em uma característica filogeneticamente antiga, selecionada no início da evolução dos vertebrados frente ao aumento do *fitness* associado à manutenção de uma pressão de perfusão tecidual adequada e contínua (JONES E MILSOM, 1982; BAGSHAW, 1985). Nossos dados suportam fortemente essa hipótese, visto que o ganho barorreflexo de *P. hypophthalmus* é comparável ao de vertebrados terrestres, pelo menos no que diz respeito à via cardíaca desse ajuste fisiológico (Tabela 5). Com base nessa observação, também é possível presumir que a função barorreflexa sofreu restritas influências das histórias evolutivas recentes das diferentes espécies de vertebrados, constatação corroborada por Hedrick et al. (2015), que verificaram que anfíbios terrestres e aquáticos possuem ganho barorreflexo idêntico. Contudo, estudos com mais espécies de teleósteos são necessários para lançar luz sobre essa questão.

**Tabela 5.** Ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ) e ganho barorreflexo normalizado ( $G_{N1}$ ,  $G_{N2}$ ) de diversas espécies de vertebrados em repouso mantidos em temperaturas compreendidas dentro de suas respectivas faixas ótimas.

Espécie / Temperatura	$G_{50}$ (bpm.kPa <sup>-1</sup> )	$G_{N1}$ (ua)	$G_{N2}$ (%.kPa <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Alligator mississippiensis</i> (28°C)	9,6	2,12	–	Crossley et al. (2003)
<i>Caiman latirostris</i> (30°C)	19,0	3,51	29,4	Hagensen et al. (2010)
<i>Crocodylus porosus</i> (28°C)	7,1	2,66	47,6	Altimiras et al. (1998)
<i>Lithobates catesbeianus</i> (21°C)	12,1	1,64	40,2	Hedrick et al. (2015)
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (39°C)	51,7	2,65	–	Reid (1996)
<i>P. hypophthalmus</i> (25°C)	56,1	2,96	42,3	Presente estudo
<i>Rana marina</i> (21°C)	13,2	1,98	39,3	Hedrick et al. (2015)
<i>Rattus norvegicus</i> (37°C)	30,0	1,23	–	Head e McCarty (1987)
<i>Rhinella schneideri</i> (25°C)	19,6	2,90	40,5	Zena et al. (2015)
<i>Salvator merianae</i> (inverno; 25°C)	17,4	8,54	138,7	Zena et al. (2016a)
<i>Salvator merianae</i> (primavera-verão; 25°C)	20,1	7,76	94,3	Zena et al. (2016a)
<i>Xenopus laevis</i> (21°C)	14,3	1,80	33,6	Hedrick et al. (2015)

Observações: (1) as temperaturas apresentadas para os animais endotérmicos são relativas às suas temperaturas corporais; (2) todos os estudos mencionados utilizaram o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide; (3) como alguns estudos não apresentaram o coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide descritora do barorreflexo ( $B$ ), o  $G_{N2}$  de algumas espécies não puderam ser obtidos.

De forma análoga ao controle barorreflexo cardiovascular, o controle barorreflexo ventilatório também consiste em alterações reflexas nas variáveis ventilatórias inversamente proporcionais às mudanças ocorridas na pressão arterial dos animais (ALTIMIRAS et al., 1998; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b). Esse segundo ajuste reflexo é menos investigado e compreendido que o primeiro, e mesmo com a ampla gama de evidências experimentais adquiridas em tetrápodes acerca da sensibilidade do gerador central do ritmo respiratório às informações aferentes barorreceptoras, a significância fisiológica do controle barorreflexo da ventilação ainda é incerta e especulativa (MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b).

O presente estudo constatou uma clara resposta ventilatória às administrações do doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio, mas não às administrações do agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina. As respostas ventilatórias ao nitroprussiato de sódio foram inversamente proporcionais às reduções pressóricas observadas (Figuras 4B, D, 5B, F, H, J, L, 7A-D e 8A-D; Tabela 2), de acordo com o padrão reportado para tetrápodes (ALTIMIRAS et al., 1998; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b). No entanto, caso o controle barorreflexo da ventilação estivesse presente em *P. hypophthalmus*, seria esperada uma redução nas variáveis ventilatórias durante as situações de hipertensão arterial geradas pelas infusões de fenilefrina, a qual não foi verificada (Figuras 4A, C, 5A, E, G, I, K, 7A-D e 8A-D; Tabela 2). O  $R^2$  das correlações entre a  $P_{VA}$  média e as variáveis ventilatórias corroboram essas observações, demonstrando que as alterações ventilatórias estão mais associadas à hipotensão que à hipertensão arterial (Tabela 2) – com exceção dos ERA, que exibiram associação mais consistente à hipertensão porque tal variável permaneceu zerada na maioria dos animais após as administrações de fenilefrina (Figura 7A-D).

Diferentemente das respostas cardíacas, as respostas ventilatórias promovidas pelo nitroprussiato de sódio em *P. hypophthalmus* não foram abolidas após a realização do bloqueio autonômico com atropina e propranolol (Tabela 4). Isso indica que o controle barorreflexo da  $f_H$  é mediado por receptores muscarínicos colinérgicos e/ou  $\beta$ -adrenérgicos nesses animais, enquanto que as respostas ventilatórias observadas são mediadas por receptores distintos – assim como em tetrápodes (ALTIMIRAS et al., 1998; HAGENSEN et al., 2010; MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b). Adicionalmente, considerando que a fenilefrina não está associada a alterações ventilatórias (Figuras 4A, C, 5A, E, G, I, K, 7A-D e 8A-D; Tabelas 2 e 4), pode-se descartar também a participação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos na mediação das respostas ventilatórias ao nitroprussiato de sódio.

Em *Danio rerio*, o nitroprussiato de sódio altera a ventilação, e seu subproduto óxido nítrico é produzido endogenamente nas células putativas de detecção de oxigênio (células neuroepiteliais) (PORTEUS et al. 2015). Mas em contraste com a estimulação que esse fármaco promoveu na ventilação de *P. hypophthalmus*, a administração de nitroprussiato de sódio promoveu uma inibição na ventilação de *D. rerio* (PORTEUS et al. 2015). Os mecanismos periféricos e centrais pelos quais o óxido nítrico modula a ventilação em teleósteos permanecem completamente desconhecidos (PORTEUS et al. 2015) e, portanto, é possível apenas pressupor a causa dessa divergência de constatações. Porteus et al. (2015) supõem que o óxido nítrico possui uma função inibitória nas células quimiorreceptoras periféricas de *D. rerio*, ou que essa molécula apresenta múltiplas influências periféricas e centrais distintas (inibitórias e excitatórias) cujo balanço final após uma administração sistêmica de doador de óxido nítrico resulta em hipoventilação. Com base nessa análise ainda superficial, pode-se cogitar que o óxido nítrico possui efeitos contrários em *P. hypophthalmus*.

Também é concebível que a hipotensão arterial causada pelo nitroprussiato de sódio tenha ampliado a ventilação dos animais de forma indireta, estimulando quimiorreceptores de oxigênio por meio de uma hipoxemia derivada da redução da pressão de perfusão branquial (ALTIMIRAS et al., 1998; ZENA et al., 2016b). Ainda, levando em conta que um dos subprodutos da degradação do nitroprussiato de sódio em sistemas biológicos é o bloqueador da cadeia respiratória cianeto de hidrogênio, é possível que as administrações desse fármaco tenham estimulado diretamente quimiorreceptores de oxigênio e ampliado a ventilação dos animais (BATES et al., 1991; THOMSEN et al., 2017). Ressalta-se que, em tetrápodes, as respostas ventilatórias às infusões de nitroprussiato de sódio são totalmente independentes do quimiorreflexo (MCMULLAN E PILOWSKY, 2010; ZENA et al., 2016b). Tais circunstâncias permitem inferir que as respostas ventilatórias observadas em *P. hypophthalmus* no presente estudo não podem ser atribuídas ao reflexo barorreceptor, principalmente ao ponderar a ausência de respostas ventilatórias às repetidas situações de hipertensão arterial promovidas pelas administrações de fenilefrina. Assim, pode-se concluir que o teleósteo em questão não apresenta um componente respiratório no barorreflexo.

## 5 – CONCLUSÕES

A presente investigação demonstrou que *P. hypophthalmus* exibe um barorreflexo cardíaco tão responsivo quanto o de tetrápodes, indicando que tal ajuste fisiológico é altamente conservado em vertebrados. Ademais, os resultados do presente estudo demonstraram que a espécie em questão não apresenta um componente respiratório no reflexo barostático, e apesar de tal achado não ser necessariamente representativo de todos os teleósteos, o mesmo sugere que o controle barorreflexo da ventilação evoluiu há menos de 450 milhões de anos – após a dicotomia Actinopterygii-Sarcopterygii.

## 6 – REFERÊNCIAS

- ALTIMIRAS, J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 447-460, 1999.
- ALTIMIRAS, J.; FRANKLIN, C. E.; AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2235-2242, 1998.
- AMEMIYA, C. T.; ALFÖLDI, J.; LEE, A. P.; FAN, S.; PHILIPPE, H.; MACCALLUM, I.; BRAASCH, I.; MANOUSAKI, T.; SCHNEIDER, I.; ROHNER, N.; ORGAN, C.; CHALOPIN, D.; SMITH, J. J.; ROBINSON, M.; DORRINGTON, R.; GERDOL, M.; AKEN, B.; BISCOTTI, M. A.; BARUCCA, M.; BAURAIN, D.; BERLIN, A. M.; BLATCH, G. L.; BUONOCORE, F.; BURMESTER, T.; CAMPBELL, M. S.; CANAPA, A.; CANNON, J. P.; CHRISTOFFELS, A.; DE MORO, G.; EDKINS, A. L.; FAN, L.; FAUSTO, A. M.; FEINER, N.; FORCONI, M.; GAMIELDIEN, J.; GNERRE, S.; GNIRKE, A.; GOLDSTONE, J. V.; HAERTY, W.; HAHN, M. E.; HESSE, U.; HOFFMANN, S.; JOHNSON, J.; KARCHNER, S. I.; KURAKU, S.; LARA, M.; LEVIN, J. Z.; LITMAN, G. W.; MAUCELI, E.; MIYAKE, T.; MUELLER, M. G.; NELSON, D. R.; NITSCHKE, A.; OLMO, E.; OTA, T.; PALLAVICINI, A.; PANJI, S.; PICONE, B.; PONTING, C. P.; PROHASKA, S. J.; PRZYBYLSKI, D.; SAHA, N. R.; RAVI, V.; RIBEIRO, F. J.; SAUKA-SPENGLER, T.; SCAPIGLIATI, G.; SEARLE, S. M. J.; SHARPE, T.; SIMAKOV, O.; STADLER, P. F.; STEGEMAN, J. J.; SUMIYAMA, K.; TABBAA, D.; TAFER, H.; TURNER-MAIER, J.; VAN HEUSDEN, P.; WHITE, S.; WILLIAMS, L.; YANDELL, M.; BRINKMANN, H.; VOLFF, J. N.; TABIN, C. J.; SHUBIN, N.; SCHARTL, M.; JAFFE, D. B.; POSTLETHWAIT, J. H.; VENKATESH, B.; DI PALMA, F.; LANDER, E. S.; MEYER, A.; LINDBLAD-TOH, K. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. **Nature**, v. 496, p. 311-316, 2013.
- AXELSSON, M.; FRITSCHKE, R. Cannulation techniques. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes: Analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 1994. v. 3, p. 17-36.
- BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60, p. 121-162, 1985.
- BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA, R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue – Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. S157–S165, 1991.
- BIANCHI-DA-SILVA, L. M.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. Baroreceptor control of heart rate in the awake toad: peripheral autonomic effectors and arterial baroreceptor areas. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 80, p. 31-39, 2000.
- BUTLER, P. J.; JONES, D. R. The comparative physiology of diving in vertebrates. In: LOWENSTEIN, O. E. (Ed.). **Advances in comparative physiology and biochemistry**. New York: Academic Press, 1982, v. 8, p. 179-364.
- CROSSLEY II, D. A.; HICKS, J. W.; ALTIMIRAS, J. Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 2895-2902, 2003.

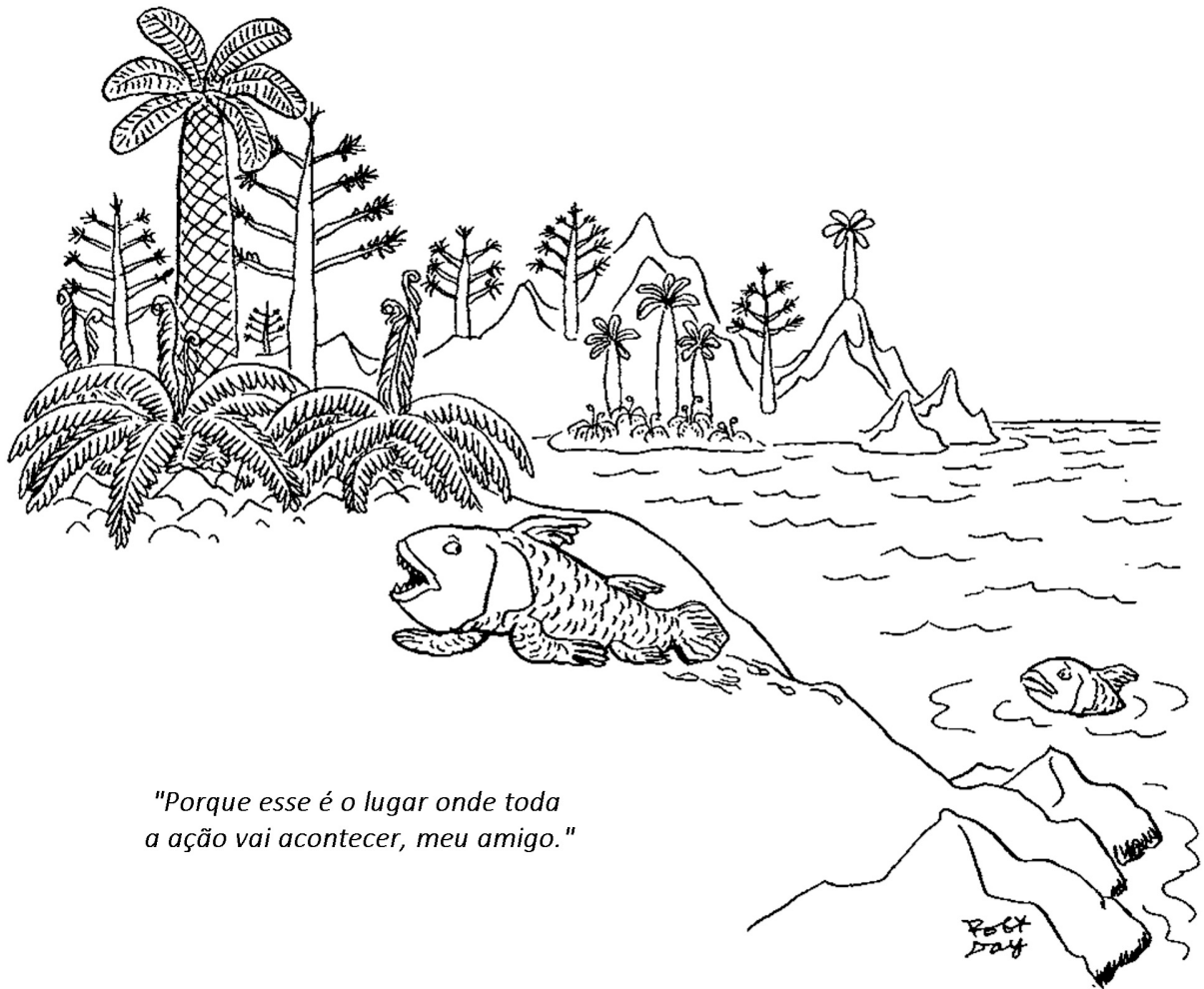
- DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 323-364, 1994.
- DAMSGAARD, C.; THOMSEN, M. T.; BAYLEY, M.; WANG, T. Air-breathing changes the pattern for temperature-induced pH regulation in a bimodal breathing teleost. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 188, p. 451-459, 2018.
- FARRELL, A. P. Cardiovascular responses in the sea raven, *Hemitripterus americanus*, elicited by vascular compression. **Journal of Experimental Biology**, v. 122, p. 65-80, 1986.
- GRAHAM, J.B. **Air breathing fishes: evolution, diversity and adaptation**. San Diego: Academic Press, 1997.
- HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 458-462, 2010.
- HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 21, p. 203-213, 1987.
- HEDRICK, M. S.; HILLMAN, S. S.; DREWES, R. C.; WITHERS, P. C. Lymphatic regulation in nonmammalian vertebrates. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, p. 297-308, 2013
- HEDRICK, M. S.; MCNEW, K. A.; CROSSLEY II, D. A. Baroreflex function in anurans from different environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 144-148, 2015.
- IVERSEN, N. K.; DUPONT-PRINET, A.; FINDORF, I.; MCKENZIE, D. J.; WANG, T. Autonomic regulation of the heart during digestion and aerobic swimming in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 463-468, 2010.
- JONES, D. R.; MILSOM, W. K. Peripheral receptors affecting breathing and cardiovascular function in non-mammalian vertebrates. **Journal of Experimental Biology**, v. 100, p. 59-91, 1982.
- KENT, B. B.; DRANE, J. W.; BLUMENSTEIN, B.; MANNING, J. W. A mathematical model to assess changes in the baroreceptor reflex. **Cardiology**, v. 57, p. 295-310, 1972.
- MADDISON, D. R.; SCHULZ, K. S. **The Tree of Life Web Project**. Internet address: <http://tolweb.org>, 2007.
- MCMULLAN, S.; PILOWSKY, P. M. The effects of baroreceptor stimulation on central respiratory drive: a review. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 174, p. 37-42, 2010.
- MILSOM, W. K.; BURLESON, M. L. Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 157, p. 4-11, 2007.

- PORTEUS, C. S.; POLLACK, J.; TZANEVA, V.; KWONG, R. W. M.; KUMAI, Y.; ABDALLAH, S. J.; ZACCONE, G.; LAURIANO, E. R.; MILSOM, W. K.; PERRY, S. F. A role for nitric oxide in the control of breathing in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 3746-3753, 2015.
- REID, I. A. Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. **News in Physiological Science**, v. 11, p. 270-274, 1996.
- RIEHL, R.; BAENSCH, H. A. **Aquarien atlas**. Melle: Verlag für Natur-und Heimtierkunde, 1996.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 821-829, 2005.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Autonomic control of circulation in fish: A comparative view. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 165, p. 127-139, 2011.
- SANDBLOM, E.; EKSTRÖM, A.; BRIJS, J.; SUNDSTRÖM, L. F.; JUTFELT, F.; CLARK, T. D.; ADILL, A.; AHO, T.; GRÄNS, A. Cardiac reflexes in a warming world: thermal plasticity of barostatic control and autonomic tones in a temperate fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 2880-2887, 2016.
- SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 179, p. 1-56, 2009.
- SUNDELL, E.; MORGENROTH, D.; BRIJS, J.; EKSTRÖM, A.; GRÄNS, A.; SANDBLOM, E. Seawater acclimation affects cardiac output and adrenergic control of blood pressure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-implications for salinity variations now and in the future. **Conservation Physiology**, v. 22, p. coy061, 2018.
- TEIXEIRA, M. T.; ARMELIN, V. A.; ABE, A. S.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H. Autonomic control of post-air-breathing tachycardia in *Clarias gariepinus* (Teleostei: Clariidae). **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 185, p. 669-676, 2015.
- THOMSEN, M. T.; WANG, T.; MILSOM, W. K.; BAYLEY, M. Lactate provides a strong pH-independent ventilatory signal in the facultative air-breathing teleost *Pangasianodon hypophthalmus*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 6378, 2017.
- VAN VLIET, B. N.; WEST, N. H. Phylogenetic trends in the baroreceptor control of arterial blood pressure. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1284-1304, 1994.
- ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 81-88, 2015.
- ZENA, L. A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; BÍCEGO, K. C. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 725-733, 2016a.
- ZENA, L. A.; SILVA, G. S. F.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Baroreflex regulation affects ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 3605-3615, 2016b.

## **CAPÍTULO 3**

---

**O REFLEXO BAROSTÁTICO EM TELEÓSTEOS DE DIFERENTES HABITATS:  
A INFLUÊNCIA DA TERRESTRIALIDADE NA EVOLUÇÃO DO BARORREFLEXO**



"Porque esse é o lugar onde toda a ação vai acontecer, meu amigo."

Charge de Robert Day, publicada na *The New Yorker Magazine* em 1966.



**Periódico alvo:** *Current Biology (Research Article)*.

## RESUMO

A pressão arterial ( $P_A$ ) é uma variável fundamental para o estabelecimento do fluxo sanguíneo nos animais, a qual deve ser suficientemente elevada para manter a perfusão tecidual e suficientemente reduzida para evitar lesões orgânicas. Tais demandas por valores pressóricos adequados selecionaram eficientes mecanismos de controle dessa variável em vertebrados. O barorreflexo consiste no principal mecanismo de controle rápido da  $P_A$  nesses animais, em que alterações pressóricas são detectadas por barorreceptores que desencadeiam mudanças inversamente proporcionais na frequência cardíaca e na resistência vascular sistêmica, restaurando a  $P_A$ . No ambiente terrestre, além das perturbações pressóricas inerentes às atividades diárias dos indivíduos, os animais também estão sujeitos às influências hemodinâmicas gravitacionais – geralmente caracterizadas pela ocorrência de acúmulos sanguíneos no corpo inferior que promovem uma redução do retorno venoso, enchimento cardíaco, volume sistólico, débito cardíaco e  $P_A$ . Já no ambiente aquático, tais eventos não acontecem porque a pressão hidrostática circundante previne distensões vasculares e acúmulos sanguíneos. Nesse cenário, o presente estudo testou a hipótese de que as perturbações hemodinâmicas gravitacionais relacionadas à terrestrialidade constituíram uma pressão seletiva relevante na evolução de um barorreflexo mais sensível em vertebrados. Para isso, foram analisadas a sensibilidade barorreflexa e os potenciais regulatórios para bradicardia/taquicardia barorreflexas em teleósteos estritamente aquáticos e teleósteos que realizam incursões terrestres – cuja ancestralidade comum é desassociada da terrestrialidade para evitar possível falso negativo derivado da homologia do barorreflexo. Os resultados corroboraram a hipótese, demonstrando que teleósteos que realizam incursões terrestres apresentam maior sensibilidade barorreflexa e potencial regulatório para taquicardia barorreflexa que teleósteos estritamente aquáticos.

**Palavras-chave:** Barorreflexo. *Clarias gariepinus*. Gravidade. *Hoplerythrinus unitaeniatus*. *Hoplías malabaricus*. *Oreochromis niloticus*. Pressão arterial. Terrestrialidade.

## ABSTRACT

Arterial pressure ( $P_A$ ) is a fundamental variable for the establishment of blood flow in all animals, which must be sufficiently high to maintain tissue perfusion and sufficiently low to avoid organic lesions. Such demands for adequate  $P_A$  selected efficient mechanisms for the regulation of this variable in vertebrates. The baroreflex is the main short-term  $P_A$  regulator in these animals, in which pressoric changes are detected by baroreceptors that initiate inversely proportional changes in heart rate and systemic vascular resistance, restoring  $P_A$ . In terrestrial environments, in addition to the pressoric disturbances inherent to daily activities, animals are also subjected to the gravitational effects on hemodynamics – usually characterized by the occurrence of blood pooling in the lower body that promotes reductions in venous return, cardiac filling, cardiac output and  $P_A$ . Differently, in aquatic environments, such events do not occur because the surrounding hydrostatic pressure prevents vascular distensions and blood pooling. Given this background, the present study tested the hypothesis that gravity-induced hemodynamic disturbances associated with terrestriality constituted a relevant driving force for the evolution of a more sensitive baroreflex in vertebrates. To do so, the baroreflex sensitivity and the regulatory potentials for baroreflex bradycardia/tachycardia were analyzed in teleosts that are strictly aquatic and teleosts that perform terrestrial incursions – whose common ancestry are disassociated from terrestriality to avoid a possible false negative derived from the baroreflex homology. The results corroborated the hypothesis, demonstrating that teleosts that perform terrestrial incursions present greater baroreflex sensitivity and regulatory potential for baroreflex tachycardia than strictly aquatic teleosts.

**Keywords:** Arterial pressure. Baroreflex. *Clarias gariepinus*. Gravity. *Hoplerythrinus unitaeniatus*. *Hoplias malabaricus*. *Oreochromis niloticus*. Terrestriality.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Traçados originais da pressão arterial na aorta ventral ( $P_{VA}$ ), da pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) e da frequência cardíaca ( $f_H$ ) de um indivíduo representativo de *H. malabaricus*, anteriormente e posteriormente à infusão de fenilefrina (Fe;  $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; A-C) e nitroprussiato de sódio (NPS;  $80 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; D-F). Fonte: o autor.....71

**Figura 2.** Pressão arterial média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ; A, B), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ; C, D), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ; E, F) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ; G, H) anteriormente e posteriormente as administrações das diferentes doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor. ....72

**Figura 3.** Frequência cardíaca ( $f_H$ ) de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ; A, B), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ; C, D), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ; E, F) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ; G, H) anteriormente e posteriormente as administrações das diferentes doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.....72

**Figura 4.** Curvas sigmóides barorreflexas individuais de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ; A), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ; B), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ; C) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ; D). Símbolos diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos.  $P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca. Fonte: o autor.....73

**Figura 5.** Curvas sigmóides barorreflexas médias de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ; vermelha clara; círculos), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ; azul escura; quadrados), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ; vermelha escura; losangos) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ; azul clara; triângulos). Símbolos pretos correspondem às variáveis basais; símbolos cinza correspondem às respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo.  $P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.....73

**Figura 6.** Representação esquemática das arquiteturas cardiovasculares de teleósteos que apresentam respiração exclusivamente aquática (A), respiração aérea através de epitélio branquial especializado (B) e respiração aérea através de bexiga natatória (C). Fonte: adaptada de Johansen (1970). ....78

**Figura 7.** Ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ; A) e ganho barorreflexo normalizado ( $G_{N1}$ ;  $G_{N2}$ ; B, C) de teleósteos e tetrápodes em repouso mantidos em temperaturas compreendidas dentro de suas respectivas faixas ótimas. As temperaturas apresentadas para os animais endotérmicos são relativas às suas temperaturas corporais. Todos os estudos mencionados utilizaram o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide. Reitera-se que, como alguns estudos não apresentaram o coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide descritora do barorreflexo (B), o  $G_{N2}$  de algumas espécies não puderam ser calculados. As curvas de tendência que descrevem a distribuição do  $G_{50}$ ,  $G_{N1}$  e  $G_{N2}$  das diferentes espécies pertencentes aos variados táxons do subfilo Vertebrata tratam-se de regressões log-normal (A:  $R^2 = 0,73$ ; B:  $R^2 = 0,27$ ; C:  $R^2 = 0,52$ ). NRIT: não realizam incursões terrestres; RIT: realizam incursões terrestres. Fonte: o autor. ....80

**Figura 8.** Potencial regulatório para bradicardia barorreflexa (PRB; A) e potencial regulatório para taquicardia barorreflexa (PRT; B) de teleósteos e tetrápodes em repouso mantidos em temperaturas compreendidas dentro de suas respectivas faixas ótimas. As temperaturas apresentadas para os animais endotérmicos são relativas às suas temperaturas corporais. Todos os estudos mencionados utilizaram o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide. As curvas de tendência que descrevem a distribuição do PRB e PRT das diferentes espécies pertencentes aos variados táxons do subfilo Vertebrata tratam-se de regressões polinomiais de segunda ordem (quadráticas; A:  $R^2 = 0,62$ ; B:  $R^2 = 0,62$ ). NRIT: não realizam incursões terrestres; RIT: realizam incursões terrestres. Fonte: o autor.....81

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variáveis cardiovasculares basais e variáveis barorreflexas derivadas das curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ). .....74
- Tabela 2.** Variáveis cardiovasculares de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ) anteriormente e posteriormente administração intrarterial de solução salina (0,9% NaCl). .....75
- Tabela 3.** Pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$ ) de *C. gariepinus* ( $N = 4$ ), *H. malabaricus* ( $N = 4$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 4$ ) e *O. niloticus* ( $N = 4$ ) sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). .....76
- Tabela 4.** Frequência cardíaca ( $f_H$ ) de *C. gariepinus* ( $N = 4$ ), *H. malabaricus* ( $N = 4$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 4$ ) e *O. niloticus* ( $N = 4$ ) sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). .....76

## LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b><i>B</i></b>	Coefficiente angular
<b><i>f<sub>H</sub></i></b>	Frequência cardíaca
<b><i>G<sub>50</sub></i></b>	Ganho máximo do barorreflexo
<b><i>G<sub>N1</sub></i></b>	<i>G<sub>50</sub></i> normalizado em relação as variáveis cardiovasculares basais
<b><i>G<sub>N2</sub></i></b>	Ganho barorreflexo em porcentagem da mudança na <i>f<sub>H</sub></i> por alteração pressórica unitária
<b>MÁX</b>	<i>f<sub>H</sub></i> máxima atingida pelo barorreflexo
<b>MÍN</b>	<i>f<sub>H</sub></i> mínima atingida pelo barorreflexo
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b><i>PO<sub>2</sub></i></b>	Pressão parcial de oxigênio
<b>PRB</b>	Potencial regulatório para bradicardia barorreflexa
<b>PRT</b>	Potencial regulatório para taquicardia barorreflexa
<b><i>P<sub>VA</sub></i></b>	Pressão arterial na aorta ventral
<b><i>P<sub>VA</sub> média<sub>50</sub></i></b>	<i>P<sub>VA</sub></i> média no centro da curva sigmóide
<b><i>R<sup>2</sup></i></b>	Coefficiente de determinação

## 1 – INTRODUÇÃO

A vida no ambiente terrestre é intrinsecamente relacionada às influências da força fundamental da gravidade, a qual impõe diversas demandas aos organismos, principalmente associadas à resistência musculoesquelética e à distribuição de fluidos corporais. Nesse ambiente, colunas verticais de sangue exercem uma pressão hidrostática gravitacional que dilata a vasculatura venosa do corpo inferior, promovendo acúmulos sanguíneos e uma redução sincrônica do retorno venoso, enchimento cardíaco, volume sistólico, débito cardíaco e pressão arterial (LILLYWHITE, 1996; MOREY-HOLTON, 2003). Ademais, a pressão arterial central dos animais precisa superar a pressão hidrostática das colunas de sangue estabelecidas na vasculatura supracardíaca para manter a circulação sanguínea, uma demanda difícil de atender em momentos de reduzido retorno venoso (SEYMOUR et al., 1993). No ambiente aquático, por outro lado, os gradientes de pressão hidrostática das colunas de sangue são contrabalanceados pelos gradientes de pressão hidrostática da água circundante, prevenindo distensões vasculares e neutralizando as influências da gravidade na hemodinâmica (LILLYWHITE, 1996).

É sabido que as perturbações hemodinâmicas gravitacionais estão correlacionadas à evolução de caracteres morfofisiológicos adaptativos capazes de amenizar a ocorrência de acúmulos sanguíneos no corpo inferior e favorecer a circulação sanguínea (LILLYWHITE, 1987; LILLYWHITE, 1996). Girafas, por exemplo, exibem pressão arterial elevada o suficiente para superar a pressão hidrostática exercida pela coluna de sangue estabelecida no pescoço e manter a perfusão cefálica (GOETZ et al., 1960). Esses animais também apresentam reduzida complacência vascular e permeabilidade capilar no corpo inferior, que auxilia no retorno venoso e impede a formação de edemas ocasionados pela alta pressão arterial (HARGENS et al., 1987; PETERSEN et al., 2013).

Similarmente, serpentes arborícolas e terrestres exibem pressão arterial mais elevada que suas congêneres semiaquáticas e aquáticas, característica que contribui para a manutenção do fluxo sanguíneo cefálico no meio terrestre mesmo em situações de ortostase (SEYMOUR E LILLYWHITE, 1976; LILLYWHITE, 1987; LILLYWHITE, 1996). Ainda, pele firmemente aderida ao corpo e reduzida complacência tecidual subcutânea, que impedem acúmulos sanguíneos e formação de edemas, também são particularidades de serpentes arborícolas (LILLYWHITE E SMITS, 1992; LILLYWHITE E HENDERSON, 1993; LILLYWHITE, 1993). Por último, estudos prévios já demonstraram que espécies cuja história evolutiva é associada ao estresse hemodinâmico gravitacional apresentam inervação vascular mais vasta e reatividade vasomotora superior (LILLYWHITE E DONALD, 1994; PETERSEN et al., 2013).

Apesar das adaptações supracitadas, a hipotensão gravitacional é uma condição comum em organismos terrestres, e frequentemente o reflexo barostático é engatilhado como forma de contrapor esse fenômeno em última instância (OGILVY E DUBOIS, 1982; LILLYWHITE, 1996). O barorreflexo consiste em um mecanismo de retroalimentação negativa, em que alterações pressóricas são detectadas por barorreceptores que transmitem informações aferentes a núcleos integradores centrais que, por sua vez, promovem mudanças inversamente proporcionais na frequência cardíaca ( $f_H$ ) e resistência vascular sistêmica que restauram a pressão arterial (BAGSHAW, 1985; VAN VLIET E WEST, 1994). Esse reflexo é essencial para a regulação da pressão arterial na maioria dos vertebrados, e apresenta grande significância fisiológica na contraposição dos efeitos da gravidade na hemodinâmica nesses animais (OGILVY E DUBOIS, 1982; LILLYWHITE, 1996; SEYMOUR et al., 2004; ARMELIN et al., 2014; TROIANO et al., 2018).

Hedrick et al. (2015) compararam a função barorreflexa de anuros terrestres e aquáticos (*Rhinella marina*, *Lithobates catesbeianus* e *Xenopus laevis*) e não constataram diferenças significativas entre a sensibilidade barorreflexa (magnitude da resposta na  $f_H$  por alteração unitária na pressão arterial, também conhecida como ganho barorreflexo) dessas espécies. Com base nesses dados, Hedrick et al. (2015) concluíram que a terrestrialidade *per se* não representa uma força motriz significativa na evolução da função barorreflexa em anuros. É razoável que Hedrick et al. (2015) não observaram diferenças no ganho barorreflexo de anuros terrestres e aquáticos por dois motivos: (1) as espécies estudadas herdaram similar função barorreflexa de um ancestral comum de habitat terrestre ou anfíbio, com história evolutiva associada às influências da gravidade na hemodinâmica (homologia; ZARDOYA E MEYER, 2001); ou (2) mesmo apresentando um nível de terrestrialidade muito limitado (MEASEY, 1998), o anuro aquático *X. laevis* foi exposto ao estresse hemodinâmico gravitacional durante sua trajetória evolutiva o suficiente para possibilitar a seleção de uma função barorreflexa semelhante à de seus congêneres terrestres (homoplasia).

À luz dessas informações, o presente estudo testou a hipótese de que as perturbações hemodinâmicas gravitacionais relacionadas à terrestrialidade constituíram uma pressão seletiva relevante na evolução de um reflexo barostático mais sensível em vertebrados, utilizando como modelos experimentais teleósteos estritamente aquáticos e teleósteos capazes de realizar incursões terrestres de longa duração, cuja ancestralidade comum não têm ligação com o ambiente terrestre (GRAHAM, 1997; AMEMIYA et al., 2013; NELSON et al., 2016).



Como espécies estritamente aquáticas foram investigadas a traíra (*Hoplias malabaricus*; Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) e a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*; Acanthopterygii: Cichliformes: Cichlidae). A primeira é uma espécie sul-americana sedentária e solitária, que não apresenta respiração aérea e vive em ambientes lênticos (PAIVA, 1972; RANTIN et al., 1993; SABINO E ZUANON, 1998; PETRY et al., 2007), enquanto que a segunda é uma espécie africana ativa e social, que não exibe respiração aérea e vive tanto em ambientes lênticos quanto lóticos (BEVERIDGE E MCANDREW, 2000). Já como espécies capazes de realizar incursões terrestres foram investigados o jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*; Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) e o bagre-africano (*Clarias gariepinus*; Ostariophysi: Siluriformes: Clariidae). *H. unitaeniatus* é uma espécie sul-americana ativa e possivelmente social, que exibe respiração aérea acessória via bexiga natatória, vive predominantemente em ambientes lênticos e é capaz de realizar incursões terrestres prolongadas (KRAMER et al., 1978; PACE E GIBB, 2014). *C. gariepinus*, por sua vez, é uma espécie africana social e ativa, que exibe respiração aérea acessória via órgão arbóreo suprabranquial, vive em ambientes lênticos e é capaz de realizar incursões terrestres por longos períodos (BRUTON, 1979; PACE E GIBB, 2014; MCKENZIE et al., 2016).

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – OS ANIMAIS

Espécimes de *C. gariepinus* (Burchell, 1822;  $N = 6$ ;  $303,3 \pm 25,2$  g, média  $\pm$  EPM), *H. malabaricus* (Bloch, 1794;  $N = 8$ ;  $227,0 \pm 15,8$  g), *H. unitaeniatus* (Spix e Agassiz, 1829;  $N = 5$ ;  $215,0 \pm 18,7$  g) e *O. niloticus* (Linnaeus, 1758;  $N = 8$ ;  $249,1 \pm 15,2$  g), de ambos os sexos, foram adquiridos em pisciculturas localizadas na região de São José do Rio Preto (São Paulo, Brasil). Os animais passaram por um período de aclimação mínimo de um mês em tanques de 500 l sob fotoperíodo natural, abastecidos com água declorada, constantemente aerada com ar atmosférico (pressão parcial de oxigênio –  $PO_2$  – de  $\sim 18$  kPa), com potencial hidrogeniônico (pH) de 6,5 e temperatura de  $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  (média  $\pm$  EPM). A água dos tanques foi substituída a cada 72 h e cada espécie foi mantida em um tanque de manutenção dedicado.

Os animais foram alimentados até a saciedade em dias alternados com pedaços de coração bovino (*H. unitaeniatus* e *H. malabaricus*) ou ração comercial para peixes (32% de proteína; *C. gariepinus* e *O. niloticus*). A alimentação dos mesmos foi suspensa 72 h antes do início dos experimentos para deter a eliminação de fezes nas câmaras experimentais e

impedir a ocorrência de alterações cardiovasculares associadas à digestão (SECOR, 2009; IVERSEN et al., 2010). Além disso, para evitar vieses derivados de variações circadianas e sazonais nas variáveis fisiológicas estudadas (ALTIMIRAS, 1999; ZENA et al., 2016a), os experimentos foram realizados pela manhã (das 7h às 12h) durante as estações da primavera e verão (setembro a março). A presente etapa da pesquisa foi desenvolvida na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), mais especificamente no Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados do Departamento de Zoologia e Botânica. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição supracitada (Protocolo 144/2016) e conduzidos de acordo com os regulamentos e diretrizes éticas vigentes no Brasil.

## 2.2 – FÁRMACOS

Benzocaína (anestésico), cloridrato de fenilefrina (agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico), sulfato de atropina (antagonista muscarínico) e cloridrato de propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). Heparina sódica (anticoagulante) foi adquirida da Cristália (Itapira, São Paulo, Brasil). Todos os fármacos foram preparados no momento do uso e dissolvidos em água (benzocaína) ou solução salina estéril (0,9% NaCl) (demais compostos).

## 2.3 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS

Inicialmente, os animais foram anestesiados por submersão em solução aquosa de benzocaína ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Ao apresentarem perda de equilíbrio e ausência de movimentos operculares, os mesmos foram transferidos para uma mesa cirúrgica com um sistema de recirculação de solução de benzocaína ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) constantemente aerada, a qual irrigava as brânquias dos animais constantemente para manter as trocas gasosas e a anestesia. Após, uma cânula de polietileno (PE 50) preenchida com solução salina heparinizada ( $100 \text{ UI.ml}^{-1}$ ; 0,9% NaCl) foi inserida na artéria branquial aferente do terceiro arco branquial esquerdo dos animais, avançada em direção à aorta ventral, e fixada por meio de uma ligadura em volta de um flange e do arco branquial (AXELSSON E FRITSCHKE, 1994; SUNDIN et al., 2000). Devido à reduzida abertura opercular, não foi possível acessar a aorta ventral através do terceiro arco branquial em *C. gariepinus*, portanto, tal procedimento foi realizado por meio do primeiro arco branquial nesses animais.

Subsequentemente, os animais foram ventilados com água isenta de benzocaína até a recuperação da anestesia, e então foram transferidos para câmaras experimentais individuais (20 l) abastecidas com água sem cloro, constantemente aerada com ar atmosférico ( $PO_2 \sim 18$  kPa), com pH de 6,5 e temperatura de  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (média  $\pm$  EPM; compreendida dentro das faixas ótimas de todas as espécies estudadas; MOOR E BRUTON, 1988; PHILIPPART E RUWET, 1982; BAENSCH E RIEHL, 1985; RIEHL E BAENSCH, 1991). Todos os procedimentos supracitados foram realizados em  $\sim 15$  min, e os animais passaram por um período de recuperação pós-cirúrgica de 24 h anteriormente ao início dos experimentos.

#### 2.4 – AQUISIÇÃO DAS VARIÁVEIS CARDIOVASCULARES

No dia seguinte, após a recuperação pós-cirúrgica, a cânula aórtica foi conectada à um transdutor de pressão (BIOPAC SS13L, Goleta, Califórnia, EUA), previamente calibrado por meio de uma coluna estática de água, para adquirir continuamente valores de pressão à 1000 Hz utilizando um sistema de aquisição de dados BIOPAC MP36 (BIOPAC Systems, Goleta, Califórnia, EUA). Dessa forma, a cânula aórtica permitiu tanto a realização de administrações farmacológicas quanto a aquisição da pressão arterial na aorta ventral ( $P_{VA}$ ) dos indivíduos – a qual foi utilizada para avaliar a pressão arterial média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média; kPa) e a  $f_H$  (bpm) dos mesmos. A  $P_{VA}$  média foi calculada como a média aritmética do sinal da  $P_{VA}$ , e a  $f_H$  foi calculada através da contagem dos pulsos existentes no sinal da  $P_{VA}$ .

#### 2.5 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  dos animais foram coletadas até que permanecessem estáveis por 30 min (valores basais) e, então,  $2 \text{ ml.kg}^{-1}$  de solução salina (0,9% NaCl) foi administrada via cânula aórtica para investigar possíveis influências de alterações volêmicas nas variáveis estudadas. Subsequentemente, oito administrações seriadas e crescentes de cloridrato de fenilefrina (Sigma-Aldrich; 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e de nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich; 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) foram realizadas *in bolus* na aorta ventral dos animais para aquisição das respostas cardiovasculares à tais fármacos vasoativos (os quais induzem hipertensão e hipotensão arterial, respectivamente). Cada administração foi seguida de um *flush* de 0,2 ml de solução salina heparinizada (100 UI. $\text{ml}^{-1}$ ; 0,9% NaCl) para que os fármacos não permanecessem estagnados no interior da cânula. Além disso, entre uma administração farmacológica e outra, foi aguardado tempo suficiente para que a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  retornassem aos valores basais (o que geralmente ocorria dentro de 30 min, exceto quando as doses mais elevadas eram aplicadas).

Considerando que a regulação barorreflexa da pressão arterial é mediada pelo sistema nervoso autônomo em vertebrados (BAGSHAW, 1985; ALTIMIRAS, 1999; ARMELIN et al., 2014; SANDBLOM et al., 2016; ZENA et al., 2016a), um teste para viabilizar a confirmação da natureza barorreflexa das respostas cardíacas estudadas foi realizado logo após a aquisição dos dados referentes à última administração de fármaco vasoativo. Nesse teste, quatro indivíduos de cada espécie foram submetidos a um duplo bloqueio autonômico cardíaco estabelecido por meio da administração conjunta de sulfato de atropina ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ;  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) e de cloridrato de propranolol ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ;  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) via cânula aórtica. Então, após 60 min para que a atropina e o propranolol exercessem seus efeitos (ALTIMIRAS et al., 1997; EKSTRÖM et al., 2016), a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  dos animais foram coletadas até que permanecessem estáveis por mais 30 min antes da realização de uma administração de cloridrato de fenilefrina ( $40 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ ;  $100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e uma administração de nitroprussiato de sódio ( $80 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ ;  $200 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) para aquisição das respostas cardiovasculares à hipertensão e hipotensão arterial. Novamente, entre uma administração de fármaco vasoativo e outra, foi aguardado tempo suficiente para que as variáveis estudadas retornassem aos valores observados anteriormente à administração de fenilefrina.

## 2.6 – AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO CARDÍACO

Para análise do barorreflexo cardíaco foram utilizadas as variáveis cardiovasculares observadas anteriormente às administrações farmacológicas (valores basais) e posteriormente à administração de cada fármaco vasoativo (resposta máxima). Os valores da  $P_{VA}$  média foram representados graficamente com seus valores correspondentes da  $f_H$  para cada animal individual, e a relação entre essas variáveis foi analisada utilizando a função logística sigmóide de quatro variáveis descrita abaixo (KENT et al., 1972; REID, 1996):

$$f_H = \frac{(\text{MÁX} - \text{MÍN})}{(1 + (P_{VA} \text{ média}/P_{VA} \text{ média}_{50})^B)} + \text{MÍN}$$

Em que MÁX é a  $f_H$  máxima atingida pelo barorreflexo (bpm), MÍN é a  $f_H$  mínima atingida pelo barorreflexo (bpm),  $B$  é o coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide (bpm.kPa<sup>-1</sup>), e  $P_{VA}$  média<sub>50</sub> é a  $P_{VA}$  média no centro da curva sigmóide (kPa). O ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ; bpm.kPa<sup>-1</sup>), que ocorre quando a  $P_{VA}$  média é igual à  $P_{VA}$  média<sub>50</sub>, foi calculado para cada animal utilizando a equação abaixo:

$$G_{50} = \left| \frac{-B (MÁX - MÍN)}{4 \cdot P_{VA} \text{ média}_{50}} \right|$$

Para permitir comparações fidedignas entre o ganho barorreflexo das diferentes espécies investigadas, essa variável foi normalizada utilizando duas lógicas distintas: (1) normalização do  $G_{50}$  em relação aos valores basais da  $P_{VA}$  média e da  $f_H$  dos animais ( $G_{N1}$ ; unidades arbitrárias; CROSSLEY et al., 2003; ZENA et al., 2015); e (2) recálculo do ganho barorreflexo em porcentagem da mudança na  $f_H$  por alteração unitária na  $P_{VA}$  média ( $G_{N2}$ ;  $\% \cdot \text{kPa}^{-1}$ ; ALTIMIRAS et al., 1998).

$$G_{N1} = G_{50} \cdot \left( \frac{P_{VA} \text{ média basal}}{f_H \text{ basal}} \right)$$

$$G_{N2} = 100 \cdot \left( \frac{B}{MÍN} \right)$$

Para avaliar a capacidade das diferentes espécies de responder à hipertensão e à hipotensão arterial, o potencial regulatório para bradicardia barorreflexa (PRB; %) e o potencial regulatório para taquicardia barorreflexa (PRT; %) foram calculados. O PRB consiste na diferença entre o valor basal da  $f_H$  e a MÍN, convertida em porcentagem relativa à faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$  (diferença entre a MÁX e a MÍN); ao passo que o PRT consiste na diferença entre o valor basal da  $f_H$  e a MÁX, convertida em porcentagem relativa à faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$  – de acordo com as equações abaixo:

$$\text{PRB} = \left( \frac{f_H \text{ basal} - MÍN}{MÁX - MÍN} \right) \times 100$$

$$\text{PRT} = \left( \frac{MÁX - f_H \text{ basal}}{MÁX - MÍN} \right) \times 100$$

Todos os procedimentos supracitados para avaliação do reflexo barostático foram realizados com auxílio do software Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, Califórnia, EUA).

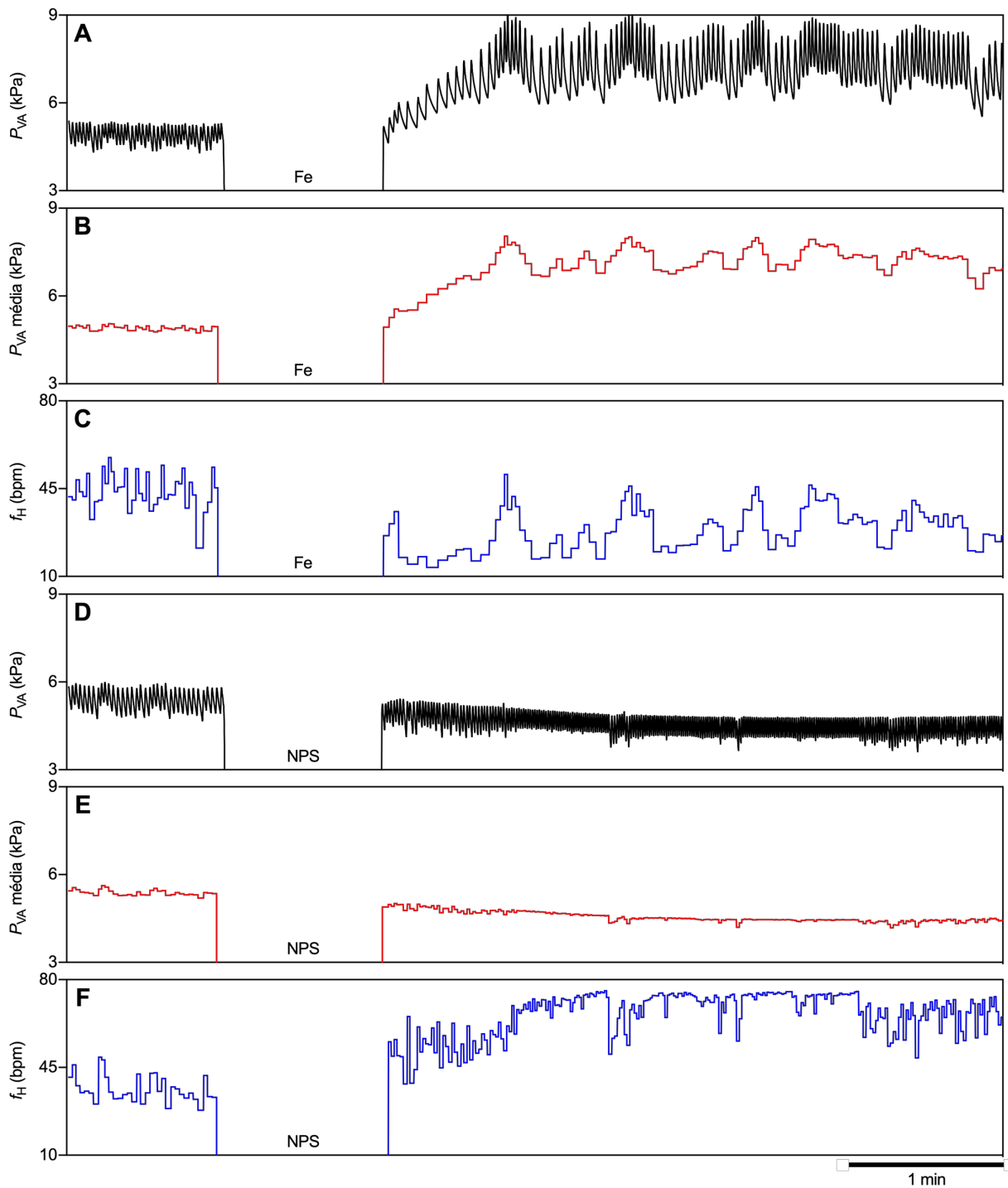
## 2.7 – ESTATÍSTICA

A  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  observadas em cada espécie, anteriormente e posteriormente as administrações das diferentes doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, foram comparadas por meio de uma análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett. As variáveis cardiovasculares basais ( $P_{VA}$  média e  $f_H$ ) e as variáveis barorreflexas (MÁX, MÍN,  $B$ ,  $P_{VA}$  média<sub>50</sub>, coeficiente de determinação  $R^2$ ,  $G_{50}$ ,  $G_{N1}$  e  $G_{N2}$ , faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$ , PRB e PRT) dos animais foram comparadas entre as quatro espécies estudadas por meio de uma ANOVA de via única seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. A  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  observadas em cada espécie, anteriormente e posteriormente a administração intrarterial de solução salina, foram comparadas por meio de um teste t pareado bicaudal. Por fim, a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  observadas em cada espécie, anteriormente e posteriormente as infusões de fenilefrina e nitroprussiato de sódio em animais sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, foram comparadas por meio de uma ANOVA de via única para medidas repetidas seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Para todos os testes foi adotado  $\alpha = 0,05$ , e a hipótese nula foi rejeitada quando  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no software Prism 7.0, assim como a construção dos gráficos. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

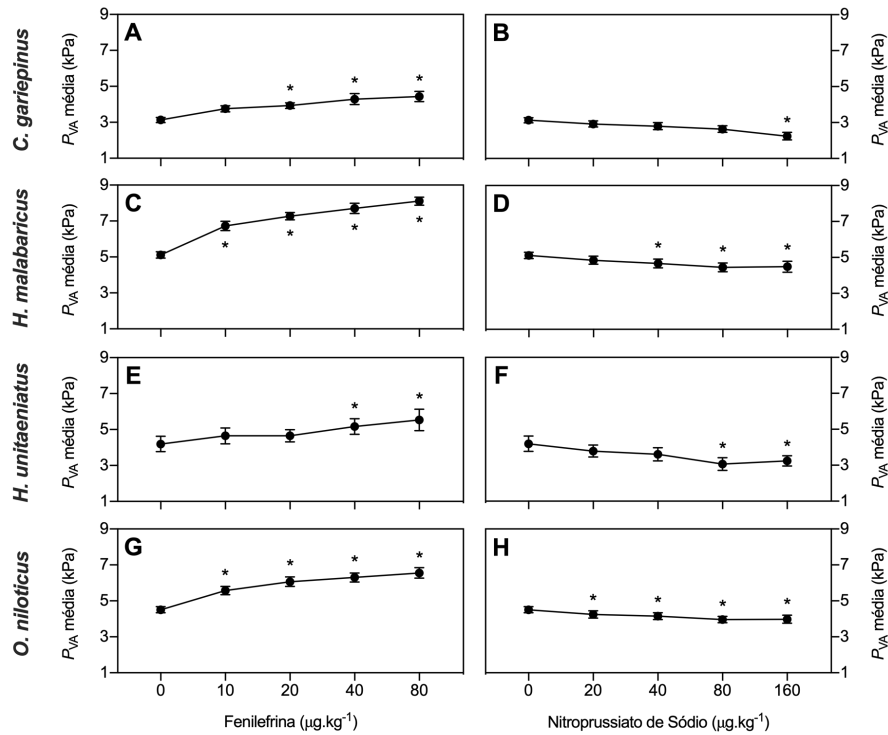
## 3 – RESULTADOS

### 3.1 – CONTROLE BARORREFLEXO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

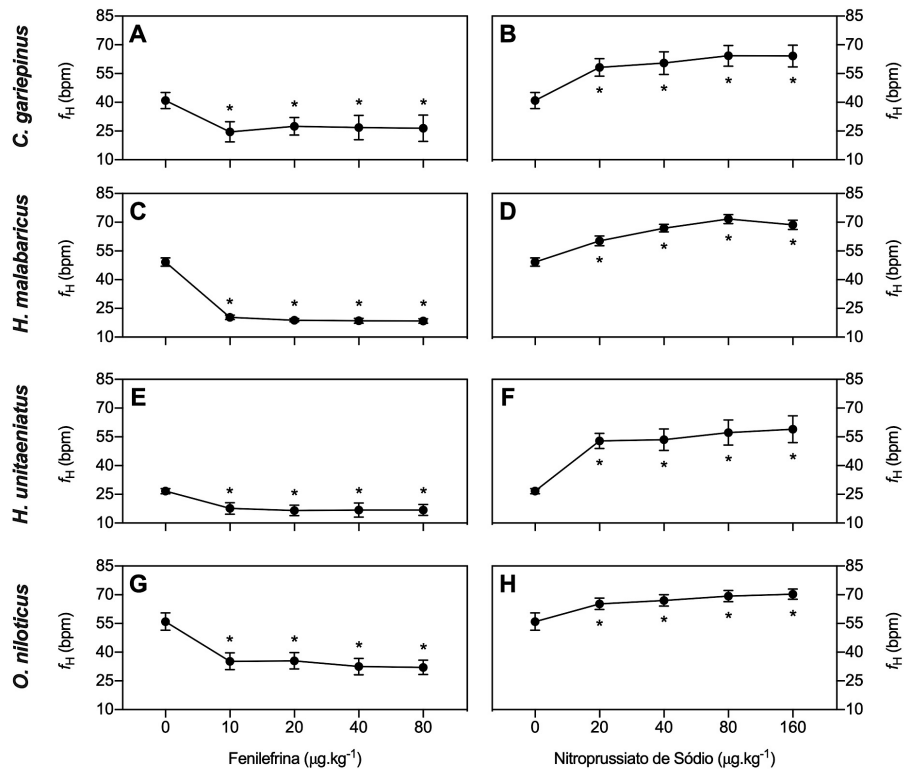
Nas quatro espécies estudadas, as administrações do agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina e do doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio induziram alterações na  $P_{VA}$  média dos animais seguidas de expressivas respostas barorreflexas cardíacas (Figuras 1A-F, 2A-H e 3A-H). Como um agente vasoconstritor sistêmico, a fenilefrina provocou um aumento na  $P_{VA}$  média que engatilhou uma bradicardia barorreflexa (Figuras 1A-C, 2A, C, E, G e 3A, C, E, G). Já o nitroprussiato de sódio, como um agente vasodilatador sistêmico, provocou uma redução na  $P_{VA}$  média que engatilhou uma taquicardia barorreflexa (Figuras 1D-F, 2B, D, F, H e 3B, D, F, H).



**Figura 1.** Traçados originais da pressão arterial na aorta ventral ( $P_{VA}$ ), da pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) e da frequência cardíaca ( $f_H$ ) de um indivíduo representativo de *H. malabaricus*, anteriormente e posteriormente à infusão de fenilefrina (Fe;  $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; A-C) e nitroprussiato de sódio (NPS;  $80 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; D-F). Fonte: o autor.



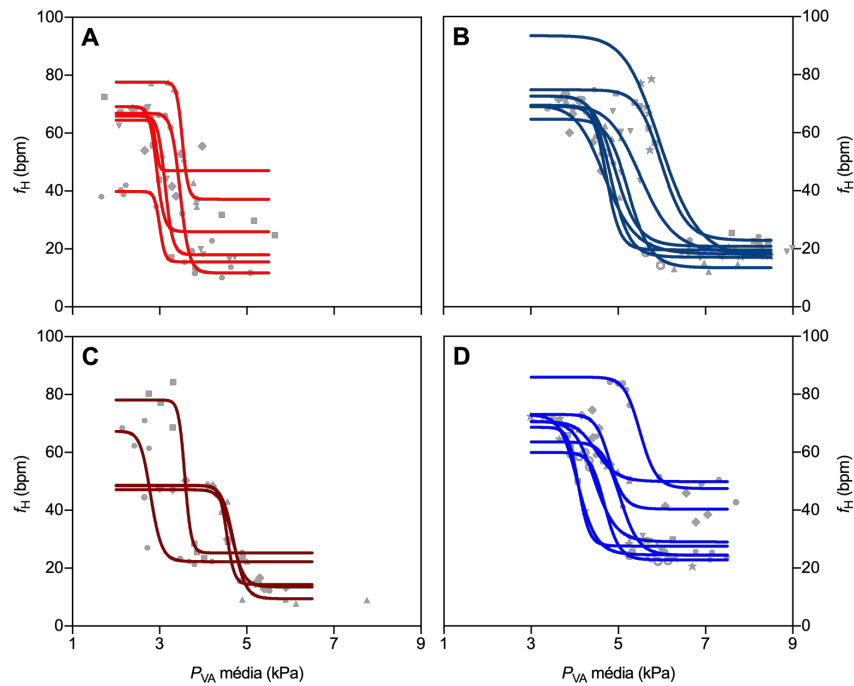
**Figura 2.** Pressão arterial média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) de *C. gariepinus* ( $N=6$ ; A, B), *H. malabaricus* ( $N=8$ ; C, D), *H. unitaeniatus* ( $N=5$ ; E, F) e *O. niloticus* ( $N=8$ ; G, H) anteriormente e posteriormente as administrações das diferentes doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ;  $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.



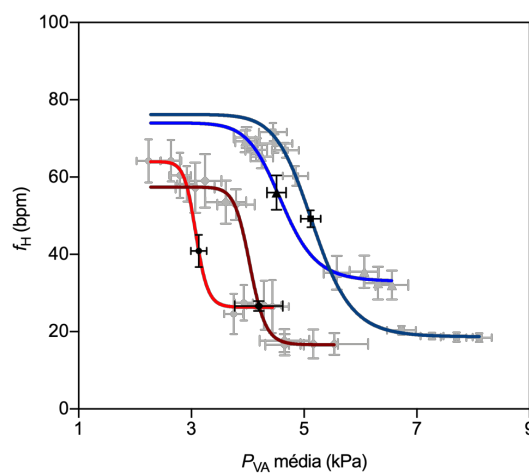
**Figura 3.** Frequência cardíaca ( $f_H$ ) de *C. gariepinus* ( $N=6$ ; A, B), *H. malabaricus* ( $N=8$ ; C, D), *H. unitaeniatus* ( $N=5$ ; E, F) e *O. niloticus* ( $N=8$ ; G, H) anteriormente e posteriormente as administrações das diferentes doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ;  $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.



As curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo das espécies estudadas, calculadas com base nas variáveis cardiovasculares basais e nas respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo, podem ser encontradas nas Figuras 4 e 5. É possível observar considerável homogeneidade intraespecífica na posição e na morfologia das curvas (Figura 4A-D), assim como variações interespecíficas em tais características das mesmas (Figuras 4A-D e 5).



**Figura 4.** Curvas sigmóides barorreflexas individuais de *C. gariepinus* ( $N=6$ ; A), *H. malabaricus* ( $N=8$ ; B), *H. unitaeniatus* ( $N=5$ ; C) e *O. niloticus* ( $N=8$ ; D). Símbolos diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos.  $P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca. Fonte: o autor.



**Figura 5.** Curvas sigmóides barorreflexas médias de *C. gariepinus* ( $N=6$ ; vermelha clara; círculos), *H. malabaricus* ( $N=8$ ; azul escura; quadrados), *H. unitaeniatus* ( $N=5$ ; vermelha escura; losangos) e *O. niloticus* ( $N=8$ ; azul clara; triângulos). Símbolos pretos correspondem às variáveis basais; símbolos cinza correspondem às respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo.  $P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.

As variáveis cardiovasculares basais e as variáveis barorreflexas dos animais, derivadas das curvas sigmóides descritoras do reflexo barostático, encontram-se sumarizadas na Tabela 1. As espécies *C. gariepinus*, *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. niloticus* exibiram uma  $P_{VA}$  média basal de  $3,13 \pm 0,14$  kPa,  $5,11 \pm 0,17$  kPa,  $4,19 \pm 0,42$  kPa e  $4,50 \pm 0,16$  kPa, respectivamente. É notável que *C. gariepinus* exibiu uma  $P_{VA}$  média basal significativamente menor que a  $P_{VA}$  média basal das demais espécies. *H. unitaeniatus* também exibiu uma  $P_{VA}$  média basal reduzida, menor que a apresentada por *H. malabaricus* e similar a apresentada por *O. niloticus*. *H. malabaricus*, por sua vez, apresentou a maior  $P_{VA}$  média basal dentre as quatro espécies estudadas (Tabela 1). Com relação à  $f_H$  basal, as espécies *C. gariepinus*, *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. niloticus* apresentaram valores de  $40,9 \pm 4,1$  bpm,  $49,2 \pm 2,2$  bpm,  $26,6 \pm 1,3$  bpm e  $56,0 \pm 4,4$  bpm, respectivamente. Destaca-se que *H. unitaeniatus* exibiu uma  $f_H$  basal menor que a apresentada por *H. malabaricus* e *O. niloticus*, porém similar a apresentada por *C. gariepinus*. Por outro lado, *O. niloticus* exibiu uma  $f_H$  basal maior que a apresentada por *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*, porém similar a apresentada por *H. malabaricus* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Variáveis cardiovasculares basais e variáveis barorreflexas derivadas das curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ).

	<i>C. gariepinus</i>	<i>H. malabaricus</i>	<i>H. unitaeniatus</i>	<i>O. niloticus</i>
$P_{VA}$ média basal (kPa)	$3,13 \pm 0,14$ a	$5,11 \pm 0,17$ b	$4,19 \pm 0,42$ c	$4,50 \pm 0,16$ b, c
$f_H$ basal (bpm)	$40,9 \pm 4,1$ a, b	$49,2 \pm 2,2$ a, c	$26,6 \pm 1,3$ b	$56,0 \pm 4,4$ c
MÁX (bpm)	$63,9 \pm 5,1$ a, b	$78,6 \pm 4,0$ a	$58,1 \pm 6,4$ b	$70,6 \pm 2,7$ a, b
MÍN (bpm)	$25,9 \pm 5,6$ a, b	$18,2 \pm 1,0$ a	$16,9 \pm 2,9$ a	$33,2 \pm 3,8$ b
MÁX – MÍN (bpm)	$38,0 \pm 5,8$ a	$60,4 \pm 4,0$ b	$41,2 \pm 3,8$ a	$37,3 \pm 2,8$ a
$B$ (bpm.kPa <sup>-1</sup> )	$47,2 \pm 6,6$ a	$16,9 \pm 2,4$ b	$35,1 \pm 5,0$ a, c	$25,3 \pm 2,0$ b, c
$P_{VA}$ média <sub>50</sub>	$3,16 \pm 0,11$ a	$5,18 \pm 0,18$ b	$4,03 \pm 0,38$ a, c	$4,64 \pm 0,16$ b, c
$R^2$	$0,91 \pm 0,05$ a	$0,97 \pm 0,01$ a	$0,92 \pm 0,04$ a	$0,98 \pm 0,01$ a
$G_{50}$ (bpm.kPa <sup>-1</sup> )	$127,9 \pm 7,8$ a	$47,1 \pm 5,1$ b	$89,0 \pm 10,0$ c	$51,5 \pm 6,1$ b
$G_{N1}$ (ua)	$10,0 \pm 1,5$ a	$4,8 \pm 0,3$ b	$13,6 \pm 1,3$ a	$4,4 \pm 0,6$ b
$G_{N2}$ (%.kPa <sup>-1</sup> )	$207,6 \pm 31,7$ a	$94,4 \pm 13,3$ b	$243,6 \pm 58,0$ a	$82,9 \pm 10,7$ b
PRB (%)	$36,0 \pm 2,5$ a, b	$52,8 \pm 4,1$ a, c	$26,1 \pm 7,5$ b	$63,0 \pm 7,6$ c
PRT (%)	$63,9 \pm 2,5$ a, b	$47,1 \pm 4,1$ a, c	$73,8 \pm 7,5$ b	$36,9 \pm 7,6$ c

$P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca; MÁX:  $f_H$  máxima atingida pelo barorreflexo; MÍN:  $f_H$  mínima atingida pelo barorreflexo; MÁX – MÍN: faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$ ;  $B$ : coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide;  $P_{VA}$  média<sub>50</sub>:  $P_{VA}$  média no centro da curva sigmóide;  $R^2$ : coeficiente de determinação;  $G_{50}$ : ganho máximo do barorreflexo;  $G_{N1}$ :  $G_{50}$  normalizado em relação aos valores basais da  $P_{VA}$  média e da  $f_H$  dos animais;  $G_{N2}$ : ganho barorreflexo recalculado em porcentagem da mudança na  $f_H$  por alteração unitária na  $P_{VA}$  média; PRB: potencial regulatório para bradicardia barorreflexa; PRT: potencial regulatório para taquicardia barorreflexa. Considerando uma mesma variável, valores que não compartilham uma letra superscrita apresentam diferença significativa entre si ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM.

O  $R^2$  das curvas sigmóides que correlacionam a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  dos animais, descrevendo o barorreflexo cardíaco dos mesmos, ficou acima de 0,90 para todas as espécies (Tabela 1). Ademais, o  $G_{50}$  dos animais se mostrou maior em *C. gariepinus*, intermediário em *H. unitaeniatus*, e menor em *H. malabaricus* e *O. niloticus* (Tabela 1). Após a normalização ( $G_{N1}$  e  $G_{N2}$ ), os ganhos se mostraram similares entre *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus* assim como entre *H. malabaricus* e *O. niloticus* – apesar de maiores nas duas primeiras espécies (Tabela 1). O PRB observado em *C. gariepinus* se mostrou menor que o observado em *O. niloticus*, da mesma forma que o PRB de *H. unitaeniatus* se mostrou menor que o de *H. malabaricus*. Coerentemente, o padrão inverso foi observado com relação ao PRT, que se mostrou maior em *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus* que em *O. niloticus* e *H. malabaricus*, respectivamente (Tabela 1).

### 3.2 – EFEITOS DA INFUSÃO DE VEÍCULO NAS VARIÁVEIS CARDIOVASCULARES

A  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  observadas nas quatro espécies estudadas, anteriormente e posteriormente a administração intrarterial de solução salina, encontram-se apresentadas na Tabela 2. Os resultados demonstraram que a infusão *in bolus* do veículo dos fármacos via cânula aórtica, em volume similar ao da maior dose dos fármacos vasoativos, não promoveram alterações significativas nas variáveis cardiovasculares dos animais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Variáveis cardiovasculares de *C. gariepinus* ( $N = 6$ ), *H. malabaricus* ( $N = 8$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 5$ ) e *O. niloticus* ( $N = 8$ ) anteriormente e posteriormente administração intrarterial de solução salina (0,9% NaCl).

	$P_{VA}$ média pré salina (kPa)	$P_{VA}$ média pós salina (kPa)	$f_H$ pré salina (bpm)	$f_H$ pós salina (bpm)
<i>C. gariepinus</i>	3,25 ± 0,09	3,31 ± 0,12	44,3 ± 8,0	43,0 ± 7,4
<i>H. malabaricus</i>	5,34 ± 0,23	5,38 ± 0,27	44,4 ± 2,4	44,2 ± 2,2
<i>H. unitaeniatus</i>	4,44 ± 0,35	4,37 ± 0,33	23,9 ± 2,1	22,7 ± 2,6
<i>O. niloticus</i>	4,75 ± 0,17	4,81 ± 0,16	57,6 ± 4,9	55,4 ± 3,5

$P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral;  $f_H$ : frequência cardíaca. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as variáveis cardiovasculares observadas anteriormente e posteriormente a administração intrarterial de solução salina nas quatro espécies estudadas ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média ± EPM.

### 3.3 – EFEITOS DOS FÁRMACOS VASOATIVOS APÓS BLOQUEIO AUTONÔMICO

A  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  observadas nos animais sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, anteriormente e posteriormente as administrações dos fármacos vasoativos, encontram-se apresentadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Em todas as espécies, a fenilefrina provocou um aumento na  $P_{VA}$  média enquanto o nitroprussiato de sódio provocou uma redução nessa variável (Tabela 3), porém, tais alterações pressóricas não foram acompanhadas de respostas reflexas na  $f_H$  dos animais (Tabela 4). Tais resultados confirmam a natureza barorreflexa dos ajustes estudados.

**Tabela 3.** Pressão média na aorta ventral ( $P_{VA}$ ) de *C. gariepinus* ( $N = 4$ ), *H. malabaricus* ( $N = 4$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 4$ ) e *O. niloticus* ( $N = 4$ ) sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

	$P_{VA}$ média pré administração (kPa)	$P_{VA}$ média pós fenilefrina (kPa)	$P_{VA}$ média pós nitroprussiato de sódio (kPa)
<i>C. gariepinus</i>	$3,35 \pm 0,03$	$4,05 \pm 0,22$ *	$1,86 \pm 0,10$ *
<i>H. malabaricus</i>	$5,14 \pm 0,11$	$6,98 \pm 0,25$ *	$4,25 \pm 0,16$ *
<i>H. unitaeniatus</i>	$4,80 \pm 0,49$	$6,28 \pm 0,63$ *	$2,92 \pm 0,67$ *
<i>O. niloticus</i>	$4,82 \pm 0,26$	$5,77 \pm 0,43$ *	$4,01 \pm 0,42$ *

Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM.

**Tabela 4.** Frequência cardíaca ( $f_H$ ) de *C. gariepinus* ( $N = 4$ ), *H. malabaricus* ( $N = 4$ ), *H. unitaeniatus* ( $N = 4$ ) e *O. niloticus* ( $N = 4$ ) sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

	$f_H$ pré administração (bpm)	$f_H$ pós fenilefrina (bpm)	$f_H$ pós nitroprussiato de sódio (bpm)
<i>C. gariepinus</i>	$58,5 \pm 8,7$	$57,2 \pm 8,2$	$59,0 \pm 8,8$
<i>H. malabaricus</i>	$83,8 \pm 5,0$	$78,5 \pm 6,5$	$79,0 \pm 7,6$
<i>H. unitaeniatus</i>	$97,2 \pm 1,2$	$98,0 \pm 1,3$	$96,6 \pm 1,3$
<i>O. niloticus</i>	$70,4 \pm 2,9$	$71,1 \pm 2,3$	$71,1 \pm 2,1$

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a  $f_H$  observada anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina e nitroprussiato de sódio nas quatro espécies estudadas ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM.

## 4 – DISCUSSÃO

### 4.1 – O BARORREFLEXO CARDÍACO E O HABITAT EM VERTEBRADOS

Anteriormente a qualquer intervenção farmacológica, *C. gariepinus*, *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. niloticus* exibiram variáveis cardiovasculares basais ( $P_{VA}$  média e  $f_H$ ) similares às reportadas por estudos anteriores desenvolvidos com as mesmas espécies, utilizando indivíduos com massa corporal semelhante e mantidos a  $\sim 25^\circ\text{C}$  (Tabela 1; FARRELL, 1978; SUNDIN et al., 1999; REID et al., 2000; MCKENZIE et al., 2007; BELÃO et al., 2011; 2015; MARTINS et al., 2011; MONTEIRO et al., 2013; ZERAIK et al., 2013; BLASCO et al., 2017). Diferentemente do que seria esperado, as espécies que realizam incursões terrestres (*C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*) não apresentaram uma  $P_{VA}$  média superior àquela das espécies estritamente aquáticas (*H. malabaricus* e *O. niloticus*) (Tabela 1; SEYMOUR E LILLYWHITE, 1976; BAGSHAW, 1985; SEYMOUR et al. 1993). Além disso, tampouco foi constatada uma similaridade entre a  $P_{VA}$  média das espécies da família Erythrinidae (*H. malabaricus* e *H. unitaeniatus*) (Tabela 1), descartando uma justificativa relacionada à história filogenética dos animais para a inobservância da correlação entre habitat e  $P_{VA}$  média basal.

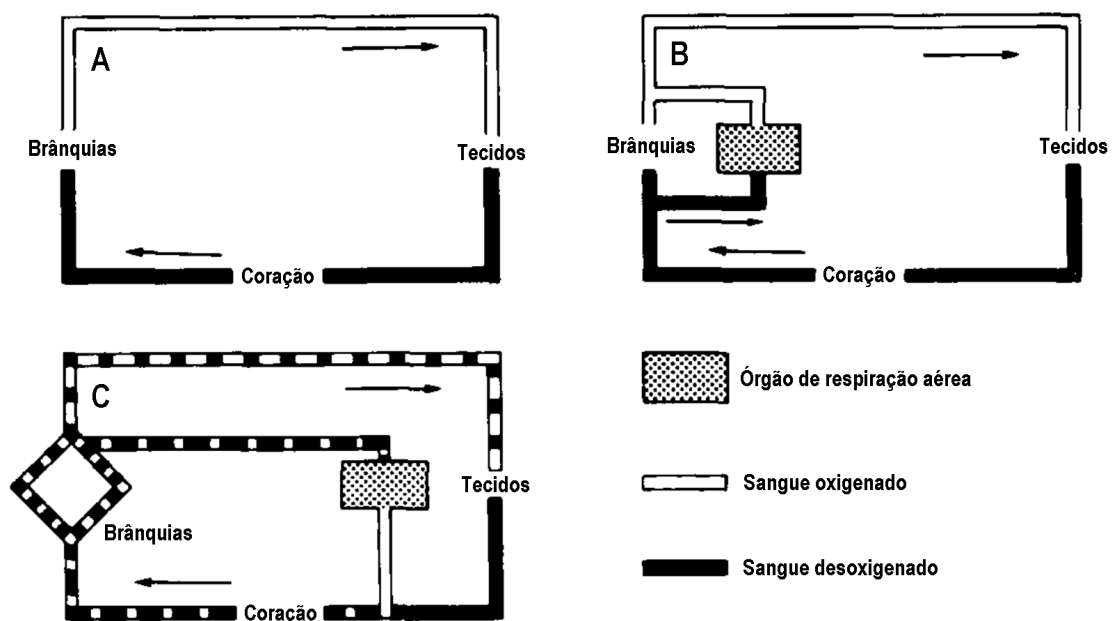
As alterações pressóricas e as respostas cardíacas reflexas promovidas pelos fármacos vasoativos nas quatro espécies avaliadas se mostraram similares àquelas observadas em outros teleósteos (Figuras 2A-H e 3A-H; ARMELIN et al., 2016; SANDBLOM et al., 2016; SUNDELL et al., 2018). Apesar das investigações prévias que versam sobre o reflexo barostático em peixes (FARRELL, 1986; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; 2011; ARMELIN et al., 2016; SANDBLOM et al., 2016; SUNDELL et al., 2018), o presente estudo é o primeiro a explorar tal fenômeno nesses animais utilizando o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide – a qual descreve os ajustes na  $f_H$  associados às mudanças na  $P_{VA}$  média de maneira mais fidedigna em comparação à uma análise de regressão linear, por correlacionar tais variáveis considerando a existência de platôs nas respostas cardíacas reflexas (MÁX e MÍN) (KENT et al. 1972; HEAD E MCCARTY, 1987). Entretanto, essa abordagem é bastante comum em estudos com tetrápodes (HEAD E MCCARTY, 1987; REID, 1996; ALTIMIRAS et al., 1998; CROSSLEY et al., 2003; HAGENSEN et al., 2010; MUELLER et al., 2013; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b).

As regressões realizadas entre a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  de *C. gariepinus*, *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. niloticus* resultaram em típicas curvas sigmóides descritoras do barorreflexo cardíaco (Figuras 4A-D e 5), assim como as relatadas para espécies de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (REID, 1996; CROSSLEY et al., 2003; MUELLER et al., 2013; ZENA et al., 2016a; 2016b). Ademais, o  $R^2$  dessas curvas demonstra que mais de 90% das alterações na  $f_H$  observadas após as infusões de fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram determinadas por alterações na  $P_{VA}$  média nas espécies estudadas (Tabela 1; ALTIMIRAS et al., 1998; ZENA et al., 2016a). Esses dados sugerem que o método de análise empregado no presente estudo caracterizou com sucesso o controle barorreflexo da  $f_H$  em teleósteos. Apesar da tipicidade das curvas, divergências interespecíficas na posição e morfologia das mesmas são notórias (Figuras 4A-D e 5). Naturalmente, essas divergências são explicadas pelas diferenças existentes entre as variáveis cardiovasculares basais das espécies e pelas diferenças na responsividade aos fármacos vasoativos que determinam o ganho barorreflexo (HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015).

Os resultados do presente estudo evidenciaram que o ganho barorreflexo ( $G_{50}$ ,  $G_{N1}$  e  $G_{N2}$ ) de teleósteos de habitat anfíbio (*C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*) é superior ao de teleósteos de habitat aquático (*H. malabaricus* e *O. niloticus*) (Tabela 1). Esse achado indica que a terrestrialidade representa uma pressão seletiva significativa na evolução da função barorreflexa em peixes, favorecendo organismos mais aptos a contrabalancear as influências da gravidade na hemodinâmica. Tal constatação pode ser realizada tanto ao considerar as espécies da família Erythrinidae (*H. malabaricus* e *H. unitaeniatus*) quanto ao considerar as espécies das famílias Clariidae (*C. gariepinus*) e Cichlidae (*O. niloticus*), as quais constituem grupos externos de distante relação filogenética (GRAHAM, 1997;

NELSON et al., 2016). Desse modo, é possível concluir que essa observação não é mera consequência das histórias filogenéticas das espécies estudadas (ao invés de seus habitats).

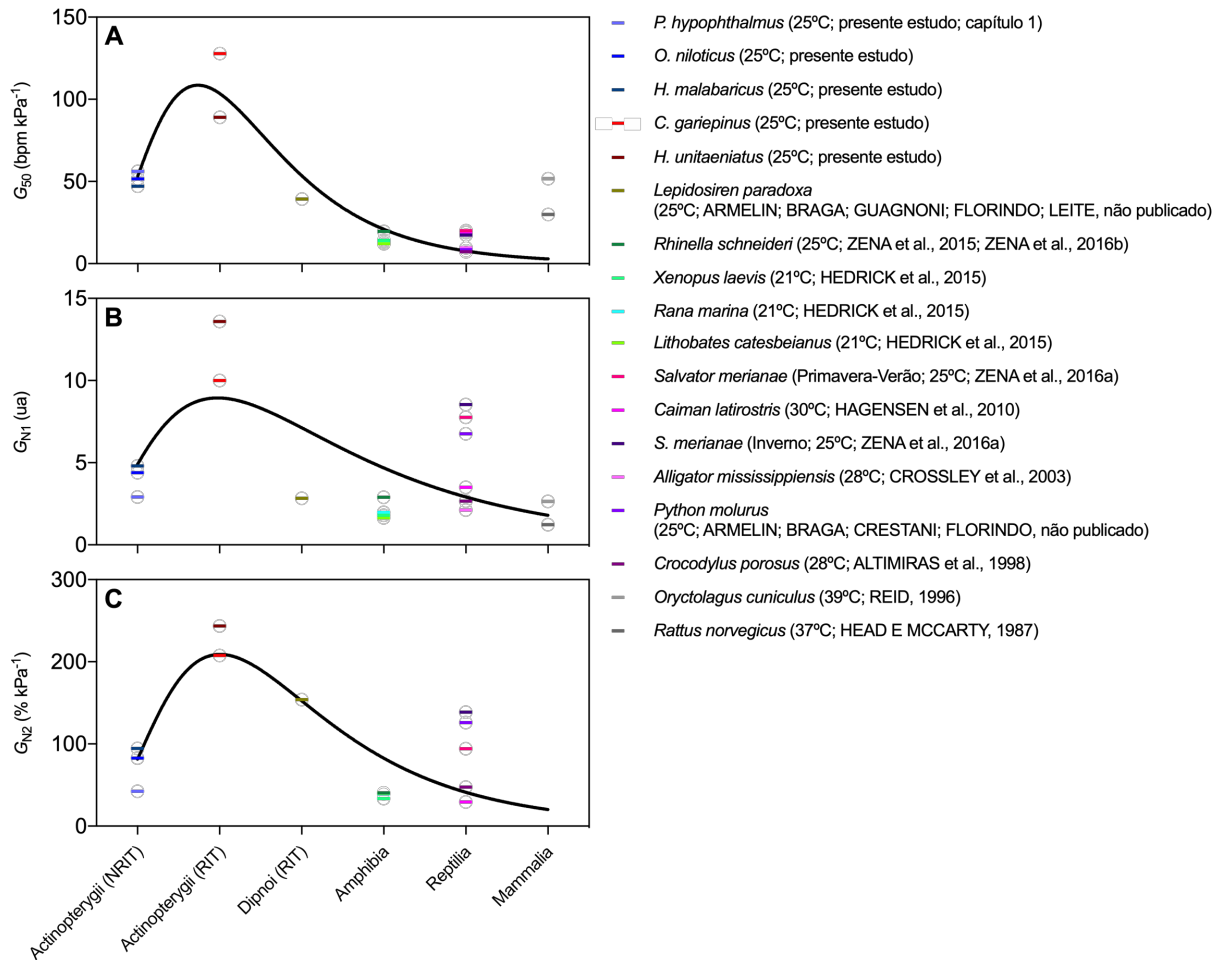
Pode-se argumentar que *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus* apresentam maior ganho barorreflexo que *H. malabaricus* e *O. niloticus* por serem espécies dotadas de respiração aérea e, conseqüentemente, exibirem organizações cardiovasculares distintas. Porém, a improbabilidade dessa hipótese reside no fato de *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus* não compartilharem da mesma arquitetura circulatória, pois o primeiro realiza trocas gasosas com o meio atmosférico através de um epitélio branquial especializado enquanto o segundo as realiza através da bexiga natatória (Figura 6A-C) (JOHANSEN, 1970; SATCHELL, 1976; SMITH E GANNON, 1978; GRAHAM, 1997). Ainda, pode-se argumentar que *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus* exibem ganho barorreflexo superior devido à possíveis perturbações na pressão arterial associadas à respiração aérea. Como teleósteos apresentam barorreceptores branquiais (BAGSHAW, 1985; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; ARMELIN et al., 2016), a despressurização da cavidade oro-branquial que ocorre durante a inspiração atmosférica pode prejudicar momentaneamente a barorrecepção e a estabilidade da pressão arterial nesses animais, selecionando indivíduos com maior ganho barorreflexo. No entanto, é possível descartar essa hipótese ao ponderar que: (1) o ato de engolir ar também é comum em peixes exclusivamente aquáticos, especialmente quando realizam respiração na superfície aquática (GRAHAM, 1997; XU et al., 2006; FLORINDO et al., 2018); e (2) o ganho barorreflexo do teleósteo estritamente aquático com respiração aérea *Pangasianodon hypophthalmus* (Siluriformes, Pangasiidae) é praticamente idêntico ao de *H. malabaricus* e *O. niloticus* (presente estudo; capítulo 1).



**Figura 6.** Representação esquemática das arquiteturas cardiovasculares de teleósteos que apresentam respiração exclusivamente aquática (A), respiração aérea através de epitélio branquial especializado (B) e respiração aérea através de bexiga natatória (C). Fonte: adaptada de Johansen (1970).

O ganho barorreflexo de teleósteos de habitat aquático se mostrou similar ao de tetrápodes, ao passo que o ganho barorreflexo de teleósteos de habitat anfíbio se mostrou superior (Figura 7A-C). Tendo em vista que todas as espécies de tetrápodes estudadas até a atualidade possuem habitat anfíbio ou terrestre, seria esperado que os mesmos apresentassem um ganho barorreflexo superior ao de *H. malabaricus* e *O. niloticus*, e similar ao de *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*. Uma possível explicação para a inobservância dessa relação é a maior dependência da regulação pressórica pela via cardíaca do barorreflexo que os teleósteos provavelmente apresentam. É consenso que os teleósteos são capazes de regular a resistência vascular sistêmica e a capacitância venosa por meio de ajustes vasomotores (OGILVY E DUBOIS, 1982; DUFF E OLSON, 1989; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; SANDBLOM et al., 2005). Entretanto, levando-se em conta que teleósteos são incapazes de reverter uma hipotensão ortostática via vasoconstrição sistêmica de forma significativa como tetrápodes, é concebível que esses animais apresentam um controle pressórico pela via vasomotora do barorreflexo menos eficaz que o de tetrápodes, tornando-os mais dependentes de ajustes na  $f_H$  para a manutenção da estabilidade da pressão arterial em curto prazo (LILLYWHITE E SEYMOUR, 1978; OGILVY E DUBOIS, 1982; BAGSHAW, 1985; LILLYWHITE, 1996). Essa hipótese é corroborada pela maior faixa regulatória do controle barorreflexo da  $f_H$  (diferença entre a MÁX e a MÍN) observada em teleósteos (~44 bpm; Tabela 1) em comparação a tetrápodes ectotérmicos como anfíbios (~25 bpm) e répteis (~32 bpm) (ALTIMIRAS et al., 1998; CROSSLEY et al., 2003; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b).

O notável ganho barorreflexo revelado em teleósteos estritamente aquáticos também pode motivar o seguinte questionamento: se as perturbações circulatórias promovidas pela ação gravitacional são praticamente nulas em ambientes aquáticos, não seria inevitável que os organismos com vida restrita a esse meio exibissem um ganho barorreflexo excepcionalmente reduzido? A relevância primária do controle em curto prazo da pressão arterial é a continuidade da perfusão tecidual e a prevenção de danos estruturais hipertensivos mesmo durante breves períodos de tempo (BAGSHAW, 1985; BERGER, 1987; VAN VLIET E WEST, 1994; CHAPLEAU, 2012), e considerando que desarranjos pressóricos súbitos e momentâneos podem ser engatilhados por situações além do estresse hemodinâmico gravitacional (como alimentação, exercício e interações agressivas; SECOR et al., 2000; WANG et al., 2001; SECOR E WHITE, 2010), é de simples dedução que animais aquáticos também estão sujeitos a pressões seletivas que demandam uma função barorreflexa eficaz.

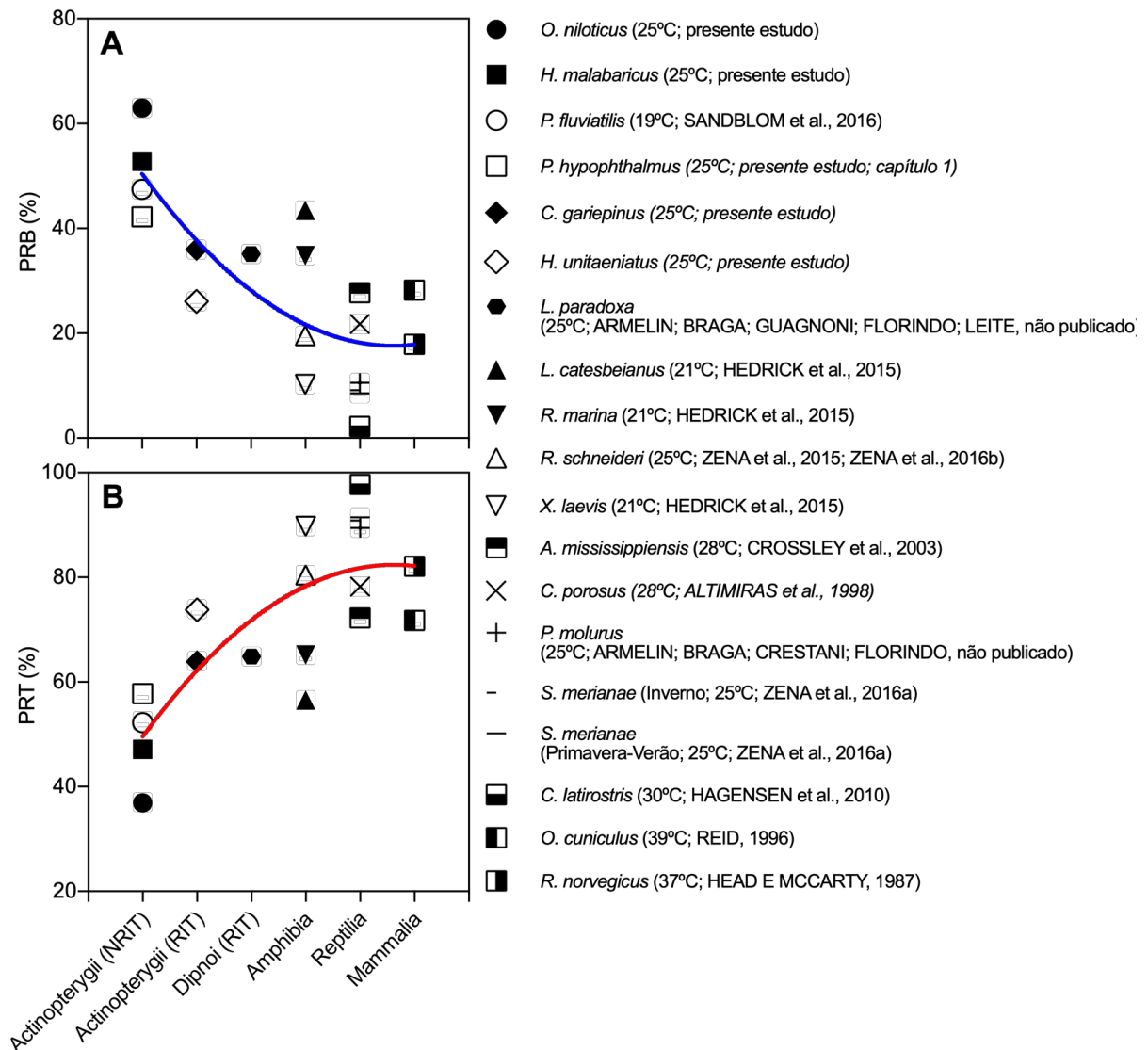


**Figura 7.** Ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ; A) e ganho barorreflexo normalizado ( $G_{N1}$ ;  $G_{N2}$ ; B, C) de teleosteos e tetrápodes em repouso mantidos em temperaturas compreendidas dentro de suas respectivas faixas ótimas. As temperaturas apresentadas para os animais endotérmicos são relativas às suas temperaturas corporais. Todos os estudos mencionados utilizaram o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide. Reitera-se que, como alguns estudos não apresentaram o coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide descritora do barorreflexo (B), o  $G_{N2}$  de algumas espécies não puderam ser calculados. As curvas de tendência que descrevem a distribuição do  $G_{50}$ ,  $G_{N1}$  e  $G_{N2}$  das diferentes espécies pertencentes aos variados táxons do subfilo Vertebrata tratam-se de regressões log-normal (A:  $R^2 = 0,73$ ; B:  $R^2 = 0,27$ ; C:  $R^2 = 0,52$ ). NRIT: não realizam incursões terrestres; RIT: realizam incursões terrestres. Fonte: o autor.

Finalmente, os valores do PRB e do PRT observados em *C. gariepinus*, *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. niloticus* também indicam uma correlação entre a função barorreflexa e o habitat desses animais. Levando em consideração que situações de hipotensão arterial tendem a ser mais frequentes em ambientes terrestres que em ambiente aquáticos (OGILVY E DUBOIS, 1982; LILLYWHITE, 1996), é provável que tais situações de desequilíbrio pressórico relacionadas à terrestrialidade constituam pressões seletivas que favorecem indivíduos com maior capacidade de responder à hipotensão arterial (PRT). Isso deve explicar porque o presente estudo constatou que espécies capazes de realizar incursões terrestres (*C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*)



apresentaram um PRB menor e um PRT maior que as espécies incapazes de realizar tais incursões (*H. malabaricus* e *O. niloticus*; Tabela 1), independentemente de suas relações filogenéticas. Similarmente aos teleósteos de habitat anfíbio, peixes dipnóicos e tetrápodes capazes de ocupar o ambiente terrestre, mesmo que por limitados intervalos de tempo, apresentam um PRT maior que o PRB (Figura 8A, B).



**Figura 8.** Potencial regulatório para bradicardia barorreflexa (PRB; A) e potencial regulatório para taquicardia barorreflexa (PRT; B) de teleósteos e tetrápodes em repouso mantidos em temperaturas compreendidas dentro de suas respectivas faixas ótimas. As temperaturas apresentadas para os animais endotérmicos são relativas às suas temperaturas corporais. Todos os estudos mencionados utilizaram o Método Farmacológico de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide. As curvas de tendência que descrevem a distribuição do PRB e PRT das diferentes espécies pertencentes aos variados táxons do subfilo Vertebrata tratam-se de regressões polinomiais de segunda ordem (quadráticas; A:  $R^2 = 0,62$ ; B:  $R^2 = 0,62$ ). NRIT: não realizam incursões terrestres; RIT: realizam incursões terrestres. Fonte: o autor.

#### 4.2 – SÍTIO DE COLETA DA PRESSÃO ARTERIAL E O MÉTODO DE OXFORD

Em um estudo desenvolvido utilizando *P. fluviatilis* (Perciformes, Percidae), Sandblom et al. (2016) observaram que administrações de nitroprussiato de sódio induziram pequenas alterações na  $P_{VA}$  média associadas à marcantes respostas cardíacas reflexas. Com base nessa constatação, os autores sugeriram que os barorreceptores de teleósteos estão localizados na porção eferente da vasculatura branquial, argumentando que a acentuada taquicardia observada após as infusões de nitroprussiato de sódio constituiu uma resposta à intensa hipotensão na vasculatura pós-branquial – a qual não foi observada na aorta ventral por conta da elevada resistência vascular das brânquias (SANDBLOM et al., 2016). Assim, também seria esperado que administrações de fenilefrina promovessem uma hipertensão de menor magnitude na vasculatura pós-branquial que na aorta ventral dos animais. Devido a isso, Sandblom et al. (2016) argumentaram que, para que o ganho barorreflexo seja calculado com fidedignidade em teleósteos, a pressão arterial na aorta dorsal ( $P_{DA}$ ) deve ser utilizada ao invés da  $P_{VA}$ .

Similarmente ao observado por Sandblom et al. (2016), o presente estudo constatou alterações pressóricas de maior magnitude após as administrações de fenilefrina que após as administrações de nitroprussiato de sódio em *H. malabaricus* e *O. niloticus* (Figuras 2A, B, E, F e 5). Porém, em *C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*, as magnitudes das alterações pressóricas induzidas pela fenilefrina e pelo nitroprussiato de sódio foram similares (Figuras 2C, D, G, H e 5). Em *C. gariepinus* essa observação pode ser explicada pela bifurcação existente na aorta ventral da qual deriva a circulação associada à respiração aérea (Figura 6B; JOHANSEN, 1970; GRAHAM, 1997), mas em *H. unitaeniatus* essa bifurcação ocorre na aorta dorsal (Figura 6C; JOHANSEN, 1970; SMITH E GANNON, 1978; GRAHAM, 1997) e, portanto, essa espécie apresenta a mesma fronteira de resistência vascular branquial após a aorta ventral exibida por *H. malabaricus*, *O. niloticus* e *P. fluviatilis* (Figura 6A; JOHANSEN, 1970) – constituindo uma exceção ao paradigma proposto por Sandblom et al. (2016). Além disso, Olson et al. (1997) demonstraram que infusões intrarteriais de nitroprussiato de sódio promoveram a mesma magnitude de redução na  $P_{VA}$  e  $P_{DA}$  (~0,5 kPa) em *O. mykiss*. Ademais, o fato da  $P_{DA}$  ser ~30% menor que a  $P_{VA}$  em teleósteos (FARRELL E SMITH, 1981; AXELSSON E NILSSON, 1986; OLSON et al., 1997) não afeta o cálculo do ganho barorreflexo nesses animais, pois essa variável depende da magnitude de mudança na  $f_H$  ( $\Delta f_H$ ) induzida por determinada magnitude de mudança na pressão arterial ( $\Delta P_{VA}$  ou  $\Delta P_{DA}$ ).

Considerando estudos prévios com tetrápodes, já foram reportadas espécies em que administrações de fenilefrina promoveram maior alteração na pressão arterial sistêmica que administrações de nitroprussiato de sódio (*C. latirostris*, *C. porosus*, *L. catesbeianus*, *O. cuniculus*, *R. norvegicus*, *R. schneideri* e *X. laevis*; HEAD E MCCARTY, 1987; REID, 1996; ALTIMIRAS et al., 1998; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015), espécies em que ambos os compostos vasoativos promoveram alterações de magnitudes similares na pressão arterial sistêmica (*R.*

*marina*; HEDRICK et al., 2015), e espécies em que as administrações de nitroprussiato de sódio promoveram maior alteração na pressão arterial sistêmica que administrações de fenilefrina (*A. mississippiensis*; CROSSLEY et al., 2003) – todas apresentando alterações cardíacas reflexas mais intensas às infusões de nitroprussiato de sódio que às infusões de fenilefrina. Essas observações realizadas em diferentes táxons de tetrápodes demonstram que o nitroprussiato de sódio pode engatilhar respostas cardíacas reflexas mais intensas que a fenilefrina independentemente de promover alterações pressóricas menores que esse agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, mesmo quando a pressão arterial utilizada na análise é aquela que determina a perfusão tecidual sistêmica (recíproca à  $P_{DA}$  em teleósteos).

Frente ao exposto, é improvável que o ganho barorreflexo calculado em um teleósteo utilizando a  $P_{VA}$  seja diferente daquele calculado utilizando a  $P_{DA}$  – mas caso essa diferença exista, não há razão para presumir que os padrões de divergência observados no presente estudo (ganho barorreflexo maior em teleósteos de habitat anfíbio que em teleósteos estritamente aquáticos) sejam inválidos. Ainda, a fidedignidade do ganho barorreflexo calculado em *C. gariepinus*, *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. niloticus* pode ser atestada: (1) pela tipicidade das curvas sigmóides descritoras do barorreflexo cardíaco calculadas para as quatro espécies estudadas, análogas às calculadas para outros vertebrados; (2) pelo elevado  $R^2$  das correlações entre a  $P_{VA}$  média e a  $f_H$  dos animais; e (3) pela similaridade existente entre o ganho barorreflexo ( $G_{50}$ ,  $G_{N1}$  e  $G_{N2}$ ) estimado para *H. malabaricus*, *O. niloticus* e diversos tetrápodes. Finalmente, ressalta-se que as inferências derivadas da capacidade das diferentes espécies de responder à hipertensão e à hipotensão arterial (PRB e PRT) não estão sujeitas às controvérsias supramencionadas, visto que essas variáveis dependem apenas dos dados relativos à  $f_H$  dos animais.

## 5 – CONCLUSÕES

A presente investigação demonstrou que teleósteos capazes de realizar incursões terrestres (*C. gariepinus* e *H. unitaeniatus*) apresentam maior ganho barorreflexo e capacidade de responder à hipotensão arterial (PRT) que teleósteos estritamente aquáticos (*H. malabaricus* e *O. niloticus*), sugerindo que a terrestrialidade representa uma importante força motriz na evolução da regulação pressórica barorreflexa em vertebrados. Apesar do limitado número de espécies investigadas, o presente estudo constatou uma correlação entre função barorreflexa e habitat em espécies da família Erythrinidae e em grupos externos de distante relação filogenética constituído por espécies das famílias Cichlidae e Clariidae, o que impede vieses derivados de outras pressões seletivas associadas à história filogenética dos teleósteos estudados e permite uma extrapolação segura da correlação observada. Foi demonstrado, ainda, que mesmo teleósteos estritamente aquáticos apresentam considerável ganho barorreflexo, possivelmente sensível o suficiente para manter níveis pressóricos ideais durante as atividades diárias dos indivíduos.

## 6 – REFERÊNCIAS

- ALTIMIRAS, J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 447-460, 1999.
- ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L.; AXELSSON, M. Cholinergic and adrenergic tones in the control of heart rate in teleosts. How should they be calculated? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 118, p. 131-139, 1997.
- ALTIMIRAS, J.; FRANKLIN, C. E.; AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2235-2242, 1998.
- AMEMIYA, C. T.; ALFÖLDI, J.; LEE, A. P.; FAN, S.; PHILIPPE, H.; MACCALLUM, I.; BRAASCH, I.; MANOUSAKI, T.; SCHNEIDER, I.; ROHNER, N.; ORGAN, C.; CHALOPIN, D.; SMITH, J. J.; ROBINSON, M.; DORRINGTON, R.; GERDOL, M.; AKEN, B.; BISCOTTI, M. A.; BARUCCA, M.; BAURAIN, D.; BERLIN, A. M.; BLATCH, G. L.; BUONOCORE, F.; BURMESTER, T.; CAMPBELL, M. S.; CANAPA, A.; CANNON, J. P.; CHRISTOFFELS, A.; DE MORO, G.; EDKINS, A. L.; FAN, L.; FAUSTO, A. M.; FEINER, N.; FORCONI, M.; GAMIELDIEN, J.; GNERRE, S.; GNIRKE, A.; GOLDSTONE, J. V.; HAERTY, W.; HAHN, M. E.; HESSE, U.; HOFFMANN, S.; JOHNSON, J.; KARCHNER, S. I.; KURAKU, S.; LARA, M.; LEVIN, J. Z.; LITMAN, G. W.; MAUCELLI, E.; MIYAKE, T.; MUELLER, M. G.; NELSON, D. R.; NITSCHKE, A.; OLMO, E.; OTA, T.; PALLAVICINI, A.; PANJI, S.; PICONE, B.; PONTING, C. P.; PROHASKA, S. J.; PRZYBYLSKI, D.; SAHA, N. R.; RAVI, V.; RIBEIRO, F. J.; SAUKA-SPENGLER, T.; SCAPIGLIATI, G.; SEARLE, S. M. J.; SHARPE, T.; SIMAKOV, O.; STADLER, P. F.; STEGEMAN, J. J.; SUMIYAMA, K.; TABBAA, D.; TAFER, H.; TURNER-MAIER, J.; VAN HEUSDEN, P.; WHITE, S.; WILLIAMS, L.; YANDELL, M.; BRINKMANN, H.; VOLFF, J. N.; TABIN, C. J.; SHUBIN, N.; SCHARTL, M.; JAFFE, D. B.; POSTLETHWAIT, J. H.; VENKATESH, B.; DI PALMA, F.; LANDER, E. S.; MEYER, A.; LINDBLAD-TOH, K. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. **Nature**, v. 496, p. 311-316, 2013.
- ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; ABE, A. S.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H. Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake *Python molurus*. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 184, p. 903-912, 2014.
- ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; TEIXEIRA, M. T.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L. Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Fish Biochemistry and Physiology**, v. 42, p. 1213-1224, 2016.
- AXELSSON, M.; FRITSCHKE, R. Cannulation techniques. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes: Analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 1994. v. 3, p. 17-36.
- AXELSSON, M.; NILSSON, S. Blood pressure control during exercise in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Journal of Experimental Biology**, v. 126, p. 225-236, 1986.
- BAENSCH, H. A.; RIEHL, R. **Aquarien atlas**. Melle: Verlag für Natur-und Heimtierkunde, 1985.

- BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60, p. 121-162, 1985.
- BELÃO, T. C.; LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Cardiorespiratory responses to hypoxia in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), an air-breathing fish. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 181, p. 905-916, 2011.
- BELÃO, T. C.; ZERAIK, V. M.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; LEITE, C. A. C.; RANTIN, F. T. Control of cardiorespiratory function in response to hypoxia in an air-breathing fish, the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 187, p. 130-140, 2015.
- BERGER, P. J. The reptilian baroreceptor and its role in cardiovascular control. **American Zoologist**, v. 27, p. 111-120, 1987.
- BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. J. **Tilapias: Biology and Exploitation**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2000.
- BLASCO, F. R.; MCKENZIE, D. J.; TAYLOR, E. W.; RANTIN, F. T. The role of the autonomic nervous system in control of cardiac and air-breathing responses to sustained aerobic exercise in the African sharptooth catfish *Clarias gariepinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 203, p. 273-280, 2017.
- BRUTON, M. N. The food and feeding behaviour of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) in Lake Sibaya, South Africa, with emphasis on its role as a predator of cichlids. **Transactions of the Zoological Society of London**, v. 35, p. 47-114, 1979.
- CHAPLEAU, M. W. Baroreceptor reflexes. In: ROBERTSON, D.; BIAGGIONI, I.; BURNSTOCK, G.; LOW, P. A.; PATON, J. F. R. (Eds.). **Primer on the Autonomic Nervous System**. Cambridge: Academic Press, 2012. p. 161-165.
- CROSSLEY II, D. A.; HICKS, J. W.; ALTIMIRAS, J. Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 2895-2902, 2003.
- DUFF, D.W.; OLSON, K. R. Response of rainbow trout to constant-pressure and constant-volume hemorrhage. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. R1307-R1314, 1989.
- EKSTRÖM, A.; HELLGREN, K.; GRÄNS, A.; PICHAUD, N.; SANDBLÖM, E. Dynamic changes in scope for heart rate and cardiac autonomic control during warm acclimation in rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 1106-1109, 2016.
- FARRELL, A. P. Cardiovascular events associated with air breathing in two teleosts, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Arapaima gigas*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 953-958, 1978.
- FARRELL, A. P. Cardiovascular responses in the sea raven, *Hemitripterus americanus*, elicited by vascular compression. **Journal of Experimental Biology**, v. 122, p. 65-80, 1986.
- FARRELL, A. P.; SMITH, D. G. Microvascular pressures in gill filaments of lingcod (*Ophiodon elongatus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 341-344, 1981.

- FLORINDO, L. H.; ARMELIN, V. A.; MCKENZIE, D. J.; RANTIN, F. T. Control of air-breathing in fishes: central and peripheral receptors. **Acta Histochemica**, v. 120, p. 642-653, 2018.
- GOETZ, R. H.; WARREN, J. V.; HAUER, O. H.; PATTERSON, J. L.; DOYLE, J. T.; KEEN, E. N.; MCGREGOR, M. Circulation of the giraffe. **Circulation**, v. 8, p. 1049-1058, 1960.
- GRAHAM, J.B. **Air breathing fishes: evolution, diversity and adaptation**. San Diego: Academic Press, 1997.
- HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 458-462, 2010.
- HARGENS, A. R.; MILLARD, R. W.; PETTERSSON, K.; JOHANSEN, K. Gravitational haemodynamics and oedema prevention in the giraffe. **Nature**, v. 329, p. 59-60, 1987.
- HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 21, p. 203-213, 1987.
- HEDRICK, M. S.; MCNEW, K. A.; CROSSLEY II, D. A. Baroreflex function in anurans from different environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 144-148, 2015.
- IVERSEN, N. K.; DUPONT-PRINET, A.; FINDORF, I.; MCKENZIE, D. J.; WANG, T. Autonomic regulation of the heart during digestion and aerobic swimming in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 463-468, 2010.
- JOHANSEN, K. Air-breathing in fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish physiology: the nervous system, circulation, and respiration**. Cambridge: Academic Press, 1970. v. 4, p. 361-411.
- KENT, B. B.; DRANE, J. W.; BLUMENSTEIN, B.; MANNING, J. W. A mathematical model to assess changes in the baroreceptor reflex. **Cardiology**, v. 57, p. 295-310, 1972.
- KRAMER, D. L.; LINDSEY, C. C.; MOODIE, G. E. E.; STEVENS, E. D. The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 717-729, 1978.
- LILLYWHITE, H. B. Circulatory adaptations of snakes to gravity. **American Zoologist**, v. 27, p. 81-95, 1987.
- LILLYWHITE, H. B. Orthostatic intolerance of viperid snakes. **Physiological Zoology**, v. 66, p. 1000-1014, 1993.
- LILLYWHITE, H. B. Gravity, blood circulation, and the adaptation of form and function in lower vertebrates. **Journal of Experimental Zoology**, v. 275, p. 217-225, 1996.
- LILLYWHITE, H. B.; DONALD, J. A. Neural regulation of arterial blood pressure in snakes. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1260-1283, 1994.

- LILLYWHITE, H. B.; HENDERSON, R. W. Behavioral and functional ecology of arboreal snakes. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T. (Eds.). **Snakes: ecology and behavior**. New York: McGraw-Hill, 1993. p. 1-48.
- LILLYWHITE, H. B.; SEYMOUR, R. S. Regulation of arterial blood pressure in Australian tiger snakes. **Journal of Experimental Biology**, v. 75, p. 65-79, 1978.
- LILLYWHITE, H. B.; SMITS, W. Cardiovascular adaptations of viperid snakes. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. (Eds.). **Biology of pitvipers**. Tyler: Selva Publishing, 1992. p. 143-153.
- MARTINS, N. D.; COLVARA, W. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 84, p. 154-159, 2011.
- MCKENZIE, D. J.; CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; MICHELI, M.; RANTIN, F. T.; ABE, A. S. The autonomic control and functional significance of the changes in heart rate associated with air breathing in the jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 4224-4232, 2007.
- MCKENZIE, D. J.; BELÃO, T. C.; KILLEN, S. S.; RANTIN, F. T. To boldly gulp: standard metabolic rate and boldness have context-dependent influences on risk-taking to breathe air in a catfish. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 3762-3770, 2016.
- MEASEY, G. J. Terrestrial prey capture in *Xenopus laevis*. **Copeia**, v. 1998, p. 787-791, 1998.
- MONTEIRO, D. A.; THOMAZ, J. M.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiorespiratory responses to graded hypoxia in the neotropical fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*) after waterborne or trophic exposure to inorganic mercury. **Aquatic Toxicology**, v. 140-141, p. 346-355, 2013.
- MOOR, I. J.; BRUTON, M. N. **Atlas of alien and translocated indigenous aquatic animals in southern Africa. A report of the Committee for Nature Conservation Research National Programme for Ecosystem Research. South African Scientific Programmes Report No. 144**. Port Elizabeth: Committee for Nature Conservation Research National Programme for Ecosystem Research, 1988.
- MOREY-HOLTON, E. R. The impact of gravity on life. In: ROTHSCHILD, L.; LISTER, A. (Eds.). **Evolution on planet Earth: The impact of physical environment**. New York: Academic Press, 2003. p. 143-159.
- MUELLER, C. A.; BURGGREN, W. W.; CROSSLEY II, D. A. ANG II and baroreflex control of heart rate in embryonic chickens (*Gallus gallus domesticus*). **American Journal of Physiology**, v. 305, p. R855-R863, 2013.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. Quinta edição. Hoboken: Wiley, 2016.
- OGILVY, C. S.; DUBOIS, A. B. Effect of tilting on blood pressure and interstitial fluid pressures of blue fish and smooth dogfish. **American Journal of Physiology**, v. 242, p. R70-R76, 1982.

OLSON, K. R.; CONKLIN, D. J.; FARRELL, A. P.; KEEN, J. E.; TAKEI, Y.; WEAVER, L.; SMITH Jr, M. P.; ZHANG, Y. Effects of natriuretic peptides and nitroprusside on venous function in trout. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. R527-R539, 1997.

PACE, C. M.; GIBB, A. C. Sustained terrestrial locomotion in air-breathing fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 84, p. 639-660, 2014.

PAIVA, M. **Fisioecologia da traira, *Hoplias malabaricus* (Bloch), no nordeste Brasileiro**. 1972. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PETERSEN, K. K.; HØRLYCK, A.; ØSTERGAARD, K. H.; ANDRESEN, J.; BROEGGER, T.; SKOVGAARD, N.; TELINIUS, N.; LAHER, I.; BERTELSEN, M. F.; GRØNDAHL, C.; SMERUP, M.; SECHER, N. H.; BRØNDUM, E.; HASENKAM, J. M.; WANG, T.; BAANDRUP, U.; AALKJAER, C. Protection against high intravascular pressure in giraffe legs. **American Journal of Physiology**, v. 305, p. R1021-R1030, 2013.

PETRY, A. C.; AGOSTINHO, A. A.; PIANA, P. A.; GOMES, L. C. Effects of temperature on prey consumption and growth in mass of juvenile trahira *Hoplias aff. malabaricus* (Bloch, 1794). **Journal of Fish Biology**, v. 70, p. 1855-1864, 2007.

PHILLIPPART, J. C.; RUWET, J. C. Ecology and distribution of tilapias. In: PULLIN, R. S. V.; LOWE-MCCONNELL, R. H. (Eds.). **The biology and culture of tilapias**. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1982. p. 15-60.

RANTIN, F. T.; GLASS, M. L.; KALININ, A. L.; VERZOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environmental Biology of Fishes**, v. 36, p. 93-97, 1993.

REID, I. A. Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. **News in Physiological Science**, v. 11, p. 270-274, 1996.

REID, S. G.; SUNDIN, L.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traira (*Hoplias malabaricus*): CO<sub>2</sub>/pH chemoresponses. **Respiration Physiology**, v. 120, p. 47-59, 2000.

RIEHL, R.; BAENSCH, H. A. **Aquarien atlas**. Melle: Verlag für Natur-und Heimtierkunde, 1991.

SABINO, J.; ZUANON, J. A stream fish assemblage in Central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 8, p. 201-210, 1998.

SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 821-829, 2005.

SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Autonomic control of circulation in fish: A comparative view. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 165, p. 127-139, 2011.

SANDBLOM, E.; FARRELL, A. P.; ALTIMIRAS, J.; AXELSSON, M.; CLAIREAUX, G. Cardiac preload and venous return in swimming sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 1927-1935, 2005.



- SANDBLOM, E.; EKSTRÖM, A.; BRIJS, J.; SUNDSTRÖM, L. F.; JUTFELT, F.; CLARK, T. D.; ADILL, A.; AHO, T.; GRÄNS, A. Cardiac reflexes in a warming world: thermal plasticity of barostatic control and autonomic tones in a temperate fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 2880-2887, 2016.
- SATCHELL, G. H. The circulatory system of air-breathing fish. In: HUGHES, G. M. (Ed.). **Respiration of amphibious vertebrates**. London: Academic Press, 1976. p. 105-123.
- SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 179, p. 1-56, 2009.
- SECOR, S. M.; WHITE, S. E. Prioritizing blood flow: cardiovascular performance in response to the competing demands of locomotion and digestion for the Burmese python, *Python molurus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 78-88, 2010.
- SECOR, S. M.; HICKS, J. W.; BENNETT, A. F. Ventilatory and cardiovascular responses of a python (*Python molurus*) to exercise and digestion. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 2447-2454, 2000.
- SEYMOUR, R. S.; ARNDT, J. O. Independent effects of heart-head distance and caudal blood pooling on blood pressure regulation in aquatic and terrestrial snakes. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 1305-1311, 2004.
- SEYMOUR, R. S.; LILLYWHITE, H. B. Blood pressure in snakes from different habitats. **Nature**, v. 264, p. 664-666, 1976.
- SEYMOUR, R. S.; HARGENS, A. R.; PEDLEY, T. J. The heart works against gravity. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. R715-R720, 1993.
- SMITH, D. G.; GANNON, B. J. Selective control of branchial arch perfusion in an air-breathing Amazonian fish *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 959-964, 1978.
- SUNDELL, E.; MORGENROTH, D.; BRIJS, J.; EKSTRÖM, A.; GRÄNS, A.; SANDBLOM, E. Seawater acclimation affects cardiac output and adrenergic control of blood pressure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-implications for salinity variations now and in the future. **Conservation Physiology**, v. 22, p. coy061, 2018.
- SUNDIN, L. I.; REID, S. G.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traïra (*Hoplias malabaricus*) O<sub>2</sub> chemoresponses. **Respiration Physiology**, v. 116, p. 181-199, 1999.
- SUNDIN, L.; REID, S. G.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 1225-1239, 2000.
- TROIANO, N. M.; ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; ABE, A. S.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H. The autonomic control of upright posture tachycardia in the arboreal lizard *Iguana iguana*. **Journal of Experimental Zoology Part A**, v. 329, p. 130-139, 2018.
- VAN VLIET, B. N.; WEST, N. H. Phylogenetic trends in the baroreceptor control of arterial blood pressure. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1284-1304, 1994.

WANG, T.; TAYLOR, E. W.; ANDRADE, D.; ABE, A. S. Autonomic control of heart rate during forced activity and digestion in the snake *Boa constrictor*. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 3553-3560, 2001.

XU, J.; LIU, Y.; CUI, S.; MIAO, X. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. **Aquacultural Engineering**, v. 35, p. 207-217, 2006.

ZARDOYA, R.; MEYER, A. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 7380-7383, 2001.

ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 81-88, 2015.

ZENA, L. A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; BÍCEGO, K. C. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 725-733, 2016a.

ZENA, L. A.; SILVA, G. S. F.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Baroreflex regulation affects ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 3605-3615, 2016b.

ZERAIK, V. M.; BELÃO, T. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Branchial O<sub>2</sub> chemoreceptors in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: control of cardiorespiratory function in response to hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 166, p. 17-25, 2013.

## **CAPÍTULO 4**

---

### **O USO DO MÉTODO DA SEQUÊNCIA COMO ESTRATÉGIA PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA EM TELEÓSTEOS**

**Periódico alvo:** *Journal of Experimental Biology (Methods and Techniques)*.

## **RESUMO**

Atualmente, a técnica mais utilizada para o estudo do barorreflexo em vertebrados ectotérmicos é o Método de Oxford. Esse método consiste na realização de intervenções farmacológicas na pressão arterial para posterior avaliação das respostas reflexas no intervalo de pulso cardíaco (IP). Embora bem estabelecido, o Método Oxford apresenta algumas limitações importantes, principalmente associadas aos efeitos secundários das administrações farmacológicas (como indução de hipervolemia em animais pequenos e efeitos secundários das drogas vasoativas nos componentes centrais e periféricos do barorreflexo). Nesse contexto, um método alternativo foi desenvolvido para o estudo do barorreflexo, denominado Método de Sequência, que consiste na avaliação computadorizada dos ajustes barorreflexos naturais do IP (sem a necessidade de administrações farmacológicas). Assim, sabendo que não há relato sobre o uso do Método de Sequência em vertebrados ectotérmicos, o presente estudo validou esse método para uso em peixes, e determinou a configuração ótima para sua utilização nesses animais.

**Palavras-chave:** Barorreceptores. Bloqueio autonômico. Método da Sequência. Método de Oxford. Teleósteo.

## ABSTRACT

Currently, the most used technique for the study of baroreflex in ectothermic vertebrates is the Oxford Method. This method consists in the accomplishment of pharmacological interventions on arterial pressure for the subsequent evaluation of cardiac pulse interval (PI) reflex responses. Although well established, the Oxford Method has some important limitations, mainly associated with the secondary effects of pharmacological administrations (such as induction of hypervolemia in small animals and secondary effects of vasoactive drugs on central and peripheral baroreflex components). In this context, an alternative method for the study of baroreflex was developed, called the Sequence Method, which consists in the computerized evaluation of naturally-occurring baroreflex adjustments of PI (without the need for pharmacological administrations). Thus, knowing that there is no report on the use of the Sequence Method in ectothermic vertebrates, we validated this method for use in fish, and determined the optimal configuration for its employment in these animals.

**Keywords:** Autonomic blockade. Baroreceptors. Oxford Method. Sequence Method. Teleost.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático exemplificando o cálculo do ganho barorreflexo por meio do Método da Sequência e por meio do Método de Oxford. A figura representa a localização computadorizada das sequências barorreflexas espontâneas (A), o cálculo das regressões lineares entre a pressão arterial média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) e o intervalo de pulso cardíaco (IP) de cada sequência barorreflexa para estimativa do ganho barorreflexo espontâneo por meio do Método da Sequência (GBE; B), um exemplo das administrações de fármacos vasoativos associadas ao Método de Oxford (C, D), e o cálculo de uma regressão logística sigmóide entre a  $P_{VA}$  média e o IP (obtidos anteriormente e posteriormente cada administração de fármaco vasoativo) para estimativa do ganho máximo do barorreflexo por meio do Método de Oxford ( $G_{50}$ ; E). CAM: coeficiente angular médio; Fe: fenilefrina; NPS: nitroprussiato de sódio. Fonte: o autor. ....102
- Figura 2.** Curvas sigmóides barorreflexas individuais (A, B) e curvas sigmóides barorreflexas médias (C, D) de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie). Em A e B, os símbolos diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos (valores absolutos). Em C e D, o símbolo preto corresponde às variáveis basais enquanto os símbolos cinza correspondem às respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo (média  $\pm$  EPM).  $P_{VA}$  média: pressão média na aorta ventral; IP: intervalo de pulso cardíaco. Fonte: o autor. ....105
- Figura 3.** Ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ) e ganho barorreflexo espontâneo (GBE) de *H. malabaricus* (A) e *O. niloticus* (B;  $N = 9$  para cada espécie) estimados por meio do Método de Oxford (MO) e Método da Sequência (MS), respectivamente. A linha tracejada representa o valor do  $G_{50}$ , estimado pelo MO. Algumas barras apresentam menos pontos de dispersão porque alguns indivíduos não exibiram nenhuma sequência barorreflexa em determinadas configurações de software para que o GBE pudesse ser calculado. CMSB: comprimento mínimo das sequências barorreflexas utilizado na configuração da análise. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o ganho barorreflexo calculado por meio do MO e por meio do MS ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor. ....108

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variáveis cardiovasculares basais e variáveis barorreflexas derivadas das curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie). ..... 105
- Tabela 2.** Variáveis cardiovasculares de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie) anteriormente e posteriormente administração intrarterial de solução salina (0,9% NaCl)..... 106
- Tabela 3.** Variáveis cardiovasculares de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie) sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). ..... 106
- Tabela 4.** Variáveis barorreflexas de *H. malabaricus* e *O. niloticus*, não-tratados e sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, determinadas pelo Método da Sequência..... 107

## LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b><i>B</i></b>	Coefficiente angular
<b><i>G</i><sub>50</sub></b>	Ganho máximo do barorreflexo
<b>GBE</b>	Ganho barorreflexo espontâneo
<b>IEB</b>	Índice de efetividade do barorreflexo
<b>IP</b>	Intervalo de pulso
<b>MÁX</b>	IP máximo atingido pelo barorreflexo
<b>MÍN</b>	IP mínimo atingido pelo barorreflexo
<b><i>P</i><sub>A</sub></b>	Pressão arterial
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b><i>PO</i><sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigênio
<b><i>P</i><sub>VA</sub></b>	Pressão arterial na aorta ventral
<b><i>P</i><sub>VA</sub> média<sub>50</sub></b>	<i>P</i> <sub>VA</sub> média no centro da curva sigmóide



## 1 – INTRODUÇÃO

O barorreflexo constitui um mecanismo fundamental para a regulação em curto prazo da pressão arterial ( $P_A$ ) em grande parte dos vertebrados, o qual assegura uma pressão de perfusão tecidual adequada enquanto previne a formação de edemas e danos a órgãos barossensíveis como cérebro e rins (MANCIA E MARK, 1983; BAGSHAW, 1985; BRZEZINSKI, 1990; CHAPLEAU, 2012). Esse reflexo consiste em uma alça de retroalimentação negativa, em que alterações pressóricas são detectadas por barorreceptores que desencadeiam mudanças proporcionais no intervalo de pulso cardíaco (IP; recíproco à frequência cardíaca) e na condutância vascular sistêmica (recíproca à resistência vascular sistêmica) para restaurar a  $P_A$  (BAGSHAW, 1985; VAN VLIET E WEST, 1994; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; CHAPLEAU, 2012; HEDRICK et al., 2015). Devido a sua importância para o apropriado desempenho cardiovascular, a função barorreflexa tem sido caracterizada sob uma variedade de circunstâncias em diversos grupos de vertebrados (LEE et al., 2002; LA ROVERE et al., 2008; HAGENSEN et al., 2010; MUELLER et al., 2013; ARMELIN et al., 2014; 2016; ZENA et al., 2015; 2016a).

A maioria dos estudos desenvolvidos em vertebrados ectotérmicos utilizou o chamado “Método Farmacológico de Oxford” para caracterizar o reflexo barostático. Tal método é baseado em administrações seriadas de fármacos vasoativos de ação curta que aumentam ou reduzem a  $P_A$  dos animais por meio de alterações na resistência vascular periférica. Após as administrações farmacológicas em várias dosagens, é possível construir uma correlação entre a  $P_A$  e o IP dos animais observados anteriormente e posteriormente tais administrações – da qual pode-se derivar o ponto de operação do barorreflexo (i.e., a  $P_A$  e o IP nos quais o barorreflexo opera na circunstância estudada) e a sensibilidade desse ajuste fisiológico (i.e., a magnitude da resposta no IP por alteração unitária na  $P_A$ ; também conhecida como ganho barorreflexo) (ALTIMIRAS et al., 1998; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b). No entanto, as repetidas administrações farmacológicas podem induzir hipervolemia e influenciar as variáveis barorreflexas, especialmente em pequenos animais (HOHNKE, 1975; GUYTON, 1991; DIEHL et al., 2001). As drogas vasoativas utilizadas também podem desencadear outros mecanismos reguladores da  $P_A$ , como o sistema renina-angiotensina-aldosterona, que podem influenciar os resultados finais (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992). Além disso, as drogas vasoativas, particularmente o doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio, podem exercer efeitos diretos no sistema nervoso central e no nodo sinoatrial dos animais, violando a premissa do Método de Oxford de que as intervenções farmacológicas não afetam além da via vasomotora do barorreflexo (BERGEL et al., 1980; COLEMAN, 1980; KLIMASCHEWSKI et al., 1992; ZENA et al., 2013).

Nesse contexto, para contornar a necessidade de administrações farmacológicas, Bertinieri et al. (1985) desenvolveram o chamado "Método de Sequência" para caracterização do barorreflexo. Essa abordagem é baseada na série temporal batimento a batimento da  $P_A$  e do IP para identificar respostas barorreflexas espontâneas, isto é, sequências de ciclos cardíacos consecutivos em que alterações espontâneas na  $P_A$  são acompanhadas por respostas reflexas no IP. Essas sequências barorreflexas são então submetidas a regressões lineares individuais entre a  $P_A$  e o IP, e o coeficiente angular médio de todas as regressões é tomado como uma medida do ganho barorreflexo espontâneo (GBE) (BERTINIERI et al., 1985; DI RIENZO et al., 2001a; STAUSS et al., 2006). Essa técnica é menos estressante para os animais experimentais e fornece uma avaliação mais dinâmica do reflexo barostático, sem manipulações diretas da  $P_A$  (DI RIENZO et al., 2001a).

O Método de Sequência é amplamente utilizado em mamíferos (DI RIENZO et al., 2001a; MOFFITT et al., 2005; STAUSS et al., 2006; LA ROVERE et al., 2008; LAUDE et al., 2008a), mas nunca foi empregado em vertebrados ectotérmicos. Assim, o presente estudo visou validar esse método utilizando dois teleósteos distintos como modelos experimentais para testar sua eficácia – a Traíra (*Hoplias malabaricus*) e a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *H. malabaricus* (Ordem Characiformes, Família Erythrinidae) é um predador de emboscada carnívoro, sedentário e solitário que vive em ambientes lênticos (PAIVA, 1972; RANTIN et al., 1993; SABINO E ZUANON, 1998; PETRY et al., 2007), enquanto *O. niloticus* (Ordem Cichliformes, Família Cichlidae) é um peixe onívoro, altamente ativo e social encontrado em ambientes lênticos e lóticos (BEVERIDGE E MCANDREW, 2000).

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – OS ANIMAIS

Doze espécimes de *H. malabaricus* (Bloch, 1794;  $219,7 \pm 17,1$  g, média  $\pm$  EPM) e *O. niloticus* (Linnaeus, 1758;  $257,5 \pm 16,2$  g), de ambos os sexos, foram utilizados no presente estudo. Os animais foram adquiridos em pisciculturas localizadas na região de São José do Rio Preto (São Paulo, Brasil) e passaram por um período de aclimação mínimo de um mês em tanques de 500 l sob fotoperíodo natural, abastecidos com água decolorada, constantemente aerada com ar atmosférico (pressão parcial de oxigênio –  $PO_2$  – de  $\sim 18$  kPa), com potencial hidrogeniônico (pH) de 6,5 e temperatura de  $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  (média  $\pm$  EPM). A água dos tanques foi substituída a cada 72 h e cada espécie foi mantida em tanques dedicados com densidade populacional máxima de 10 indivíduos.

Os animais foram alimentados até a saciedade em dias alternados com pedaços de coração bovino (*H. malabaricus*) ou ração comercial para peixes (32% de proteína; *O. niloticus*). Para evitar a eliminação de fezes nas câmaras experimentais e impedir a ocorrência de alterações metabólicas associadas à digestão, a alimentação dos animais foi suspensa 72 h antes do início dos experimentos (SECOR, 2009; IVERSEN et al., 2010). Além disso, devido a possíveis variações circadianas e sazonais nas variáveis fisiológicas das espécies estudadas, os experimentos foram realizados pela manhã (das 7h às 12h) durante as estações da primavera e verão (ALTIMIRAS, 1999; ZENA et al., 2016a). A presente etapa da pesquisa foi realizada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), mais especificamente no Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados do Departamento de Zoologia e Botânica. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição supracitada (Protocolo 144/2016) e conduzidos de acordo com os regulamentos e diretrizes éticas vigentes no Brasil.

## 2.2 – FÁRMACOS

Benzocaína (anestésico), cloridrato de fenilefrina (agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico), sulfato de atropina (antagonista muscarínico) e cloridrato de propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). Heparina sódica (anticoagulante) foi adquirida da Cristália (Itapira, São Paulo, Brasil). Todos os fármacos foram preparados no momento do uso e dissolvidos em água (benzocaína) ou solução salina estéril (0,9% NaCl) (demais compostos).

## 2.3 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS

Os animais foram inicialmente anestesiados por submersão em solução aquosa de benzocaína (100 mg.l<sup>-1</sup>). Ao apresentarem perda de equilíbrio e ausência de movimentos operculares, os mesmos foram transferidos para uma mesa cirúrgica com um sistema de recirculação de solução de benzocaína (50 mg.l<sup>-1</sup>) constantemente aerada, a qual irrigava as brânquias dos animais constantemente para manter as trocas gasosas e a anestesia. Após, uma cânula de polietileno (PE 50) preenchida com solução salina heparinizada (100 UI.ml<sup>-1</sup>; 0,9% NaCl) foi inserida na artéria branquial aferente do terceiro arco branquial esquerdo dos animais, avançada em direção à aorta ventral, e fixada por meio de uma ligadura em volta de um flange e do arco branquial (AXELSSON E FRITSCHKE, 1994).

Subsequentemente, os animais foram ventilados com água isenta de benzocaína até a recuperação da anestesia, e então foram transferidos para câmaras experimentais individuais (20

l) abastecidas com água sem cloro, constantemente aerada com ar atmosférico ( $PO_2 \sim 18$  kPa), com pH de 6,5 e temperatura de  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (média  $\pm$  EPM). Todos os procedimentos supracitados foram realizados em  $\sim 15$  min, e os animais passaram por um período de recuperação pós-cirúrgica de 12-16 h anteriormente ao início dos experimentos.

## 2.4 – AQUISIÇÃO DAS VARIÁVEIS CARDIOVASCULARES

Após a recuperação pós-cirúrgica, a cânula aórtica foi conectada à um transdutor de pressão (BIOPAC SS13L, Goleta, Califórnia, EUA), previamente calibrado por meio de uma coluna estática de água, para adquirir continuamente valores de pressão à 1000 Hz utilizando um sistema de aquisição de dados BIOPAC MP36 (BIOPAC Systems, Goleta, Califórnia, EUA). Dessa forma, a cânula aórtica permitiu tanto a realização de administrações farmacológicas quanto a aquisição da  $P_A$  na aorta ventral dos indivíduos ( $P_{VA}$ ) – a qual foi utilizada para avaliar a  $P_A$  média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média; kPa) e o IP (ms) dos mesmos. A  $P_{VA}$  média foi calculada como a média aritmética do sinal da  $P_{VA}$ , e o IP foi obtido por meio da contagem do tempo existente entre os pulsos no sinal da  $P_{VA}$ .

A utilização da  $P_A$  sistólica para análise do barorreflexo é bastante frequente (PARATI et al., 2000; DI RIENZO et al., 2001a; MOFFITT et al., 2005; STAUSS et al., 2006). No entanto, a  $P_A$  média foi utilizada no presente estudo por se tratar de um indicador mais fidedigno da perfusão tecidual em comparação com a  $P_A$  sistólica ou  $P_A$  diastólica (BRZEZINSKI, 1990). Adicionalmente, a maioria dos estudos prévios acerca do reflexo barostático de vertebrados ectotérmicos foram desenvolvidos utilizando a  $P_A$  média para esse tipo de análise (FARRELL, 1986; ALTIMIRAS et al., 1998; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b). Ademais, uma correlação consistente entre a taxa de disparo dos barorreceptores e a  $P_A$  média já foi observada em *Felis catus*, um achado que também dá suporte ao uso da  $P_A$  média para análise do barorreflexo (ARNDT et al. 1977). Por fim, o IP foi utilizado na presente investigação porque o software usado para análise do barorreflexo pelo Método da Sequência (CardioSeries v2.4; disponível em [www.danielpenteado.com](http://www.danielpenteado.com)) não permite a entrada de dados de frequência cardíaca.

## 2.5 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As variáveis cardiovasculares dos animais ( $N = 9$  para cada espécie) foram coletadas até que permanecessem estáveis por 60 min (valores basais). Então,  $2 \text{ ml.kg}^{-1}$  de solução salina (0,9% NaCl) foi administrada via cânula aórtica para investigar possíveis influências do volume injetado nas variáveis estudadas. Subsequentemente, oito administrações seriadas

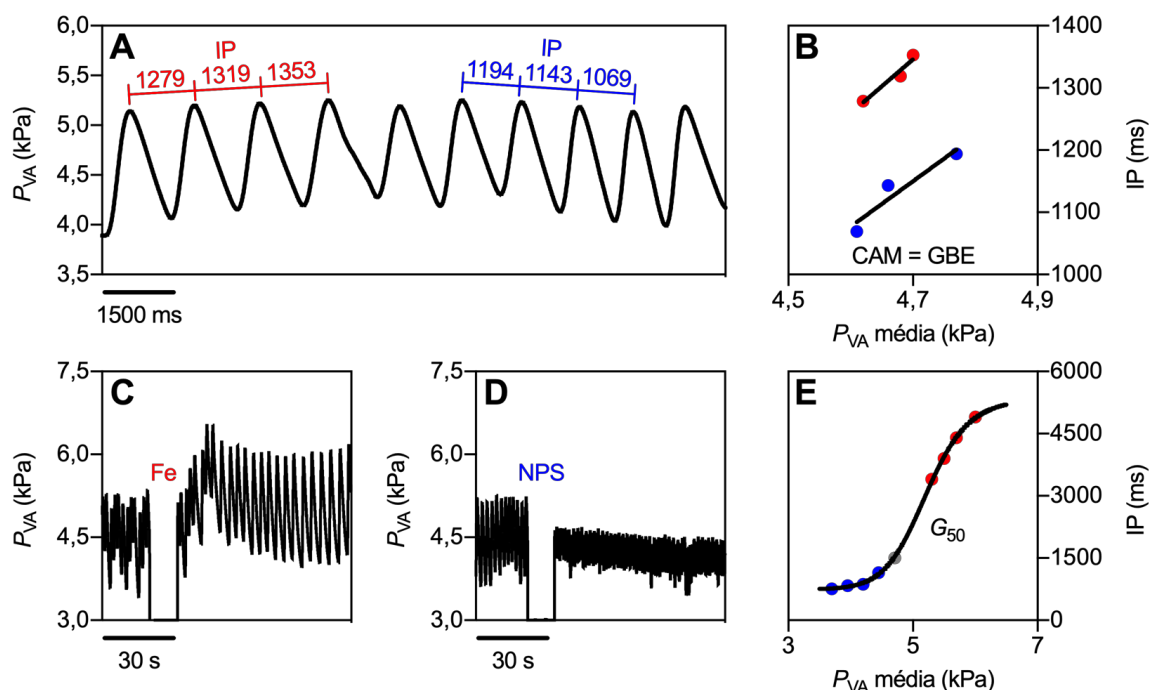
e crescentes de cloridrato de fenilefrina (Sigma-Aldrich; 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e de nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich; 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) foram realizadas *in bolus* na aorta ventral dos animais para aquisição das respostas cardiovasculares à tais fármacos vasoativos (que induzem hipertensão e hipotensão arterial, respectivamente). Cada administração foi seguida de um *flush* de 0,2 ml de solução salina heparinizada (100 UI.ml<sup>-1</sup>; 0,9% NaCl) para que os fármacos não permanecessem estagnados no interior da cânula. Além disso, entre uma administração farmacológica e outra, foi aguardado tempo suficiente para que a  $P_{VA}$  média e o IP retornassem aos valores basais (o que geralmente ocorria dentro de 30 min, exceto quando as maiores doses eram aplicadas).

Considerando que a regulação barorreflexa da  $P_A$  é mediada pelo sistema nervoso autônomo em vertebrados (BAGSHAW, 1985; ALTIMIRAS, 1999; ARMELIN et al., 2014; SANDBLOM et al., 2016; ZENA et al., 2016a), um último teste foi realizado em outros espécimes ( $N = 3$  para cada espécie) para viabilizar a confirmação da natureza barorreflexa das respostas cardíacas estudadas. Nesses animais, um duplo bloqueio autonômico cardíaco foi estabelecido por meio da administração conjunta de sulfato de atropina (1,5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ; 1  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) e de cloridrato de propranolol (1,5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ; 1  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) via cânula aórtica. Então, após 30 min para que a atropina e o propranolol exercessem seus efeitos (ALTIMIRAS et al., 1997), as variáveis cardiovasculares dos animais foram coletadas por mais 60 min antes da realização de uma administração de cloridrato de fenilefrina (40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e uma administração de nitroprussiato de sódio (80  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) para aquisição das respostas cardiovasculares à hipertensão e hipotensão arterial. Entre uma administração de fármaco vasoativo e outra, foi aguardado tempo suficiente para que as variáveis estudadas retornassem aos valores observados anteriormente à administração de fenilefrina.

## 2.6 – ANÁLISE DO BARORREFLEXO POR MEIO DO MÉTODO DA SEQUÊNCIA

Séries temporais de 60 min contendo os valores da  $P_{VA}$  média e do IP batimento a batimento adquiridas dos animais não-tratados ( $N = 9$  para cada espécie) e sob duplo bloqueio autonômico cardíaco ( $N = 3$  para cada espécie) foram analisadas no software CardioSeries v2.4. O software foi programado para localizar sequências barorreflexas com quatro ou mais ciclos cardíacos consecutivos, em que a  $P_{VA}$  média mudou progressivamente em uma direção e foi acompanhada por mudanças reflexas proporcionais no IP (Figura 1A). Limiares de 0,00 kPa ( $> 0,00$  kPa) e 0 ms ( $> 0$  ms) foram utilizados para detecção de alterações na  $P_{VA}$  média e no IP, respectivamente. Uma vez que alterações progressivas na  $P_{VA}$  média em uma direção foram identificadas, o software buscou mudanças reflexas

proporcionais no IP sem atraso (i.e., zero ciclos cardíacos entre a alteração espontânea na  $P_{VA}$  média e a alteração reflexa no IP), e calculou uma regressão linear entre a  $P_{VA}$  média e o IP de cada sequência barorreflexa detectada para fornecer seus coeficientes de correlação e inclinação (Figura 1B). Para evitar vieses induzidos por sequências geradas por outros mecanismos que não o barorreflexo, apenas sequências com coeficiente de correlação  $\geq 0,80$  foram consideradas na análise.



**Figura 1.** Desenho esquemático exemplificando o cálculo do ganho barorreflexo por meio do Método da Sequência e por meio do Método de Oxford. A figura representa a localização computadorizada das sequências barorreflexas espontâneas (A), o cálculo das regressões lineares entre a pressão arterial média na aorta ventral ( $P_{VA}$  média) e o intervalo de pulso cardíaco (IP) de cada sequência barorreflexa para estimativa do ganho barorreflexo espontâneo por meio do Método da Sequência (GBE; B), um exemplo das administrações de fármacos vasoativos associadas ao Método de Oxford (C, D), e o cálculo de uma regressão logística sigmóide entre a  $P_{VA}$  média e o IP (obtidos anteriormente e posteriormente cada administração de fármaco vasoativo) para estimativa do ganho máximo do barorreflexo por meio do Método de Oxford ( $G_{50}$ ; E). CAM: coeficiente angular médio; Fe: fenilefrina; NPS: nitroprussiato de sódio. Fonte: o autor.

Em seguida, as sequências barorreflexas com coeficientes de inclinação com valores atípicos (*outliers*) foram identificadas e removidas da análise pelo método ROUT (*Robust Regression and Outlier Removal*;  $Q = 1\%$ ). O GBE foi calculado para cada animal como a média aritmética do coeficiente angular de todas as sequências barorreflexas individuais (BERTINIERI et al., 1985; STAUSS et al., 2006) (Figura 1B). O índice de efetividade do barorreflexo (IEB; sem unidade), relativo à porcentagem das mudanças espontâneas na  $P_{VA}$  média que desencadearam respostas barorreflexas, foi calculado para cada animal como a razão entre o número de sequências barorreflexas e o número de alterações progressivas na

$P_{VA}$  média que foram ou não seguidas de alterações no IP (DI RIENZO et al., 2001b). Por fim, para determinar a melhor configuração de software para utilização do Método da Sequência em teleósteos, os procedimentos supracitados foram repetidos com as seguintes configurações: sequências barorreflexas com quatro ou mais ciclos cardíacos e atraso de um ciclo cardíaco, sequências barorreflexas com três ou mais ciclos cardíacos e atraso de zero ciclo cardíaco, e sequências barorreflexas com três ou mais ciclos cardíacos e atraso de um ciclo cardíaco.

## 2.7 – ANÁLISE DO BARORREFLEXO POR MEIO DO MÉTODO DE OXFORD

Para análise do barorreflexo por meio do Método de Oxford foram utilizadas as variáveis cardiovasculares observadas anteriormente às administrações farmacológicas (valores basais, i.e., ponto de operação do barorreflexo) e posteriormente à administração de cada fármaco vasoativo (resposta máxima) (Figura 1C, D). Os valores da  $P_{VA}$  média foram representados graficamente com seus valores correspondentes do IP para cada animal individual, e a relação entre essas variáveis foi analisada utilizando a função logística sigmóide de quatro variáveis descrita abaixo (KENT et al., 1972; REID, 1996) (Figura 1E):

$$IP = \frac{(MÁX - MÍN)}{(1 + (P_{VA} \text{ média}/P_{VA} \text{ média}_{50})^B)} + MÍN$$

Em que MÁX é o IP máximo atingido pelo barorreflexo (ms), MÍN é o IP mínimo atingido pelo barorreflexo (ms),  $B$  é o coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide ( $\text{ms.kPa}^{-1}$ ), e  $P_{VA} \text{ média}_{50}$  é a  $P_{VA}$  média no centro da curva sigmóide (kPa). A faixa regulatória do controle barorreflexo do IP foi calculada como a diferença entre o MÁX e o MÍN. O ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ;  $\text{ms.kPa}^{-1}$ ), que ocorre quando a  $P_{VA}$  média é igual à  $P_{VA} \text{ média}_{50}$ , foi calculado para cada animal utilizando a equação abaixo:

$$G_{50} = \left| \frac{-B (MÁX - MÍN)}{4 \cdot P_{VA} \text{ média}_{50}} \right|$$

Todos os procedimentos supracitados para avaliação do reflexo barostático pelo Método de Oxford foram realizados com auxílio do software Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, Califórnia, EUA).

## 2.8 – ESTATÍSTICA

Em relação aos dados gerados pelo Método da Sequência, o número de sequências barorreflexas detectadas, o IEB e o GBE foram comparados entre as quatro configurações de software estudadas e entre animais não-tratados e sob duplo bloqueio autonômico cardíaco por meio de uma análise de variância (ANOVA) de via única seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O ganho do barorreflexo estimado pelo Método da Sequência (GBE; estimado pelas quatro configurações de software estudadas) e pelo Método de Oxford ( $G_{50}$ ) também foram comparados por meio de uma ANOVA de via única seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Possíveis diferenças existentes entre as variáveis cardiovasculares ( $P_{VA}$  média e IP) observadas anteriormente e posteriormente a administração intrarterial de solução salina foram avaliadas por meio de um teste t pareado bicaudal. Finalmente, a  $P_{VA}$  média e o IP observados anteriormente e posteriormente as infusões de fenilefrina e nitroprussiato de sódio em animais sob duplo bloqueio autonômico cardíaco foram comparados por meio de uma ANOVA de via única para medidas repetidas seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Para todos os testes foi adotado  $\alpha = 0,05$ , e a hipótese nula foi rejeitada quando  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no software Prism 7.0, assim como a construção dos gráficos. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

*H. malabaricus* não-tratados apresentaram uma  $P_{VA}$  média de  $5,23 \pm 0,19$  kPa e um IP de  $1200 \pm 66$  ms (frequência cardíaca de  $\sim 50$  bpm), enquanto *O. niloticus* não-tratados exibiram uma  $P_{VA}$  média de  $4,54 \pm 0,15$  kPa e um IP de  $1312 \pm 207$  ms (frequência cardíaca de  $\sim 45$  bpm). Valores semelhantes foram obtidos em estudos prévios que utilizaram indivíduos das mesmas espécies com tamanho similar a  $25^\circ\text{C}$  (RANTIN et al., 1993; SUNDIN et al., 1999; REID et al., 2000; MARTINS et al., 2011; ZERAIK et al., 2013).

As variáveis cardiovasculares basais (relativas ao ponto de operação barorreflexo) e as variáveis barorreflexas dos animais, calculadas pelo Método de Oxford, encontram-se sumarizadas na Tabela 1. O presente estudo é o primeiro a investigar a função barorreflexa em teleósteos utilizando o Método de Oxford associado à uma análise de regressão logística sigmóide (FARRELL, 1986; SANDBLOM E AXELSSON, 2005; 2011; SANDBLOM et al., 2016), embora essa abordagem tenha sido amplamente utilizada em estudos com outros vertebrados ectotérmicos (ALTIMIRAS et al., 1998; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b). As curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo e as variáveis barorreflexas calculadas para ambas as espécies estudadas se mostraram similares àquelas de tetrápodes (Figura 2A-D; Tabela 1) (REID, 1996; ALTIMIRAS et al., 1998; LEE et al., 2002; HAGENSEN et al., 2010; HEDRICK et al., 2015; ZENA et al., 2015; 2016a; 2016b), indicando que o Método de Oxford foi bem-sucedido na caracterização do barorreflexo nestes teleósteos. Além disso, ressalta-se que as administrações intrarteriais de solução salina não promoveram alterações significativas nas

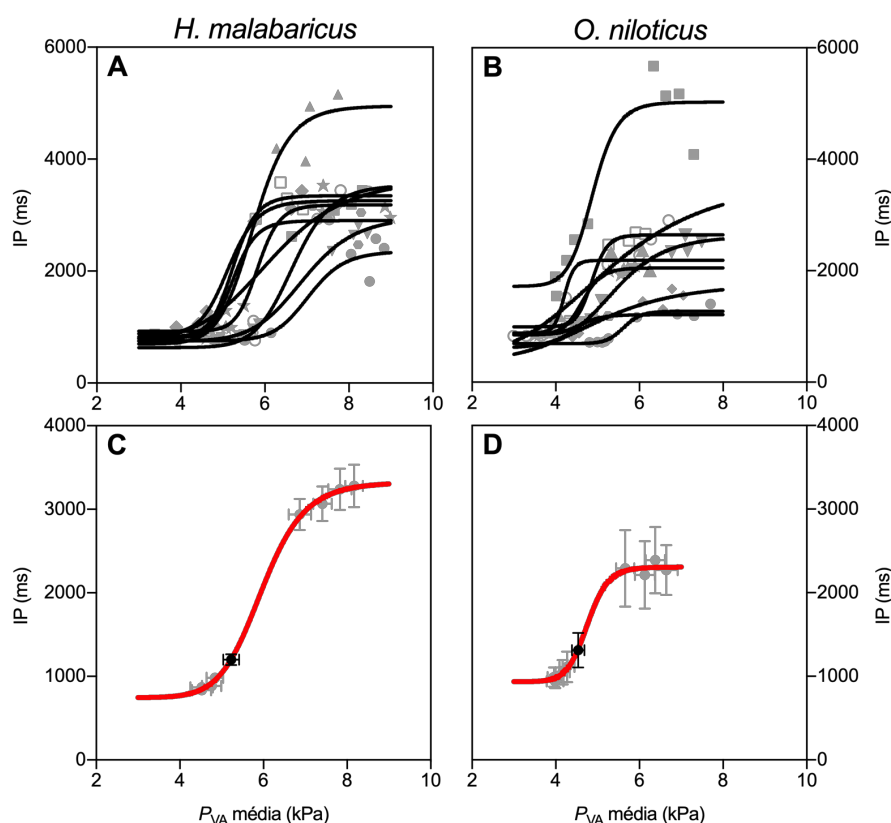


variáveis cardiovasculares dos animais (Tabela 2), e que as administrações de fenilefrina e nitroprussiato de sódio em animais sob duplo bloqueio autonômico provocaram grandes alterações na  $P_{VA}$  média sem afetar o IP – confirmando a origem autonômica das respostas barorreflexas observadas (Tabela 3).

**Tabela 1.** Variáveis cardiovasculares basais e variáveis barorreflexas derivadas das curvas sigmóides que descrevem o barorreflexo de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie).

	<i>H. malabaricus</i>	<i>O. niloticus</i>
$P_{VA}$ média basal (kPa)	$5,23 \pm 0,19$	$4,54 \pm 0,15$
IP basal (ms)	$1200 \pm 66$	$1312 \pm 207$
MÁX (ms)	$3351 \pm 237$	$2498 \pm 405$
MÍN (ms)	$781 \pm 30$	$830 \pm 129$
MÁX – MÍN (ms)	$2569 \pm 248$	$1668 \pm 344$
$B$ (ms.kPa <sup>-1</sup> )	$15,46 \pm 1,55$	$17,96 \pm 3,58$
$P_{VA}$ média <sub>50</sub> (kPa)	$6,00 \pm 0,25$	$4,95 \pm 0,15$
$R^2$	$0,98 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,01$
$G_{50}$ (ms.kPa <sup>-1</sup> )	$1658 \pm 213$	$1329 \pm 336$

$P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral; IP: intervalo de pulso cardíaco; MÁX: IP máximo atingido pelo barorreflexo; MÍN: IP mínimo atingido pelo barorreflexo; MÁX – MÍN: faixa regulatória do controle barorreflexo do IP;  $B$ : coeficiente angular máximo na porção linear da curva sigmóide;  $P_{VA}$  média<sub>50</sub>:  $P_{VA}$  média no centro da curva sigmóide;  $R^2$ : coeficiente de determinação;  $G_{50}$ : ganho máximo do barorreflexo. Dados expressos em média  $\pm$  EPM.



**Figura 2.** Curvas sigmóides barorreflexas individuais (A, B) e curvas sigmóides barorreflexas médias (C, D) de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie). Em A e B, os símbolos diferentes representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo de indivíduos distintos (valores absolutos). Em C e D, o símbolo preto corresponde às variáveis basais enquanto os símbolos cinza correspondem às respostas máximas à cada administração de fármaco vasoativo (média  $\pm$  EPM).  $P_{VA}$  média: pressão média na aorta ventral; IP: intervalo de pulso cardíaco. Fonte: o autor.

**Tabela 2.** Variáveis cardiovasculares de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie) anteriormente e posteriormente administração intrarterial de solução salina (0,9% NaCl).

<i>H. malabaricus</i>		
	Pré salina	Pós salina
$P_{VA}$ média (kPa)	$5,35 \pm 0,21$	$5,34 \pm 0,23$
IP (ms)	$1398 \pm 96$	$1492 \pm 135$
<i>O. niloticus</i>		
	Pré salina	Pós salina
$P_{VA}$ média (kPa)	$4,79 \pm 0,16$	$4,84 \pm 0,15$
IP (ms)	$1414 \pm 325$	$1444 \pm 284$

$P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral; IP: intervalo de pulso cardíaco. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as variáveis cardiovasculares observadas anteriormente e posteriormente a administração intrarterial de solução salina nas quatro espécies estudadas ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM.

**Tabela 3.** Variáveis cardiovasculares de *H. malabaricus* e *O. niloticus* ( $N = 9$  para cada espécie) sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, anteriormente e posteriormente as administrações de fenilefrina ( $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio ( $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

<i>H. malabaricus</i>			
	Pré administração	Pós fenilefrina	Pós nitroprussiato de sódio
$P_{VA}$ média (kPa)	$5,24 \pm 0,09$	$7,19 \pm 0,22$ *	$4,50 \pm 0,23$ *
IP (ms)	$716 \pm 61$	$778 \pm 98$	$732 \pm 86$
<i>O. niloticus</i>			
	Pré administração	Pós fenilefrina	Pós nitroprussiato de sódio
$P_{VA}$ média (kPa)	$4,92 \pm 0,37$	$6,09 \pm 0,50$ *	$4,09 \pm 0,57$ *
IP (ms)	$843 \pm 51$	$852 \pm 41$	$816 \pm 27$

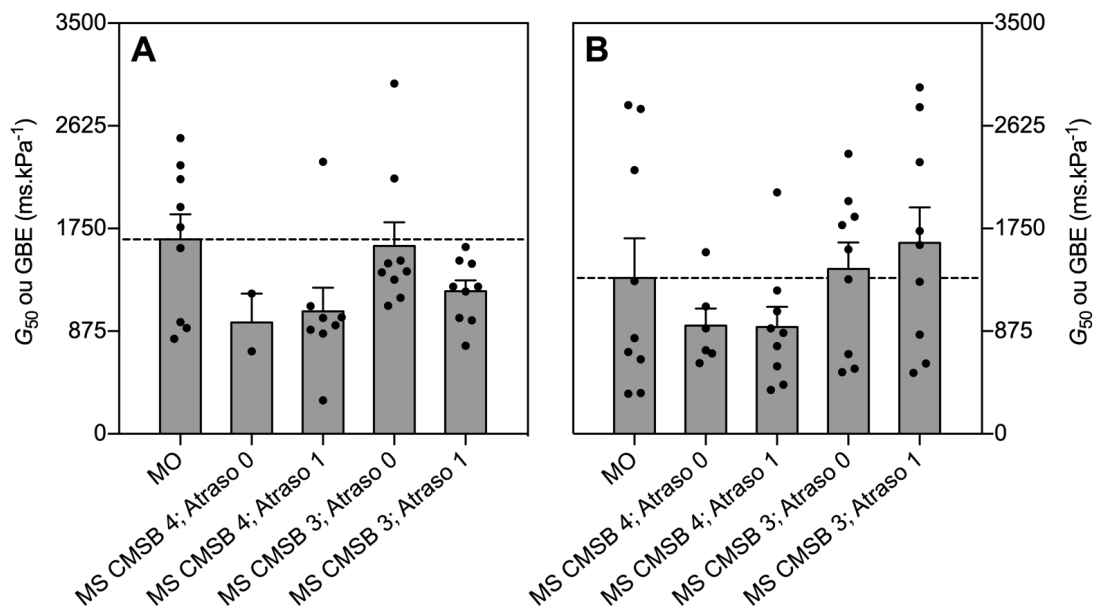
$P_{VA}$  média: pressão arterial média na aorta ventral; IP: intervalo de pulso cardíaco. Um asterisco indica diferença significativa para com os valores pré-administração ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM.

Em ambas as espécies, o Método da Sequência e o Método de Oxford forneceram determinações similares do ganho barorreflexo (GBE e  $G_{50}$ , respectivamente), independentemente da configuração de software utilizada para análise por meio do Método da Sequência (Figura 3A, B; Tabelas 1 e 4). Porém, apesar de todas as configurações de software consideradas para análise por meio do Método da Sequência terem fornecido valores equivalentes de GBE em *H. malabaricus* e *O. niloticus*, o uso de sequências barorreflexas com três ou mais ciclos cardíacos e atraso de um ciclo cardíaco proporcionou dados de maior confiabilidade devido ao maior número de sequências detectadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Variáveis barorreflexas de *H. malabaricus* e *O. niloticus*, não-tratados e sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, determinadas pelo Método da Sequência.

<i>H. malabaricus</i>								
Tratamento	Não-tratados (N = 9)				Duplo bloqueio autonômico cardíaco (N = 3)			
Configuração de software	CMSB 4; Atraso 0	CMSB 4; Atraso 1	CMSB 3; Atraso 0	CMSB 3; Atraso 1	CMSB 4; Atraso 0	CMSB 4; Atraso 1	CMSB 3; Atraso 0	CMSB 3; Atraso 1
SB↑ detectadas (/1000 batimentos)	0,4 ± 0,1 a, b	0,8 ± 0,2 a	2,9 ± 0,7 a	20,7 ± 2,8 c	1,3 ± 0,7 a, b	1,9 ± 1,0 a, b	9,2 ± 2,4 a, b	14,1 ± 3,7 b, c
SB↓ detectadas (/1000 batimentos)	0,7 ± 0,4 a	0,5 ± 0,2 a	1,3 ± 0,4 a	16,9 ± 2,3 b	3,7 ± 2,4 a	4,3 ± 2,4 a	10,6 ± 5,3 a, b	18,3 ± 5,1 b
SB totais detectadas (/1000 batimentos)	1,1 ± 0,5 a	1,3 ± 0,3 a	4,2 ± 1,2 a	37,6 ± 4,9 b	5,1 ± 3,2 a	6,2 ± 3,4 a	19,8 ± 7,7 a, b	32,4 ± 8,8 b
IEB (sem unidade)	0,05 ± 0,03 a, b	0,01 ± 0,01 a	0,02 ± 0,01 a	0,15 ± 0,02 b, c	0,08 ± 0,04 a, b	0,10 ± 0,04 a, b, c	0,16 ± 0,06 b, c	0,22 ± 0,05 c
GBE (ms.kPa <sup>-1</sup> )	950 ± 245 a, b	1043 ± 201 a, b	1602 ± 201 a	1216 ± 91 a	229 ± 93 b	262 ± 164 b	208 ± 86 b	204 ± 81 b
AESB	2	8	9	9	3	3	3	3
<i>O. niloticus</i>								
Tratamento	Não-tratados (N = 9)				Duplo bloqueio autonômico cardíaco (N = 3)			
Configuração de software	CMSB 4; Atraso 0	CMSB 4; Atraso 1	CMSB 3; Atraso 0	CMSB 3; Atraso 1	CMSB 4; Atraso 0	CMSB 4; Atraso 1	CMSB 3; Atraso 0	CMSB 3; Atraso 1
SB↑ detectadas (/1000 batimentos)	0,5 ± 0,2 a	1,7 ± 0,6 a	4,8 ± 1,3 a	32,7 ± 5,7 b	0,9 ± 0,9 a	0,6 ± 0,3 a	5,9 ± 3,3 a	15,9 ± 7,8 a, b
SB↓ detectadas (/1000 batimentos)	0,6 ± 0,1 a	0,8 ± 0,3 a	4,1 ± 1,1 a	24,6 ± 3,5 b	1,5 ± 0,9 a	0,6 ± 0,1 a	6,3 ± 3,4 a	25,1 ± 10,8 b
SB totais detectadas (/1000 batimentos)	1,1 ± 0,2 a	2,5 ± 0,8 a	8,9 ± 2,3 a	57,3 ± 7,7 b	2,4 ± 1,8 a	1,2 ± 0,2 a	12,2 ± 6,7 a, c	41,0 ± 15,8 b, c
IEB (sem unidade)	0,01 ± 0,01 a	0,02 ± 0,01 a	0,04 ± 0,01 a	0,22 ± 0,03 b	0,03 ± 0,01 a	0,03 ± 0,01 a	0,05 ± 0,03 a, c	0,16 ± 0,06 b, c
GBE (ms.kPa <sup>-1</sup> )	923 ± 144 a, b	912 ± 170 a, b	1405 ± 223 a, b	1628 ± 302 b	170 ± 83 a	212 ± 146 a	383 ± 155 a, b	306 ± 159 a
AESB	6	9	9	9	3	3	3	3

CMSB: comprimento mínimo das sequências barorreflexas utilizado na configuração da análise; SB↑: sequências barorreflexas para cima (aumento da pressão arterial associada ao aumento do intervalo de pulso cardíaco); SB↓: sequências barorreflexas para baixo (redução da pressão arterial associada à redução do intervalo de pulso cardíaco); SB: sequências barorreflexas; IEB: índice de efetividade do barorreflexo; GBE: ganho barorreflexo espontâneo; AESB: número de animais que exibiram ao menos uma sequência barorreflexa. Valores que não compartilham uma letra superscrita apresentam diferença significativa entre si (considerando uma mesma variável de uma dada espécie;  $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média ± EPM.



**Figura 3.** Ganho máximo do barorreflexo ( $G_{50}$ ) e ganho barorreflexo espontâneo (GBE) de *H. malabaricus* (A) e *O. niloticus* (B;  $N = 9$  para cada espécie) estimados por meio do Método de Oxford (MO) e Método da Sequência (MS), respectivamente. A linha tracejada representa o valor do  $G_{50}$ , estimado pelo MO. Algumas barras apresentam menos pontos de dispersão porque alguns indivíduos não exibiram nenhuma sequência barorreflexa em determinadas configurações de software para que o GBE pudesse ser calculado. CMSB: comprimento mínimo das sequências barorreflexas utilizado na configuração da análise. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o ganho barorreflexo calculado por meio do MO e por meio do MS ( $p \leq 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Fonte: o autor.

O Método de Sequência pôde localizar sequências barorreflexas em *H. malabaricus* e *O. niloticus* independentemente da configuração de software utilizada (Tabela 4). No entanto, uma quantidade considerável de sequências barorreflexas foi detectada apenas quando o software foi configurado para localizar sequências com comprimento mínimo de três ciclos cardíacos e atraso de um ciclo cardíaco entre mudanças na  $P_{VA}$  média e alterações reflexas no IP (Tabela 4). Quando o software foi configurado para localizar sequências com comprimento mínimo de quatro ciclos cardíacos, alguns indivíduos não exibiram nenhuma sequência barorreflexa (Tabela 4). Essa observação está de acordo com estudos anteriores realizados em mamíferos, que verificaram que análises com sequências barorreflexas mais longas reduz o número de sequências detectadas (BERTINIERI et al., 1988; HUGHSON et al., 1993; LAUDE et al., 2008a; 2009). Apesar disso, Bertinieri et al. (1988) demonstraram que sequências barorreflexas com dois ciclos cardíacos não devem ser utilizadas para emprego do Método da Sequência porque várias dessas sequências não derivam de um barorreflexo, mas de fenômenos casuais.

O número de sequências barorreflexas detectadas é essencial para o emprego do Método da Sequência, pois um número insignificante de sequências pode não representar a dinâmica do barorreflexo com fidedignidade, comprometendo a confiabilidade dos resultados

(BERTINIERI et al., 1985; 1988; DAVIES et al., 2001; STAUSS et al., 2006; LAUDE et al., 2009). Estudos anteriores desenvolvidos em *F. catus* e *Homo sapiens* utilizaram quatro ciclos cardíacos como comprimento mínimo das sequências barorreflexas para aumentar a precisão da análise (BERTINIERI et al., 1988; PARATI et al., 2000), enquanto que sequências barorreflexas com comprimento mínimo de três ciclos cardíacos são mais adequadas para *Mus musculus* (ISHII et al., 2001; KUWAKI et al., 2002; LAUDE et al., 2008a; 2009). Já os resultados do presente estudo indicam que configurar o software para localizar sequências barorreflexas com comprimento mínimo de três ciclos cardíacos é mais apropriado para a análise do barorreflexo por meio do Método da Sequência em teleósteos.

O atraso entre as flutuações na  $P_{VA}$  média e as alterações reflexas no IP representa o tempo necessário para que o circuito barorreflexo aconteça – da aferência à eferência (PICKERING E DAVIES, 1973; BORST E KAREMAKER, 1983; DAVIES et al., 2001; DI RIENZO et al., 2001a; LAUDE et al., 2009). Para a aplicação do Método da Sequência em mamíferos, um atraso de zero a três ciclos cardíacos é usualmente empregado na configuração de software, com maiores atrasos sendo mais frequentemente utilizados em espécies que exibem uma frequência cardíaca mais elevada (HUGHSON et al., 1993; DAVIES et al., 2001; DI RIENZO et al., 2001a; 2001b; LAUDE et al., 2008a; 2009; LATARO et al., 2017). De acordo com os dados do presente estudo, a utilização de um ciclo cardíaco de atraso parece adequado para teleósteos, visto que *H. malabaricus* e *O. niloticus* não-tratados apresentaram uma quantidade incipiente de sequências barorreflexas quando um atraso de zero ciclos cardíacos foi utilizado (Tabela 4). Além disso, o uso de atrasos de dois ou mais ciclos cardíacos não foi considerado na presente investigação porque implicaria na suposição de um circuito barorreflexo de ocorrência excessivamente lenta em teleósteos de baixa frequência cardíaca como *H. malabaricus* e *O. niloticus* (por exemplo, em uma espécie de frequência cardíaca elevada como *M. musculus* um atraso de dois ciclos cardíacos é equivalente a ~300 ms, enquanto que em uma espécie de frequência cardíaca reduzida como *O. niloticus* um atraso de dois ciclos cardíacos é equivalente a ~2600 ms).

Ambas as espécies apresentaram maior IEB quando o software foi configurado para localizar sequências barorreflexas com comprimento mínimo de três ciclos cardíacos e atraso de um ciclo cardíaco. Nessa configuração, *H. malabaricus* e *O. niloticus* exibiram um IEB de  $0,15 \pm 0,02$  e  $0,22 \pm 0,03$ , respectivamente (Tabela 4). Considerando que esses valores são consistentes com aqueles relatados para *F. catus*, *H. sapiens* (DI RIENZO et al., 2001b), *M. musculus* (ISHII et al., 2001; KUWAKI et al., 2002; LAUDE et al., 2008a; 2008b), e *Rattus norvegicus* (SILVA et al., 2015; LATARO et al., 2017), analisados utilizando configurações

de software específicas para espécies, nossos dados sobre IEB também suportam o uso de sequências barorreflexas com comprimento mínimo de três ciclos cardíacos e atraso de um ciclo cardíaco para aplicação do Método de Sequência em teleósteos.

Sob duplo bloqueio autonômico cardíaco, *H. malabaricus* exibiram uma  $P_{VA}$  média de  $4,84 \pm 0,14$  kPa e um IP de  $733 \pm 53$  ms (frequência cardíaca  $\sim 82$  bpm), enquanto *O. niloticus* exibiram uma  $P_{VA}$  média de  $4,86 \pm 0,49$  kPa e um IP de  $746 \pm 44$  ms (frequência cardíaca de  $\sim 80$  bpm). Nesses animais, o número total de sequências barorreflexas detectadas e o IEB foram semelhantes aos encontrados em animais não-tratados em praticamente todas as configurações de software estudadas (Tabela 4). Os resultados também revelaram que o GBE de animais sob duplo bloqueio autonômico cardíaco é significativamente menor que aquele de animais não-tratados, exceto quando as análises foram realizadas usando configurações de software menos adequadas (como sequências barorreflexas com comprimento mínimo de quatro ciclos cardíacos, por exemplo) (Tabela 4). É possível que o número de sequências barorreflexas detectadas permaneça inalterado após o bloqueio autonômico cardíaco porque a atropina e o propranolol são antagonistas competitivos e, portanto, podem não impedir alterações infinitesimais na frequência cardíaca mediadas pelo barorreflexo (as quais podem gerar sequências barorreflexas) (LEE et al., 2002; RANG et al., 2016). A redução do GBE em animais sob duplo bloqueio autonômico cardíaco corrobora essa hipótese, pois comprova que a responsividade do nodo sinoatrial às alterações na atividade autonômica cardíaca mediadas pelo barorreflexo é prejudicada substancialmente pela atropina e pelo propranolol (Tabela 4). Resultados similares já foram documentados por Head e McCarty (1987), Stauss et al. (2006) e Laude et al. (2008a; 2008b) para *M. musculus* e *R. norvegicus*.

É importante ressaltar que o Método da Sequência estima o ganho barorreflexo (GBE) focando no ponto de operação do barorreflexo, enquanto o Método de Oxford estima o ganho barorreflexo ( $G_{50}$ ) focando no ponto central da curva sigmóide que descreve o barorreflexo. Essa diferença pode gerar discrepâncias entre os ganhos barorreflexos estimados por meio das duas técnicas, mas assim como sugerido por estudos prévios, os dados aqui apresentados indicam que tais incongruências não são significativas (PARLOW et al., 1995; DI RIENZO et al., 2001a; MOFFITT et al., 2005; STAUSS et al., 2006; LAUDE et al., 2008a). Além disso, as administrações de fármacos vasoativos necessárias para a realização do Método de Oxford inibem a via vasomotora do barorreflexo, o que também pode levar a pequenas diferenças entre os ganhos barorreflexos estimados pelo Método de Oxford e pelo Método da Sequência (BERTINIERI et al., 1985).

Finalmente, também deve ser reconhecido que o Método de Sequência possui limitações. A principal desvantagem é que esse método não fornece a curva sigmóide que descreve o barorreflexo e, portanto, não revela o escopo dinâmico completo desse ajuste fisiológico (MÁX, MÍN, e faixa regulatória do controle barorreflexo do IP, por exemplo) (MOFFITT et al., 2005; STAUSS et al., 2006; DI RIENZO et al., 2001a). Adicionalmente, o Método da Sequência é mais suscetível a influências externas nas variáveis cardiovasculares adquiridas (como estresse induzido por ruído, por exemplo), pois avalia a função barorreflexa analisando oscilações naturais na  $P_{VA}$  média e no IP dos animais – ao invés de avaliar analisando respostas cardiovasculares a estímulos padronizados com manipulações farmacológicas controladas como o Método de Oxford (DI RIENZO et al., 2001a). Dessa forma, o Método da Sequência se estabelece como uma alternativa ao Método de Oxford em investigações em que apenas a avaliação do ganho barorreflexo é requerida, apesar de também consistir em uma excelente técnica complementar ao Método de Oxford para descrições mais detalhadas e robustas da função barorreflexa dos animais.

#### **4 – CONCLUSÕES**

O presente estudo demonstrou que o Método da Sequência fornece estimativas confiáveis da sensibilidade barorreflexa em teleósteos, se estabelecendo como um importante método alternativo ou complementar para avaliação da função barorreflexa nesses animais. Além disso, os resultados reportados sugerem que a configuração ótima para o emprego do Método de Sequência em teleósteos consiste no uso de sequências barorreflexas com comprimento mínimo de três ciclos cardíacos e atraso de um ciclo cardíaco entre mudanças na  $P_{VA}$  média e alterações reflexas no IP, como forma de aumentar a robustez e confiabilidade da análise.

## 5 – REFERÊNCIAS

- ALTIMIRAS, J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 447-460, 1999.
- ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L.; AXELSSON, M. Cholinergic and adrenergic tones in the control of heart rate in teleosts. How should they be calculated? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 118, p. 131-139, 1997.
- ALTIMIRAS, J.; FRANKLIN, C. E.; AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2235-2242, 1998.
- ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; ABE, A. S.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H. Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake *Python molurus*. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 184, p. 903-912, 2014.
- ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; TEIXEIRA, M. T.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L. Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Fish Biochemistry and Physiology**, v. 42, p. 1213-1224, 2016.
- ARNDT, J. O.; MORGENSTERN, J.; SAMODELOV, L. The physiologically relevant information regarding systemic blood pressure encoded in the carotid sinus baroreceptor discharge pattern. **Journal of Physiology**, v. 268, p. 775-791, 1977.
- AXELSSON, M.; FRITSCHKE, R. Cannulation techniques. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes: Analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 1994. v. 3, p. 17-36.
- BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60, p. 121-162, 1985.
- BERGEL, T. D.; ANAND, I. S.; BROOKS, D. E.; MACDERMOTT, A. J.; PEVELER, R. C.; ROBINSON, J. L.; SLEIGHT, P. Carotid sinus nerve mechanics and baroreceptor function in the dog. In: SLEIGHT, P. (Ed.). **Arterial Baroreceptors and Hypertension**. Oxford: Oxford University Press, 1980, p. 1-5.
- BERTINIERI, G.; DI RIENZO, M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U.; PEDOTTI, A.; MANCIA, G. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. **Journal of Hypertension**, v. 3, p. S79-S81, 1985.
- BERTINIERI, G.; DI RIENZO, M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U.; PEDOTTI, A.; MANCIA, G. Evaluation of baroreceptor reflex by blood pressure monitoring in unanesthetized cats. **American Journal of Physiology**, v. 254, p. H377-H383, 1988.
- BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. J. **Tilapias: Biology and Exploitation**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2000.
- BORST, C.; KAREMAKER, J. M. Time delays in the human baroreceptor reflex. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 9, p. 399-409, 1983.



BRZEZINSKI, W. A. Blood pressure. In: WALKER, H. K.; HALL, W. D.; HURST, J. W. (Eds.). **Clinical methods: The history, physical, and laboratory examinations**. Terceira edição. Boston: Butterworths, 1990.

CHAPLEAU, M. W. Baroreceptor reflexes. In: ROBERTSON, D.; BIAGGIONI, I.; BURNSTOCK, G.; LOW, P. A.; PATON, J. F. R. (Eds.). **Primer on the Autonomic Nervous System**. Cambridge: Academic Press, 2012. p. 161-165.

COLEMAN, T. G. Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. H515-H520, 1980.

COWLEY Jr, A. W. Long-term control of arterial blood pressure. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 231-300, 1992.

DAVIES, L. C.; FRANCIS, D. P.; SCOTT, A. C.; PONIKOWSKI, P.; PIEPOLI, M.; COATS, A. J. S. Effect of altering conditions of the sequence method on baroreflex sensitivity. **Journal of Hypertension**, v. 19, p. 1279-1287, 2001.

DI RIENZO, M.; CASTIGLIONI, P.; MANCIA, G.; PEDOTTI, A.; PARATI, G. Advancements in estimating baroreflex function. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 20, p. 25-32, 2001a.

DI RIENZO, M.; PARATI, G.; CASTIGLIONI, P.; TORDI, R.; MANCIA, G.; PEDOTTI, A. Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology**, v. 280, p. R744-R751, 2001b.

DIEHL, K.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMAMPIANINA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J.; VAN DE VORSTENBOSCH, C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, p. 15-23, 2001.

FARRELL, A. P. Cardiovascular responses in the sea raven, *Hemitripteris americanus*, elicited by vascular compression. **Journal of Experimental Biology**, v. 122, p. 65-80, 1986.

GUYTON, A. C. Blood pressure control – special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, p. 1813-1816, 1991.

HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 458-462, 2010.

HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 21, p. 203-213, 1987.

HEDRICK, M. S.; MCNEW, K. A.; CROSSLEY II, D. A. Baroreflex function in anurans from different environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 144-148, 2015.

HOHNKE, L. A. Regulation of arterial blood pressure in the common green iguana. **American Journal of Physiology**, v. 228, p. 386-391, 1975.

HUGHSON, R. L.; QUINTIN, L.; ANNAT, G.; YAMAMOTO, Y.; GHARIB, C. Spontaneous baroreflex by sequence and power spectral methods in humans. **Clinical Physiology**, v. 13, p. 663-676, 1993.

ISHII, T.; KUWAKI, T.; MASUDA, Y.; FUKUDA, Y. Postnatal development of blood pressure and baroreflex in mice. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 94, p. 34-41, 2001.

IVERSEN, N. K.; DUPONT-PRINET, A.; FINDORF, I.; MCKENZIE, D. J.; WANG, T. Autonomic regulation of the heart during digestion and aerobic swimming in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 463-468, 2010.

KENT, B. B.; DRANE, J. W.; BLUMENSTEIN, B.; MANNING, J. W. A mathematical model to assess changes in the baroreceptor reflex. **Cardiology**, v. 57, p. 295-310, 1972.

KLIMASCHEWSKI, L.; KUMMER, W.; MAYER, B.; COURAUD, J. Y.; PREISSLER, U.; PHILIPPIN, B.; HEYM, C. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. **Circulation Research**, v. 71, p. 1533-1537, 1992.

KUWAKI, T.; ISHII, T.; JU, K.; YANAGISAWA, M.; FUKUDA, Y. Blood pressure of endothelin-3 null (-/-) knockout mice and endothelin A receptor null (-/-) knockout mice under anaesthesia. **Clinical Science**, v. 103, p. 48S-52S, 2002.

LA ROVERE, M. T.; PINNA, G. D.; RACZAK, G. Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 13, p. 191-207, 2008.

LATARO, R. M.; SILVA, L. E. V.; SILVA, C. A. A.; SALGADO, H. C.; FAZAN Jr, R. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in early heart failure assessed by the sequence method. **Journal of Physiology**, v. 595, p. 3319-3330, 2017.

LAUDE, D.; BAUDRIE, V.; ELGHOZI, J. Applicability of recent methods used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity to resting mice. **American Journal of Physiology**, v. 294, p. R142-R150, 2008a.

LAUDE, D.; BAUDRIE, V.; ELGHOZI, J. Effects of atropine on the time and frequency domain estimates of blood pressure and heart rate variability in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, p. 454-457, 2008b.

LAUDE, D.; BAUDRIE, V.; ELGHOZI, J. Tuning of the sequence technique. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 28, p. 30-34, 2009.

LEE, J. S.; MORROW, D.; ANDRESEN, M. C.; CHANG, K. S. K. Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. **Anesthesiology**, v. 96, p. 1214-1222, 2002.

MANCIA, G.; MARK, A. L. Arterial baroreflexes in humans. In: SHEPHERD, J. T.; ABOUD, F. M. (Eds.). **Handbook of Physiology, The Cardiovascular System**. Bethesda: American Physiological Society, 1983, p. 755-793.

MARTINS, N. D.; COLVARA, W. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 84, p. 154-159, 2011.

- MOFFITT, J. A.; GRIPPO, A. J.; JOHNSON, A. K. Baroreceptor reflex control of heart rate in rats studied by induced and autogenic changes in arterial pressure. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. H2422-H2430, 2005.
- MUELLER, C. A.; BURGGREN, W. W.; CROSSLEY II, D. A. ANG II and baroreflex control of heart rate in embryonic chickens (*Gallus gallus domesticus*). **American Journal of Physiology**, v. 305, p. R855-R863, 2013.
- PAIVA, M. **Fisioecologia da traira, *Hoplias malabaricus* (Bloch), no nordeste Brasileiro**. 1972. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PARATI, G.; DI RIENZO, M.; MANCIA, G. How to measure baroreflex sensitivity: from the cardiovascular laboratory to daily life. **Journal of Hypertension**, v. 18, p. 7-19, 2000.
- PARLOW, J.; VIALE, J. P.; ANNAT, G.; HUGHSON, R.; QUINTIN, L. Spontaneous cardiac baroreflex in humans: comparison with drug-induced responses. **Hypertension**, v. 25, p. 1058-1068, 1995.
- PETRY, A. C.; AGOSTINHO, A. A.; PIANA, P. A.; GOMES, L. C. Effects of temperature on prey consumption and growth in mass of juvenile trahira *Hoplias aff. malabaricus* (Bloch, 1794). **Journal of Fish Biology**, v. 70, p. 1855-1864, 2007.
- PICKERING, T. G.; DAVIES, J. Estimation of the conduction time of the baroreceptor-cardiac reflex in man. **Cardiovascular Research**, v. 7, p. 213-219, 1973.
- RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale's Pharmacology**. Oitava edição. London: Elsevier Churchill Livingstone, 2016.
- RANTIN, F. T.; GLASS, M. L.; KALININ, A. L.; VERZOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environmental Biology of Fishes**, v. 36, p. 93-97, 1993.
- REID, S. G.; SUNDIN, L.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traira (*Hoplias malabaricus*): CO<sub>2</sub>/pH chemoresponses. **Respiration Physiology**, v. 120, p. 47-59, 2000.
- SABINO, J.; ZUANON, J. A stream fish assemblage in Central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 8, p. 201-210, 1998.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 821-829, 2005.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Autonomic control of circulation in fish: A comparative view. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 165, p. 127-139, 2011.
- SANDBLOM, E.; EKSTRÖM, A.; BRIJS, J.; SUNDSTRÖM, L. F.; JUTFELT, F.; CLARK, T. D.; ADILL, A.; AHO, T.; GRÄNS, A. Cardiac reflexes in a warming world: thermal plasticity of barostatic control and autonomic tones in a temperate fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 2880-2887, 2016.
- SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 179, p. 1-56, 2009.

- SILVA, A. S.; ARIZA, D.; DIAS, D. P. M.; CRESTANI, C. C.; MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. **Life Sciences**, v. 127, p. 82-89, 2015.
- STAUSS, H. M.; MOFFITT, J. A.; CHAPLEAU, M. W.; ABBOUD, F. M.; JOHNSON, A. K. Baroreceptor reflex sensitivity estimated by the sequence technique is reliable in rats. **American Journal of Physiology**, v. 291, p. H482-H483, 2006.
- SUNDIN, L. I.; REID, S. G.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*) O<sub>2</sub> chemoresponses. **Respiration Physiology**, v. 116, p. 181-199, 1999.
- VAN VLIET, B. N.; WEST, N. H. Phylogenetic trends in the baroreceptor control of arterial blood pressure. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1284-1304, 1994.
- ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Role of brain nitric oxide in the cardiovascular control of bullfrogs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 165, p. 263-271, 2013.
- ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 179, p. 81-88, 2015.
- ZENA, L. A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; BÍCEGO, K. C. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 725-733, 2016a.
- ZENA, L. A.; SILVA, G. S. F.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Baroreflex regulation affects ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 3605-3615, 2016b.
- ZERAIK, V. M.; BELÃO, T. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Branchial O<sub>2</sub> chemoreceptors in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: control of cardiorespiratory function in response to hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 166, p. 17-25, 2013.

## **CAPÍTULO 5**

---

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 1 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma breve análise dos resultados da presente tese permite concluir que a mesma desvendou inúmeras questões relacionadas ao barorreflexo de teleósteos, essenciais para a compreensão da evolução desse reflexo em vertebrados. O presente trabalho demonstrou que o barorreflexo ventilatório não está presente no teleósteo de respiração bimodal *Pangasianodon hypophthalmus*, e apesar da possibilidade de perda secundária desse ajuste nessa espécie, tal informação inédita sugere que o reflexo barostático de teleósteos não apresenta um componente ventilatório como aquele de tetrápodes.

Já com relação ao barorreflexo cardíaco, o presente trabalho demonstrou que teleósteos apresentam grande sensibilidade barorreflexa, o que suporta a hipótese de que o barorreflexo cardíaco consiste em uma característica filogeneticamente antiga, selecionada no início da evolução dos vertebrados frente a necessidade de uma pressão de perfusão tecidual adequada e contínua. Em algumas espécies de teleósteos estudadas, a sensibilidade barorreflexa se mostrou até mesmo superior àquela de tetrápodes, o que pode estar relacionado à menor capacidade de vasomoção em peixes. Foi demonstrado, ainda, uma correlação positiva entre terrestrialidade e sensibilidade barorreflexa, assim como entre terrestrialidade e potencial para taquicardia barorreflexa (a qual é associada à capacidade de contrabalancear eventos de hipotensão, comuns no meio terrestre). Destaca-se, inclusive, que devido às características e táxons das espécies investigadas, tal correlação está livre de vieses associados à capacidade de respiração aérea e às histórias filogenéticas das mesmas. Tanto a descrição detalhada do barorreflexo cardíaco em peixes, quanto a caracterização da terrestrialidade como força motriz da evolução do barorreflexo, são informações sem precedentes na literatura científica.

Ademais, o presente trabalho também padronizou um método alternativo ou complementar para avaliação da função barorreflexa em teleósteos, determinando um protocolo de análise ideal e comprovando sua eficácia em duas espécies filogeneticamente distintas. Além disso, uma das espécies testadas é tipicamente sedentária, enquanto a outra é tipicamente ativa, o que atestou o funcionamento do método mesmo em animais que podem se movimentar em considerável frequência durante os experimentos.

Finalmente, ressalta-se que muito permanece a ser investigado acerca do barorreflexo em teleósteos apesar dos esforços aqui relatados, e que a presente tese fornece bases conceituais, filosóficas e metodológicas importantes para a fundamentação de estudos futuros nessa área.

