

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

**RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS DO TELEÓSTEO DE  
RESPIRAÇÃO AÉREA, *Clarias Gariepinus*,  
EXPOSTO À HIPÓXIA GRADUAL.**

**THIAGO DE CAMPOS BELÃO**

**SÃO CARLOS - SP  
2010**

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

**RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS DO TELEÓSTEO DE  
RESPIRAÇÃO AÉREA, *Clarias Gariepinus*,  
EXPOSTO À HIPÓXIA GRADUAL.**

**THIAGO DE CAMPOS BELÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

*Orientação: Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin*

**SÃO CARLOS - SP  
2010**

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

B426rc

Belão, Thiago de Campos.

Respostas cardiorrespiratórias do teleósteo de respiração aérea, *Clarias gariepinus*, exposto à hipóxia gradual / Thiago de Campos Belão. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
50 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fisiologia. 2. Siluriformes. 3. Bradicardia. 4. Taquicardia. 5. Clariidae. 6. Respirometria. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

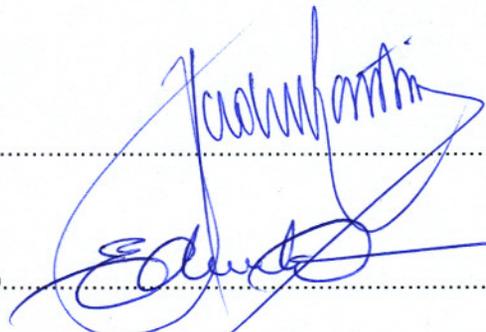
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Thiago de Campos Belão

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin.....

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

Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego.....



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade, convívio acadêmico e dedicação profissional de seus funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante a realização deste estudo.

Ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), pelo suporte e auxílio para a execução dos experimentos laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pela orientação prestada e exemplo de competência profissional-científica.

Ao Dr. Cléo Alcantara Costa Leite e Dr. Luis Henrique Florindo, por me ensinarem técnicas cirúrgicas, protocolos experimentais e conhecimentos teóricos importantíssimos para este e outros estudos.

Aos técnicos de laboratório José Roberto Sanches e Angelo Carnelosi pelo auxílio dispensado na manutenção dos equipamentos e cuidado prestado aos animais.

Aos outros docentes do DCF como Dra. Ana Lucia Kalinin e Dra. Marisa Narciso Fernandes, pelo auxílio e colaboração durante as disciplinas que muito me enriqueceram no conhecimento científico.

Aos amigos de laboratório Diana, Juliana, Nathan, Rafael (“vôzão”), “Z” (Rafael Zanoli), André, Aline, Natália, Marcelo, Gabi, Vivian, Lucas pelos momentos alegres e agradável companhia que trazem ao laboratório.

A Deus, pela sabedoria que confere a nós, seres humanos, permitindo-nos estudar os comportamentos fisiológicos perfeitos de diversos animais, e através destas observações conhecermos mais o Seu cuidado e amor por nós.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e aprimoramento não só no campo profissional, mas principalmente no pessoal.

“Aos meus pais, familiares e amigos  
que sempre me apoiaram nos estudos  
e, principalmente, a minha amada noiva  
pela amizade, compreensão e carinho  
mesmo estando distante, dedico este  
estudo”.

## RESUMO

Peixes de respiração aérea são classificados como respiradores aéreos obrigatórios (aqueles que respiram ar atmosférico independente das tensões de  $O_2$  da água) ou facultativos (aqueles que usam o órgão de respiração aérea – ABO – quando as brânquias não conseguem extrair a quantidade de  $O_2$  necessário para manter o metabolismo aeróbico em condições hipóxicas). O bagre-africano, *Clarias gariepinus*, é um peixe de respiração aérea que apresenta modificações na lamela branquial, formando um leque ventilatório, e, nos 2<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> arcos branquiais, os órgãos arborescentes. Estas últimas estruturas formam o ABO desta espécie. Os objetivos do presente estudo foram: 1. Determinar se *C. gariepinus* é um respirador aéreo facultativo ou obrigatório. 2. Analisar as respostas cardiorrespiratórias ( $\dot{V}O_2$  - taxa metabólica;  $EO_2$  - extração de  $O_2$  da corrente ventilatória;  $\dot{V}_G$  - ventilação branquial;  $V_T$  - volume ventilatório;  $f_R$  - frequência respiratória;  $f_H$  - frequência cardíaca) em resposta a hipóxia gradual. 3. Verificar se a tensão crítica de  $O_2$  ( $PcO_2$ ) desta espécie está relacionada com a tomada de  $O_2$  do ar atmosférico. Para classificar a modalidade da respiração aérea de *C. gariepinus*, os peixes ( $Wt \sim 350$  g;  $n = 7$ ) foram mantidos em normóxia durante 24 h sem acesso ao ar atmosférico. A  $f_R$  manteve-se constante durante todo o experimento e não houve mortalidade, indicando que *C. gariepinus* é um respirador aéreo facultativo. Para analisar as respostas cardiorrespiratórias em normóxia (controle) e hipóxia gradual, a  $\dot{V}O_2$ ,  $EO_2$ ,  $f_R$ ,  $V_T$ ,  $\dot{V}_G$  e  $f_H$  foram registradas durante as seguintes tensões de  $O_2$  ( $PwO_2$ ): 100, 70, 50 e 30 mmHg. Os peixes mantiveram  $\dot{V}O_2$  constante até a  $PcO_2$  ( $\sim 55$  mmHg), abaixo da qual a  $\dot{V}O_2$  decresceu significativamente. Esta diminuição da  $\dot{V}O_2$  foi acompanhada da diminuição significativa da  $EO_2$  em  $P_{insp}O_2$  de  $62,7 \pm 1,30$  mmHg atingindo valores de  $19,6 \pm 1,9$  %, em hipóxia severa. A  $\dot{V}_G$ ,  $V_T$  e  $f_R$  aumentaram progressivamente até a  $P_{insp}O_2$  de  $28,0 \pm 0,5$  mmHg, chegando a valores máximos de, respectivamente,  $1545,7 \pm 63,5$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $33,9 \pm 0,8$  mLH<sub>2</sub>O.Kg<sup>-1</sup>.resp<sup>-1</sup> e  $57,2 \pm 1,4$  resp.min<sup>-1</sup>. A  $f_H$  diminuiu progressivamente de  $43,4 \pm 0,4$  bpm, em normóxia, até alcançar valores significativos próximos a  $PcO_2$  e valores mínimos em hipóxia severa ( $19,2 \pm 3,0$  bpm). Em experimentos de hipóxia gradual (100, 70, 50, 30, 20 e 10 mmHg) com acesso ao ar atmosférico, *C. gariepinus* aumentou aproximadamente 5x a frequência de respiração aérea ( $f_{RA}$ ). Em cada tensão hipóxica ocorreu uma bradicardia pré-RA seguido de taquicardia significativa pós-RA (típico de respiração aérea); a  $f_R$  manteve-se praticamente constante ( $\sim 32$  resp.min<sup>-1</sup>) até as duas últimas  $P_wO_2$  (20 e 10 mmHg), nas quais a  $f_R$  diminuiu para  $23,0 \pm 1,18$  resp.min<sup>-1</sup>. Finalmente, *C. gariepinus* é um peixe de respiração aérea facultativa contínua que regula a  $\dot{V}O_2$  até a  $PcO_2$  de  $\sim 55$  mmHg. Abaixo desta tensão o animal aumenta a  $\dot{V}_G$  devido principalmente a um pronunciado aumento na  $V_T$  (diminuição do custo metabólico da  $\dot{V}_G$ ). A bradicardia hipóxica pré-RA é uma característica de respiradores aquáticos, enquanto a taquicardia hipóxica pós-RA é típica de respiradores aéreos. A  $f_{RA}$  aumentou proporcionalmente com a hipóxia gradual, principalmente próximo a  $PcO_2$ . Tais resultados demonstram que *C. gariepinus* está adaptado a sobreviver em habitats hipóxicos e demonstra uma maior dependência do ar atmosférico do que outros respiradores bimodais facultativos.

**Palavras-Chave:** Siluriformes. Clariidae. Respirometria. Bradicardia. Taquicardia. Hiperventilação. Peixe de respiração aérea.

## ABSTRACT

Air-breathing fish are classified as obligatory (when breathing obligatory atmospheric air independently of the water  $O_2$  tension) or facultative air-breather (using an air breathing organ – ABO –, when their gills are not able to extract all  $O_2$  necessary to maintain the aerobic mechanisms under hypoxic conditions). The catfish, *Clarias gariepinus*, is air-breathing fish that shows modifications on the gill lamella, forming a ventilatory fan, and on the 2<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> gill arches, forming an arborescent organ. These structures form the ABO of this specie. The objectives of the present study were: 1. To determine if *C. gariepinus* is an obligatory or a facultative air breather. 2. To analyze the cardio-respiratory responses ( $\dot{V}O_2$  - metabolic rate;  $\dot{V}_G$  - gill ventilation;  $V_T$  - ventilatory volume;  $f_R$  - respiratory frequency;  $EO_2$  -  $O_2$  extraction from the ventilatory current;  $f_H$  - heart frequency) in response to progressive hypoxia. 3. To verify if the critical  $O_2$  tension ( $PcO_2$ ) of this specie is correlated with the  $O_2$  uptake from the atmospheric air. To classify the air-breathing mode of *C. Gariepinus*, the fish (Wt ~ 350 g; n = 7) were maintained in normoxia during 24 hours without access to air. The  $f_R$  maintained constant during all the experiment and there was no mortality, indicating that *C. gariepinus* is a facultative air-breather. To analyze the cardio-respiratory responses to progressive hypoxia,  $\dot{V}O_2$ ,  $EO_2$ ,  $f_R$ ,  $V_T$ ,  $\dot{V}_G$ ,  $EO_2$  and  $f_H$  were recorded under the following water  $O_2$  tensions ( $PwO_2$ ): 100, 70, 50 e 30 mmHg. Fish maintained a constant  $\dot{V}O_2$  until the  $PcO_2$  (~ 55 mmHg), below which  $\dot{V}O_2$  decreased significantly. This decreasing was followed with the significant reduction of  $EO_2$  in  $P_{insp}O_2$  of  $62,7 \pm 1,30$  mmHg reaching values of  $19,6 \pm 1,9$  % in severe hypoxia. The  $\dot{V}_G$  and the  $V_T$  increased progressively until  $P_{insp}O_2$  of  $28,0 \pm 0,5$  mmHg, reaching highest values of, respectively,  $1545,7 \pm 63,5$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $33,9 \pm 0,8$  mLH<sub>2</sub>O.Kg<sup>-1</sup>.resp<sup>-1</sup> e  $57,2 \pm 1,4$  resp.min<sup>-1</sup>. The  $f_H$  reduced progressively from  $43,4 \pm 0,4$  bpm, in normoxia, arriving significant values just above the  $PcO_2$  and reaching minimum values ( $19,2 \pm 3,0$  bpm) in severe hypoxia. Under progressive hypoxia (100, 70, 50, 30 e 20 mmHg) and with the access to the atmospheric air, *C. gariepinus* (Wt ~ 610 g; n = 9) presented a 5-fold increase in the air-breathing frequency ( $f_{RA}$ ). A bradycardia was observed just before the air breath and a tachycardia just after. Concluding, *C. gariepinus* is a continuous facultative air-breathing fish that regulate the  $\dot{V}O_2$  until the  $PcO_2$  of ~54 mmHg. Below this tension fish increase the  $\dot{V}_G$  mainly due to a larger increase of  $V_T$  (lower metabolic cost of  $\dot{V}_G$ ). The hypoxic pre-air breath bradycardia is characteristic of aquatic breathers while the post-air breath tachycardia is typical of air respirators. The  $f_{RA}$  increased proportionally with the progressive hypoxia, mainly just above the  $PcO_2$ . These results show that *C. gariepinus* is adapted to survive at hypoxic habitats and that this species show a higher dependence of the atmospheric air than the others facultative air-breathing fishes.

**Keywords:** Siluriforms. Clariidae. Respirometry. Bradycardia. Tachycardia. Hyperventilation. Air-breathing fish.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Exemplar de um bagre africano, *Clarias gariepinus* (385 g; Burchell, 1822)..... 6
- FIGURA 2** – Exemplar de bagre-africano, *C. gariepinus* (~ 350 g), anestesiado sobre a mesa cirúrgica com cânulas de polietileno implantadas na boca e nas bordas dos opérculos e eletrodos de ECG implantados próximo à cavidade cardíaca e na musculatura acima da linha lateral..... 11
- FIGURA 3** - Ilustração do sistema de respirometria utilizado na obtenção dos dados de  $\dot{V}O_2$ ,  $\dot{V}_G$ ,  $f_R$ ,  $V_T$  e  $f_H$ . **a** - respirômetro, **b** - cânula para a medida da  $P_eO_2$ , **c** - cânula para a medida da  $P_sO_2$ , **d** - cânula bucal para a medida da  $P_{insp}O_2$ , **e** - cânula opercular para a medida da  $P_{exp}O_2$ , **f** - torneiras de 3 vias, **g** - eletrodos de  $O_2$ , **h** - analisadores de  $O_2$ , **i** - frasco de ajuste de fluxo, **j** - bomba de circulação de água, **l** - transdutor de pressão, **m** - amplificador de pressão, **n** - sistema de aquisição de dados em tempo real..... 12
- FIGURA 4** - Ilustração do sistema experimental desenvolvido para animais de respiração aérea e utilizado na obtenção de dados de  $f_R$ ,  $f_{RA}$  e  $f_H$  do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, exposto a hipóxia gradual..... 15
- FIGURA 5** – Fotografia da parte dorsal da câmara suprabranquial exposta mostrando as estruturas morfo-funcionais de respiração de um bagre-africano, *Clarias gariepinus* (480 g)..... 18
- FIGURA 6** – Fotografias das estruturas morfo-funcionais de respiração de um bagre-africano, *Clarias gariepinus* (~ 1.700 kg). **A**– Vista dos arcos branquiais separados; **B** – Vista dos arcos branquiais unidos; **C** – Vista aproximada dos leques branquiais e do ABO; **LE** – lado esquerdo, **LD** – lado direito..... 18

- FIGURA 7** – Respostas da frequência respiratória ( $f_R$  – resp.min<sup>-1</sup>) de *Clarias gariepinus* (n = 7; Wt = 350 ± 15g) *sem* acesso ao ar atmosférico e submerso em água normóxica ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2 > 130$  mmHg) durante 30 h. Média ± S.E.M..... 20
- FIGURA 8** – Efeito da redução das tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ ) na extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$  - %) e na tomada de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  - mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico. A seta indica a tensão crítica de oxigênio ( $P_{cO_2} \sim 55$  mmHg). \* - indica diferença significativa dos valores em normóxia. Média ± S.E.M.; n = 13 ( $P \leq 0,05$ ).....26
- FIGURA 9** – Relações entre a frequência respiratória ( $f_R$  – resp.min<sup>-1</sup>), o volume ventilatório ( $V_T$  – mL H<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.resp<sup>-1</sup>) e a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mL H<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) e as tensões de água inspirada ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2$  - mmHg) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico. ). \* - indica diferença significativa dos valores em normóxia. Média ± S.E.M.; n = 13 ( $P \leq 0,05$ )..... 28
- FIGURA 10** – Relações entre a frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) e as tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico. ). \* - indica diferença significativa em relação aos valores normóxicos. Média ± S.E.M.; n = 13 ( $P \leq 0,05$ ).....30
- FIGURA 11** – Registro dos complexos QRS do ECG de *Clarias gariepinus* em normóxia ( $P_e\text{O}_2 = 140$  mmHg) e *sem* acesso ao ar atmosférico para obtenção dos valores da  $f_H$  (bpm)..... 31
- FIGURA 12** – Registro dos complexos QRS do ECG de *Clarias gariepinus* em hipóxia severa ( $P_e\text{O}_2 = 30$  mmHg) e *sem* acesso ao ar atmosférico para obtenção dos valores da  $f_H$  (bpm). Observa-se um aumento no

intervalo R-R quando comparado ao registro da figura anterior.. 31

**FIGURA 13** – Relações entre a frequência respiratória ( $f_R$  – resp.min<sup>-1</sup>) pré (●) e pós (▲) respiração aérea e as tensões de O<sub>2</sub> inspirada ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, durante hipóxia gradual com acesso ao ar atmosférico.. # - indica diferença significativa com relação aos valores normóxicos. Médias  $\pm$  S.E.M.; n = 9 ( $P \leq 0,05$ )..... 35

**FIGURA 14** – Relações entre a frequência de respiração aérea ( $f_{\text{RA}}$  – RA.h<sup>-1</sup>) e as tensões da água inspirada ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, durante hipóxia gradual com acesso ao ar atmosférico. ). \* - indica diferença significativa com relação aos valores normóxicos. Média  $\pm$  S.E.M.; n = 9 ( $P \leq 0,05$ ).....35

**FIGURA 15** – Relações entre as frequência cardíacas ( $f_H$  – bpm) antes (□) e após (■) as respirações aéreas, durante as tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada ( $P_w\text{O}_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, em hipóxia gradual. ▨ – representa os valores médios entre as respirações aéreas de cada  $P_w\text{O}_2$ . As barras representam as médias  $\pm$  1 S.E.M. (n = 9) e os asteriscos ( \* ) a diferença significativa entre a  $f_H$  pré e pós-RA de uma mesma  $P_w\text{O}_2$  ( $P \leq 0,05$ ).....38

**FIGURA 16** – Registro dos complexos QRS do ECG de *Clarias gariepinus* em hipóxia severa ( $P_w\text{O}_2 = 10$  mmHg) antes e após uma respiração aérea para obtenção dos valores da  $f_H$  (bpm), pré e pós-RA.....39

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Valores médios ( $\pm$  S.E.M.) de tensão de  $O_2$  da água inspirada ( $P_{\text{insp}}O_2$  – mmHg) e dos parâmetros cardiorrespiratórios obtidos de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual ( $P_{\text{e}}O_2 = 140, 100, 70, 50$  e  $30$  mmHg) sem acesso ao.....24
- TABELA 2** - Comparação dos valores de tensão crítica de oxigênio ( $P_{\text{c}}O_2$ ), consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e extração de oxigênio ( $EO_2$ ) de *Clarias gariepinus* com os valores de outros respiradores bimodais siluriformes e não-siluriformes, e teleósteos de respiração exclusivamente aquática durante normóxia.....25
- TABELA 3.** Valores médios ( $\pm$  S.E.M.) dos parâmetros cardiorrespiratórios de *Clarias gariepinus*, com acesso ao ar atmosférico, durante hipóxia gradual ( $P_{\text{w}}O_2 = 140, 100, 70, 50, 30, 20$  e  $10$  mmHg), e porcentagem da diferença pré e pós-respiração aérea (pré-RA e pós-RA) em cada tensão.....34
- TABELA 4** - Comparação dos valores de frequência cardíaca ( $f_H$ ) pré e pós-RA de *Clarias gariepinus* com os valores de  $f_H$  pré e pós-RA de outros teleósteos de respiração aérea durante hipóxia severa..... 40

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Metabolismo Respiratório.....	1
1.2 Família Clariidae.....	4
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1. Coleta e manutenção em laboratório.....	8
3.2. Protocolo Experimental 1: Identificação das Estruturas Morfo-Funcionais de Respiração.....	9
3.3. Protocolo Experimental 2: Respiração Aérea “ Obrigatória ou Facultativa?”.....	9
3.4. Protocolo Experimental 3: Experimento de Hipóxia <i>sem</i> Acesso ao Ar Atmosférico – Respirometria.....	10
3.4.1. Preparação dos Animais.....	10
3.5. Protocolo Experimental 4: Experimentos de Hipóxia <i>com</i> Acesso ao Ar Atmosférico - Respiração Aérea.....	14
3.5.1. Preparação dos Animais e Protocolo Experimental.....	14
3.6. Análise Estatística.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Anatomia das Estruturas Morfo-Funcionais de respiração de <i>C.</i> <i>gariepinus</i> .....	17
4.2. Respiração Aérea: Obrigatória ou Facultativa?.....	19
4.3. Experimento de Hipóxia <i>sem</i> Acesso ao Ar Atmosférico.....	21
4.3.1. Consumo de O <sub>2</sub> , Tensão Crítica de O <sub>2</sub> e Extração de O <sub>2</sub> .....	21
4.3.2. Ventilação Branquial, Volume Ventilatório, Frequência Respiratória.....	27
4.3.3. Respiração Cardíaca.....	29
4.4. Experimento de Hipóxia <i>com</i> Acesso ao Ar Atmosférico.....	32
4.4.1. Frequência de Respiração Aquática e Frequência de Respiração Aérea.....	32

4.4.2. Frequência Cardíaca.....	36
5- CONCLUSÕES.....	41
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A Origem do Oxigênio e dos Animais de Respiração Aérea

A cerca de quatro bilhões de anos, seres autotróficos clorofilados tornaram-se capazes de sintetizar açúcar através da fixação de gás carbônico e hidrogênio (este oriundo da água), com liberação de oxigênio para o ambiente. Isto reduziu a concentração do CO<sub>2</sub> atmosférico e, conseqüentemente, houve uma diminuição na temperatura da terra (por meio da diminuição do efeito estufa), além do aumento na concentração de O<sub>2</sub> no ar (PURVES, 2002).

No final do período Siluriano (438 - 245 milhões de anos), o aumento da concentração de O<sub>2</sub> no ambiente aéreo possibilitou o aparecimento do primeiro peixe adaptado a respirar ar atmosférico (Graham, 1997a). Durante o Permiano (290 – 245 milhões de anos), ocorreu a primeira variação na concentração deste gás na Terra que, em conjunto com outros fatores, produziu a primeira extinção em massa. Dois eventos predominantes originaram a extinção de 95% das espécies neste período: a) o grande derramamento de lava vulcânica nos oceanos que ao matar e oxidar diversas espécies marinhas reduziu drasticamente o conteúdo de oxigênio das águas profundas nos oceanos, abaixo de 30% e b) uma rápida mudança nos oceanos que, ao trazerem estas águas profundas (pobres em oxigênio) acompanhadas de concentrações tóxicas de dióxido de carbono e ácido sulfídrico - posteriormente foram liberadas para a atmosfera, intoxicando tanto as espécies aquáticas como as terrestres (BERNER, 1989; GRUSZCZYNSKI, 1989; ERVIN, 1990). Desta forma, a variação na concentração de oxigênio exerceu pressão seletiva para adaptação e sobrevivência dos animais desde as eras geológicas mais primitivas.

Algumas características do oxigênio são importantes para compreender sua concentração atual nos ambientes terrestre (0,209 L de O<sub>2</sub> por litro de ar) e aquático (0,007 L de O<sub>2</sub> por L de H<sub>2</sub>O). Devido este gás possuir maior difusibilidade e solubilidade no ar do que na água, isto é, maior capacidade de difundir-se no ambiente aéreo, sua concentração é 30 vezes mais elevada na atmosfera do que no ambiente aquático. Atualmente, o O<sub>2</sub> está disponível em quantidades adequadas em praticamente todos os locais nos ambientes terrestres (exceção feita às grandes altitudes), porém os ambientes aquáticos, principalmente os de águas estagnadas,

são frequentemente sujeitos a reduções das pressões parciais do oxigênio dissolvido, sendo, portanto, mais susceptíveis a hipóxia ambiental (JOHANSEN, 1970; SCHMIDT-NIELSEN, 1997a).

Alguns fatores naturais também exercem variação na concentração de  $O_2$  nos ambientes aquáticos. Por exemplo, a fotossíntese executada por macro e micrófitas pode causar grande elevação nos níveis de  $O_2$  aquático durante o dia (fase clara da fotossíntese); entretanto, o consumo de  $O_2$  pelos processos metabólicos da biomassa pode produzir regiões hipóxicas localizadas e/ou generalizadas (RANDALL *et al.*, 1997). Outro fator é a variação na temperatura da água, tanto diária como sazonal, principalmente dos ambientes tropicais, que ao ficarem quentes difundem o  $O_2$  para o ambiente aéreo diminuindo sua concentração na água. Em determinados locais, durante o verão, as águas podem até secar totalmente deixando um ambiente inóspito aos animais aquáticos. Outros ambientes naturais com baixa concentração de oxigênio dissolvido são águas profundas, regiões de brejos ou pântanos (SINGH & HUGHES, 1971; TENNEY, 1979; GRAHAM, 1983; KRAMER, 1987).

Além disso, existem os fatores não-naturais que induzem a hipóxia aquática como, por exemplo, o lançamento de dejetos orgânicos domésticos ou industriais, cuja decomposição por bactérias aeróbias requer grandes quantidades de  $O_2$  (GOLUBKOV & ALIMOV, 2010; HERNÁNDEZ-MIRANDA *et al.*, 2010). Tal fenômeno antropológico vem recebendo crescente atenção à medida que agentes poluentes agravam o decréscimo natural da pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ) aquática, prejudicando toda a fauna e a flora desses ambientes e, particularmente, os peixes (GLASS, 1992).

Desta forma, os animais aquáticos podem ser classificados em duas categorias de acordo com sua resposta ao consumo de  $O_2$  (taxa metabólica) em relação à redução da disponibilidade de  $O_2$  ambiental, como: “oxirreguladores” ou “oxi-conformistas”. Os primeiros mantêm seu metabolismo padrão/basal estável enquanto a  $PO_2$  do meio é reduzida (hipóxia ambiental). Sua taxa de consumo de oxigênio permanece constante até uma determinada tensão de  $O_2$ , chamada de tensão crítica de  $O_2$  ( $PcO_2$ ), abaixo da qual seu metabolismo respiratório padrão/basal tende a diminuir significativamente, com o decréscimo da  $PO_2$ . A elevação do teor de  $O_2$  ambiental, dentro de limites fisiológicos, não altera o metabolismo respiratório padrão/basal. Entre os oxirreguladores estão alguns

anelídeos, moluscos e crustáceos e muitos vertebrados (PROSSER, 1973; WITHERS, 1992; SCHMIDT-NIELSEN, 1997b).

Ao contrário, os animais classificados como “conformistas”, ou “oxi-conformistas”, apresenta seu metabolismo respiratório padrão/basal variando de modo proporcional à variação da  $PO_2$  ambiental, ou seja, sua taxa metabólica acompanha as alterações do teor do  $O_2$  ambiental. Entre os animais considerados oxi-conformistas estão vários invertebrados e alguns vertebrados aquáticos, como várias espécies de peixes. Ainda, há animais que apresentam padrões de resposta intermediários entre os reguladores e conformistas (PROSSER, 1973).

Os peixes oxirreguladores apresentam diversas respostas adaptativas que os permitem resistir às reduções do  $O_2$  ambiental. Estas envolvem processos comportamentais, como simplesmente a procura de novos locais mais bem oxigenados, fugindo do ambiente pouco favorável. Neste sentido, a respiração na superfície aquática (ASR – “aquatic surface respiration”) já foi identificada em várias espécies de peixes sendo uma estratégia muito importante. Nesta situação, o animal sobe até a superfície aquática para respirar desta água que é mais bem oxigenada e, muitas vezes, este comportamento é acompanhado de alterações de tamanho de lábio inferiores que atuam “afunilando” a água em direção às brânquias, onde ocorrem as trocas gasosas (FLORINDO, 2002). Alguns destes mecanismos são adequados para exposições de curto prazo a baixos teores de  $O_2$ . Porém, com o aumento na duração ou na severidade deste problema aumentam, em muito, os custos metabólicos em termos de dispêndio de energia e a vulnerabilidade à predação.

Outras respostas adaptativas fisiológicas possibilitam a resistência a pressões de  $O_2$  mais baixos, como os ajustes no sistema cardiorrespiratório. Por exemplo, pode-se citar a hiperventilação que aumenta o volume de água que passa pelas brânquias e a bradicardia que, ao aumentar o volume sanguíneo bombeado aumenta o débito cardíaco e o tempo de trânsito do sangue pelas lamelas secundárias, facilita a difusão do  $O_2$  para o sangue (RANTIN *et al.*, 1993). Também, existem os recursos moleculares e bioquímicos para a sobrevivência em hipóxia, como a produção de isoformas de hemoglobina com afinidade aumentada ao  $O_2$ ; ou a utilização de metabolismo anaeróbio (FRASER *et al.*, 2006).

Apesar das estratégias comportamentais e dos ajustes fisiológicos mencionados anteriormente, muitas vezes estes não são eficientes para prover uma

difusão adequada do O<sub>2</sub> do meio para os vasos branquiais. Deste modo, a pressão seletiva direcionou a sobrevivência de animais tanto resistentes como tolerantes à hipóxia ambiental, e principalmente aqueles animais que possuísem modificações no sistema respiratório. Animais que utilizassem outros órgãos para trocas gasosas com o ar, como o trato digestório, bexiga natatória, câmara bucal, entres outros, assim como a presença de pulmões (dipnóicos) se tornariam os melhores sobreviventes nesta situação inóspita (JOHANSEN, 1970; DEHADRAI & TRIPATHI, 1976; KRAMER & McCLURE, 1982; STEFFENSEN *et al.*, 1982; GLASS *et al.*, 1991; RANTIN *et al.*, 1993).

## 1.2. Família Clariidae

Entre os peixes que apresentam respiração aérea há uma grande variação interespecífica no que se refere ao grau de dependência da água ou do ar, o que está relacionado com o desenvolvimento das brânquias e dos órgãos de respiração aérea, assim como o ambiente em que vivem (JOHANSEN, 1966; FARBER & RAHN, 1970; GAREY & RAHN, 1970; HUGHES & SINGH, 1970a, b; SINGH & HUGHES, 1971).

Entre as diversas espécies de peixes de respiração aérea já catalogadas, estão as da ordem Siluriformes. Esta ordem é a segunda maior do grupo de peixes tropicais, possuindo 36 famílias, 478 gêneros e mais de 3.000 espécies (FERRARIS JR, 2007). Os membros desta ordem são chamados de bagres, pois a maioria dos animais possui grandes barbilhões (bigodes) quimiossensitivos os quais facilitam a procura de alimentos entre a vegetação e rochas em águas profundas, onde geralmente vivem (BURGESS, 1989; PAXTON & ESCHMEYER, 1995)

A família Clariidae encontra-se na ordem Siluriformes e é caracterizada por bagres de respiração aérea e possui aproximadamente 10 gêneros e cerca de 75 espécies. (GRAHAM, 1997). O nome desta família é de origem grega (*chlaros* = livres) referindo-se a habilidade deles viverem longos períodos em qualquer ambiente, inclusive fora da água. Alguns clariídeos, como *Clarias lazera*, são denominados de “walking catfishes”, pois podem rastejar-se à procura de melhores condições ambientais, alimentícias ou como fuga de predadores. (BURGESS 1989; SMITH, 1945)

Esta família possui aproximadamente 10 gêneros e cerca de 75 espécies. Estes possuem vários tamanhos chegando até a 200 cm e pesando 60 kg (BRUTON, 1979). O grupo caracteriza-se por espécies onívoras apesar de haver indivíduos considerados como predadores vorazes, como o *Clarias batrachus*. As principais presas dos *Clarias* são larvas de insetos, insetos adultos, ovos de peixes e pequenos peixes, algumas plantas, e, ainda, existem relatos de filhotes de paturi (uma ave aquática) no estômago de um bagre-africano juvenil (FERRI, 2004). Em momentos de estiagem, quando presas e predadores estão mais agrupados, a predação de outras espécies de peixes é mais claramente visível. Ainda é interessante mencionar que algumas espécies têm a capacidade de sobreviver longos períodos de escassez de alimento (COURTENAY, 1970; COURTENAY *et al.*, 1974).

Inicialmente, este gênero era principalmente distribuído através de toda a África e sul da Ásia, porém atualmente eles estão distribuídos em muitas áreas das Américas por terem sido introduzidos por piscicultores (LACHNER *et al.*, 1970; COURTENAY & STAUFFER, 1984). Devido a sua rusticidade, crescimento rápido e boa qualidade de sua carne, a espécie deste estudo, *Clarias gariepinus* (FIG. 1), foi introduzida no Brasil em 1997 para cultivo. Porém, alguns indivíduos escaparam das pisciculturas e invadiram lagos e rios. Agora em condições naturais, sua população foi aumentando rapidamente, alcançando diversas bacias em diferentes regiões do país. Por ser uma espécie exótica e um predador oportunista, *C. gariepinus* está causando um sério impacto ecológico ao dizimar diversas espécies naturais dos rios brasileiros (ALVES *et al.*, 1999; MILI & TEIXEIRA, 2006)

Na área da fisiologia respiratória, muitos clariídeos apresentam respiração aérea regular apenas em baixas tensões de O<sub>2</sub>, porém algumas espécies demonstram uma baixa frequência de respiração aérea mesmo quando em normóxia. Esta diversidade traz algumas dúvidas quanto à obrigatoriedade da respiração aérea em algumas espécies. Por exemplo, a maioria dos estudos feitos com *C. batrachus*, *C. lazera* e *C. macrocephalus* indicam que estes não são respiradores aéreos obrigatórios (HORA, 1935; MAGID, 1971; JORDAN, 1976; BEVAN & KRAMER, 1987), porém, outros autores concluíram que *C. batrachus*, *C. lazera* e *C. mossambicus* apresentam respiração aérea obrigatória (DAS, 1927; MOUSSA, 1956; GREENWOOD, 1961; SINGH & HUGHES, 1971). Devido algumas controvérsias neste gênero, o presente trabalho tem como um dos objetivos

classificar *C. gariepinus* em um dos grupos: respirador aéreo facultativo ou obrigatório.

Uma das primeiras descrições dos órgãos de respiração aérea (ABO - air-breathing organ) deste grupo foi feita por HILAIRE (1802) para *Silurus* (= *Clarias*) *anguillaris*. O ABO deste gênero é composto de um par de câmaras suprabranciais localizadas na parte posterior-dorsal da cavidade opercular e quase totalmente preenchido por “árvores respiratórias”, os órgãos arborescentes, que são extensões das partes mais elevadas dos 2<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> arcos branquiais. A abertura de cada câmara possui válvulas que impedem a entrada de água. Estas válvulas são extensões em forma de leques das últimas lamelas branquiais interiores de cada arco branquial. A superfície mais interna destas aberturas, a base, as paredes interiores da câmara, e também as superfícies arborescentes são envolvidas por um epitélio branquial modificado que também auxilia a função respiratória aérea (MOUSSA, 1956, 1957; MUNSHI, 1961, 1976; SINGH *et al*, 1982). Esta descrição das estruturas morfo-funcionais de respiração dos clariídeos já estudados será utilizada para verificar a semelhança com a espécie estudada, *Clarias gariepinus* (Fig. 1).



**FIGURA 1** - Exemplar do bagre africano, *Clarias gariepinus* (385 g, BURCHELL, 1822).

## 2. OBJETIVOS

Para se responder a principal pergunta do estudo: “Quais são as estratégias adaptativas e fisiológicas cardiorrespiratórias que *Clarias gariepinus* desenvolveu para sobreviver em ambientes hipóxicos?”, o presente trabalho teve por objetivos:

1. verificar se *Clarias gariepinus* apresenta as mesmas estruturas morfo-funcionais de respiração que os demais clariídeos, conforme descrito por MOUSSA (1956, 1957), MUNSHI (1961, 1976) e SINGH *et al* (1982);

2. determinar se *Clarias gariepinus* é uma espécie de respiração aérea obrigatória ou facultativa, ou seja, se esse peixe consegue obter o O<sub>2</sub> necessário à manutenção de seus processos aeróbicos utilizando-se somente das brânquias até um determinado grau de hipóxia, abaixo da qual o ABO é acionado, ou se mesmo em normóxia (PO<sub>2</sub> da água ~ 140 mmHg) o ABO deve ser utilizado para complementar o O<sub>2</sub> de que o peixe necessita;

3. analisar as seguintes respostas cardiorrespiratórias: taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ), ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), volume ventilatório ( $V_T$ ), extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) e a frequência cardíaca ( $f_H$ ) durante hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico;

4. pela  $\dot{V}O_2$ , em função das tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada, determinar a tensão crítica de O<sub>2</sub> ( $PcO_2$ ) para essa espécie;

5. verificar a relação existente entre a capacidade de acionar os mecanismos compensatórios à hipóxia (aumento na  $f_R$ ,  $V_T$ , e  $\dot{V}O_2$ ) e a  $PcO_2$ ;

6. verificar se a  $PcO_2$  dessa espécie está relacionada com o limiar da utilização do ABO em resposta a níveis hipóxicos mais severos;

7. analisar como a frequência de respiração aérea ( $f_{RA}$ ) de *Clarias gariepinus* se altera frente à hipóxia gradual.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta e manutenção em laboratório

Para este projeto foram utilizados exemplares de bagre africano, *Clarias gariepinus* (Wt ~ 300 – 700 g) obtidos em criações comerciais próximas ao município de São José do Rio Preto, SP. Os animais foram mantidos no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar em tanques de 1.000 L com fluxo contínuo de água normóxica ( $P_{wO_2}$  ~ 140 mmHg) não clorada, a  $25 \pm 1$  °C. Os animais foram alimentados “*ad libitum*” com ração formulada com 22% de proteína. Porém, antes do desenvolvimento dos protocolos experimentais os animais foram mantidos em jejum por 48 h para se evitar a eliminação de fezes dentro dos sistemas experimentais.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos (Parecer Nº 011/2007). Foram feitos os seguintes protocolos experimentais:

a) **Protocolo Experimental 1:** *Identificação das Estruturas Morfo-Funcionais de Respiração de Clarias gariepinus (n = 2; 480 e 1.700 g);*

b) **Protocolo Experimental 2:** *Respiração Aérea “Obrigatória ou Facultativa?” (Grupo I; n = 7; MC =  $352 \pm 26$  g);*

c) **Protocolo Experimental 3:** *Experimentos de Hipóxia sem Acesso ao Ar Atmosférico – Respirimetria (Grupo II; n = 13; MC =  $360 \pm 20$  g);*

d) **Protocolo Experimental 4:** *Experimentos de Hipóxia com Acesso ao Ar Atmosférico – Respiração Aérea (Grupo III; n = 9; MC =  $610 \pm 55$  g).*

### 3.2. Protocolo Experimental 1: Identificação das Estruturas Morfo-Funcionais de respiração

Para se verificar as prováveis similaridades entre as estruturas morfo-funcionais de respiração de *Clarias gariepinus* com a de outros clariídeos, dois animais (480 g e 1.700 kg) foram previamente anestesiados (Benzocaína 0,1 g.L<sup>-1</sup>) e tiveram a medula espinhal seccionada. Após isto, suas câmaras branquiais e cavidades suprabranquiais foram expostas para observação. A dissecação foi feita sob microscópio cirúrgico Opto SM 2001, Opto Eletrônica, São Carlos, SP, que possui uma câmera de vídeo acoplada e conectada a uma placa de digitalização de imagens ATI-Pro de um microcomputador PC IBM-compatível.

### 3.3. Protocolo Experimental 2: Respiração Aérea “Obrigatória ou Facultativa?”

Para se verificar se *C. gariepinus* é uma espécie de respiração aérea obrigatória ou facultativa, os animais (Grupo I; n = 7; 352 ± 26 g) foram previamente anestesiados (Benzocaína 0,1 g.L<sup>-1</sup>) para implantação de cânulas de polietileno (PE – 100) na câmara bucal (conforme descrição e procedimentos cirúrgicos posteriormente detalhados no tópico 3.4.1.). Após isto, os animais foram individualmente colocados dentro de uma câmara experimental semelhante a uma gaiola, na qual o animal ficava solto, porém totalmente submerso em água normóxica ( $P_{wO_2} \sim 140$  mmHg). Assim, os animais eram impedidos de terem acesso ao ar atmosférico. Os animais foram deixados em recuperação pós-cirúrgica por 12 h. Após este período, a cânula bucal foi conectada a um transdutor de pressão cujo sinal foi amplificado e enviado a um sistema de aquisição de dados em tempo real Dataq DI-194 de um microcomputador PC-IBM compatível. Esta preparação serviu para coletar dados de frequência respiratória ( $f_R$ ) a fim de serem relacionados com as respostas cardiorrespiratórias *com* e *sem* acesso ao ar atmosférico durante hipóxia gradual. Os experimentos duraram aproximadamente 30 h com registro contínuo da respiração do animal, e a coleta de dados ocorreu a cada três horas (dados representados como média ± S.E.M.).

### 3.4. Protocolo Experimental 3: Experimento de Hipóxia sem Acesso ao Ar Atmosférico - Respirometria

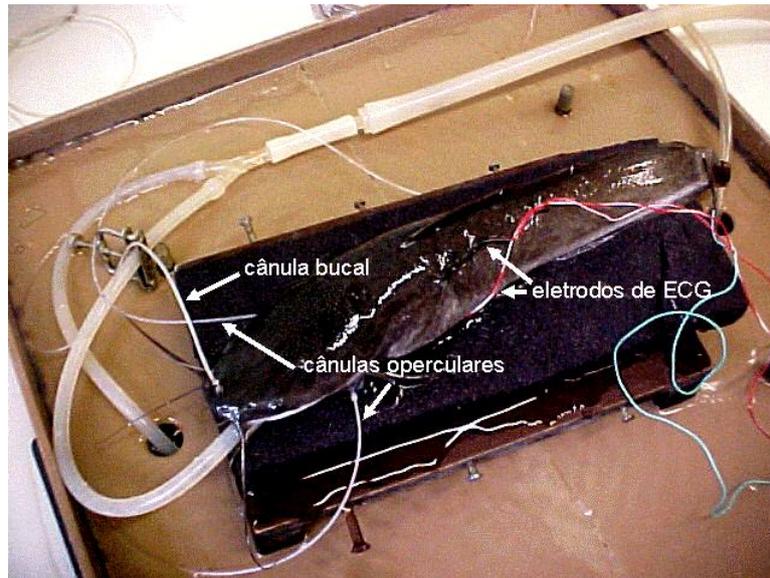
#### 3.4.1. Preparação dos Animais

Para analisar as respostas cardiorrespiratórias (taxa metabólica -  $\dot{V}O_2$ , frequência respiratória -  $f_R$ , ventilação branquial -  $\dot{V}_G$ , volume ventilatório -  $V_T$ , a extração de  $O_2$  da corrente ventilatória -  $EO_2$  e frequência cardíaca -  $f_H$ ), sem acesso ao ar atmosférico, foram adotados os seguintes procedimentos cirúrgicos:

Os animais foram previamente anestesiados, como anteriormente descrito, em uma solução de Benzocaína ( $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Durante as cirurgias, os animais tiveram suas brânquias ventiladas com uma segunda solução de Benzocaína ( $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), constantemente aerada, para manutenção de níveis adequados de anestesia e  $P_wO_2$ . Foram implantadas cânulas de polietileno na câmara bucal (PE-100; *Grupos I, II e III*) na região do palato, e nas bordas dos opérculos (PE-70; *Grupo II*; ver figura 2). A cânula bucal serve para as medidas da  $PO_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e para as medidas da frequência respiratória ( $f_R$ ), enquanto que as cânulas operculares são utilizadas para amostragem da  $PO_2$  da água expirada ( $P_eO_2$ ).

Além disso, foram implantados nos animais (*Grupos II e III*) eletrodos de eletrocardiograma (ECG) de acordo com o método descrito por GLASS et al. (1991). Um eletrodo (+) foi inserido e suturado na posição ventral, na cavidade cardíaca, sem atingir o coração. Um segundo eletrodo (-), foi inserido na musculatura acima da linha lateral e na parte mediana do animal. A implantação destes eletrodos resulta em registros equivalentes à derivação D1 da eletrocardiografia padrão e permite uma análise da frequência cardíaca.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais (*Grupo II*) foram colocados no interior de um respirômetro de fluxo constante (4 L), e este posicionado dentro de um tanque experimental (Fig. 4). Um elevado fluxo de água foi inicialmente ajustado para aproximadamente  $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , a fim de acelerar a recuperação da anestesia. Tais procedimentos foram realizados durante os finais de tarde a fim de manter os animais em recuperação pós-cirúrgica durante toda à noite (“overnight”), isto é, uma recuperação por mais de 12 h. Tanto a preparação dos animais quanto suas recuperações foram a mesma para os dois os protocolos experimentais de *respirometria e respiração aérea (Grupos II e III)*.



**FIGURA 2** - Exemplo de bagre-africano, *C. gariepinus* (~ 350 g), anestesiado sobre a mesa cirúrgica com cânulas de polietileno implantadas na boca e nas bordas dos opérculos e eletrodos de ECG implantados próximo à cavidade cardíaca e na musculatura acima da linha lateral.

No dia seguinte, após recuperação cirúrgica, o fluxo da água foi ajustado de forma padronizada mantendo-se a diferença entre 10 a 15 % dos valores da  $P_eO_2$  e  $P_sO_2$ , no início do experimento, em normóxia. Esta mudança é de grande relevância, pois a manutenção de um fluxo elevado, isto é, acima de  $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , seria praticamente impossível quantificar a extração de  $O_2$  pelas brânquias em hipóxia severa (SAUNDERS, 1962).

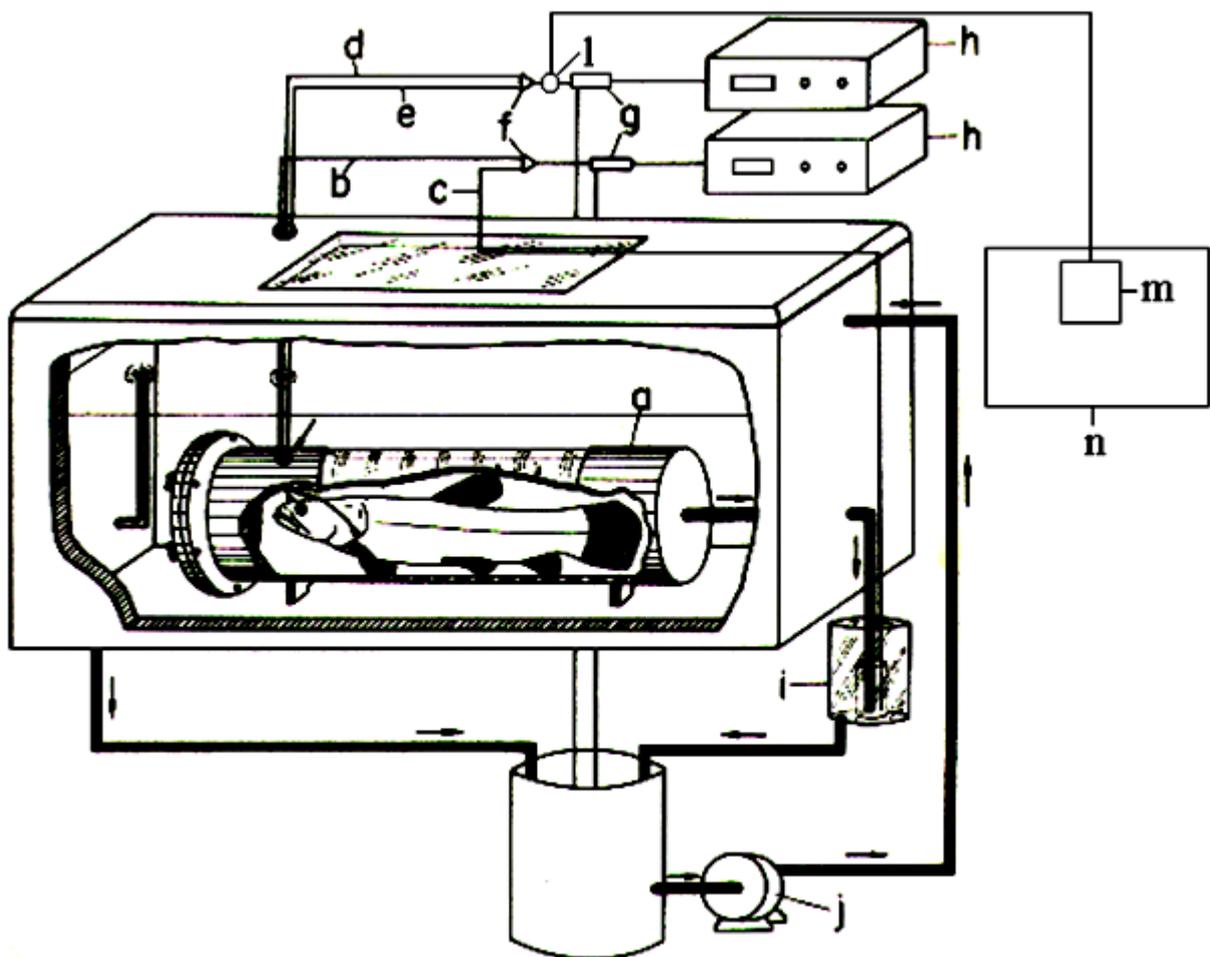
As medidas da  $PO_2$  da água do tanque experimental, da entrada ( $P_eO_2$  – mmHg) e da saída do respirômetro ( $P_sO_2$  – mmHg), foram realizadas com um analisador de  $O_2$  FAC<sup>®</sup> 204A (FAC, São Carlos, SP), que teve seu eletrodo de  $O_2$  calibrado com solução Borax (0,01N) saturado com sulfito de sódio, para  $PwO_2 = 0$  mmHg, e com água saturada com ar atmosférico, para  $PwO_2 = 140$  mmHg (ver Fig. 4).

A  $\dot{V}O_2$  foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\dot{V}O_2 = (P_eO_2 - P_sO_2) \cdot \alpha \cdot \dot{V}_R / Wt$$

onde:  $\alpha$  = coeficiente de solubilidade do  $O_2$  na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\dot{V}_R$  = fluxo através do respirômetro ( $\text{mLH}_2\text{O}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e  $Wt$  = massa do animal (kg).

Os dados de  $\dot{V}O_2$  são expressos em  $\text{mLO}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .



**FIGURA 3** - Ilustração do sistema de respirometria utilizado na obtenção dos dados de  $\dot{V}O_2$ ,  $\dot{V}_G$ ,  $f_R$ ,  $V_T$  e  $f_H$ . **a** - respirômetro, **b** - cânula para a medida da  $P_{eO_2}$ , **c** - cânula para a medida da  $P_sO_2$ , **d** - cânula bucal para a medida da  $P_{insp}O_2$ , **e** - cânula opercular para a medida da  $P_{exp}O_2$ , **f** - torneiras de 3 vias, **g** - eletrodos de  $O_2$ , **h** - analisadores de  $O_2$ , **i** - frasco de ajuste de fluxo, **j** - bomba de circulação de água, **l** - transdutor de pressão, **m** - amplificador de pressão, **n** - sistema de aquisição de dados em tempo real.

A  $\dot{V}_G$  foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\dot{V}_G = \frac{(P_{eO_2} - P_{sO_2}) \cdot \dot{V}_R}{Wt} = \frac{(P_{inspO_2} - P_{expO_2})}{Wt}$$

onde  $P_{inspO_2}$  = pressão parcial de  $O_2$  da água inspirada,  $P_{expO_2}$  = pressão parcial de  $O_2$  da água expirada. As medidas de  $P_{inspO_2}$  e  $P_{expO_2}$  foram efetuadas com o mesmo analisador de  $O_2$  acima descrito.

Os valores de  $\dot{V}_G$  estão expressos em  $mLH_2O.kg^{-1}.min^{-1}$ .

A frequência respiratória ( $f_R$ ) foi medida pelos registros da variação da pressão intra-bucal (cânula bucal conectada a um transdutor de pressão e este ao sistema de aquisição de dados - WinDaq - WinDaq/Lite Waveform Recording Software® – Dataq DI-194 Serial Port Data Acquisition Module), contando-se os picos de pressão positiva durante o ciclo respiratório, e expressa em  $resp.min^{-1}$ .

O volume ventilatório ( $V_T$ ) foi calculado dividindo-se a  $\dot{V}_G$  pela  $f_R$  e expresso em  $mLH_2O.kg^{-1}.resp^{-1}$ .

A extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) foi calculada por meio da seguinte equação:

$$EO_2 = 100 \cdot (P_{inspO_2} - P_{expO_2}) / P_iO_2$$

Os dados de  $EO_2$  estão expressos em %.

A frequência cardíaca ( $f_H$ ) foi registrada conectando-se dois eletrodos de ECG implantados nos peixes a um acoplador universal de um fisiógrafo Narco Narcotrace® 40 (Narco Biosystems®, Houston TX, USA) e seus sinais transferidos para um outro canal do sistema de aquisição de dados acima citado. Os valores de  $f_H$  foram obtidos pela contagem dos complexos QRS do ECG e expressos em bpm (batimentos por minuto).

Após recuperação cirúrgica “overnight” (~ 12 h) foram coletados os dados das variáveis cardiorrespiratórias em normóxia (140 mmHg) e, a seguir, os peixes foram submetidos à hipóxia gradual nas seguintes tensões de  $O_2$  ( $PwO_2$ ): 100, 70, 50 e 30 mmHg por 20 min em cada tensão. As diferentes tensões hipóxicas foram obtidas borbulhando-se  $N_2$  na água do tanque experimental e monitoradas constantemente por sifonamento pelas cânulas de polietileno para um analisador de  $O_2$  FAC 204 anteriormente descrito.

Estes experimentos permitiram estimar a  $PcO_2$  para esta espécie além da tensão de  $O_2$  em que os animais conseguem sobreviver sem acesso ao ar atmosférico.

### 3.5. Protocolo Experimental 4: Experimentos de Hipóxia com Acesso ao Ar Atmosférico - Respiração aérea

#### 3.5.1. Preparação dos Animais e Protocolo Experimental

Nestes experimentos, os animais ( $n = 9$ ;  $Wt = 600 \pm 55$  g) foram canulados (PE - 100) apenas na câmara bucal, na região do palato, para o registro da  $f_R$  e implantados os eletrodos de ECG para registro da  $f_H$ . A preparação deste experimento foi igual aos experimentos de respirometria com relação aos procedimentos cirúrgicos e recuperação pós-cirúrgica.

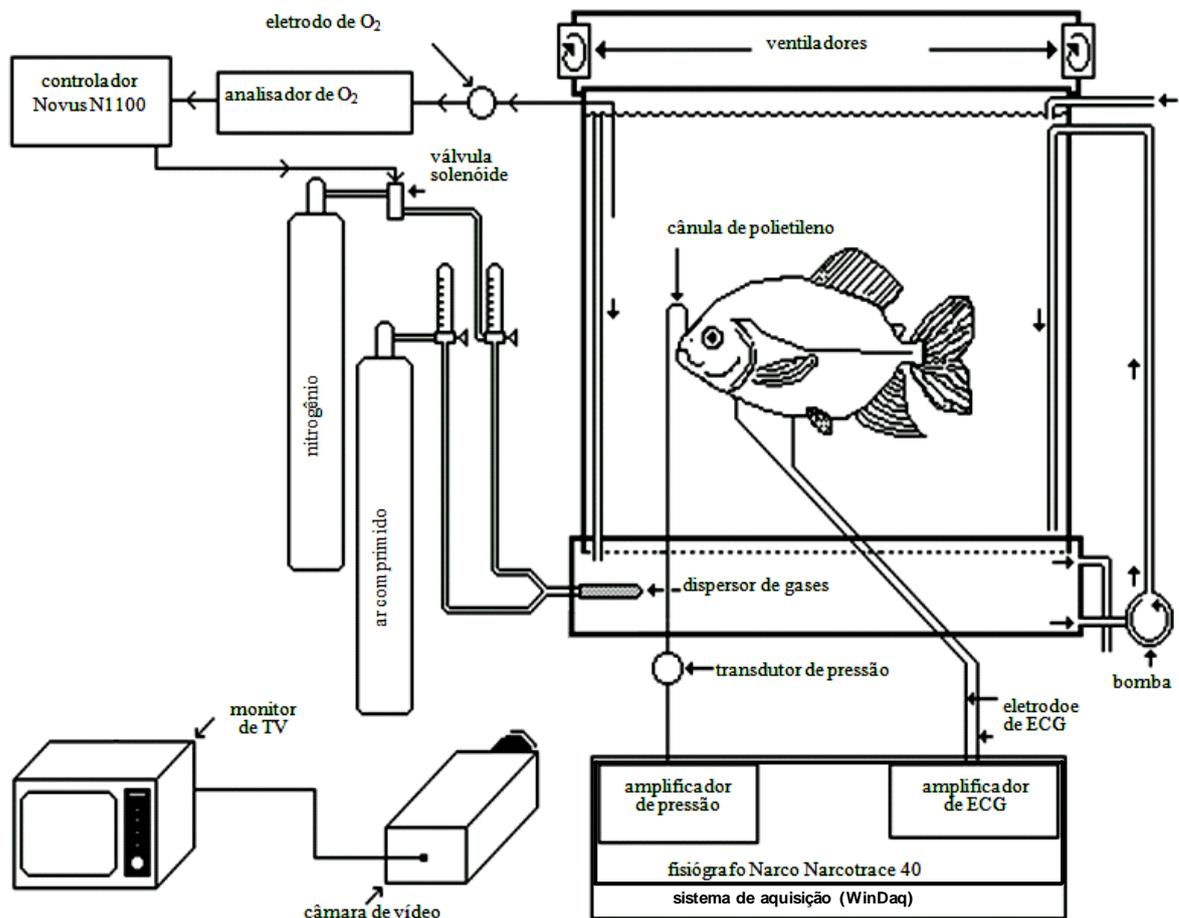
Foi utilizado uma câmara experimental que consiste de dois compartimentos sobrepostos, um inferior e outro superior, e um sistema de ventilação localizado acima do compartimento superior (Fig. 5). A água do compartimento inferior é constantemente bombeada para o superior e drenada novamente para o inferior através de um sifão, que tem por finalidade manter o nível constante da água no compartimento superior. Os diferentes níveis hipóxicos foram mantidos por borbulhamento de  $N_2$  no compartimento inferior, de forma que o compartimento superior sempre recebe água hipóxica. O sistema de ventilação tem por finalidade remover os excessos de  $N_2$  e manter a superfície da água em condições similares às que seriam encontradas na natureza (Fig. 5).

Os animais ficaram “soltos” neste sistema, o que permitiu livre acesso para a subida e tomada de ar atmosférico. Este sistema possui a parte frontal em acrílico transparente pela qual é possível quantificar a frequência de tomada de ar atmosférico ( $f_{RA} - RA \cdot h^{-1}$ ) pelo animal. A  $f_{RA}$  foi registrada pela contagem das subidas do animal, para a tomada de ar atmosférico, monitoradas por de uma câmera Fujika® – FK-586 C/B acoplada a um monitor de vídeo Broksonic® - CERTC- 2808 UL (Fig. 5).

A cânula bucal foi conectada a um transdutor de pressão de um amplificador e este ao sistema de aquisição de dados Dataq DI-194 de um microcomputador PC-IBM compatível. Isto permitiu o registro das variações de pressão intra-bucalis e a

contagem da  $f_R$  pelos picos de pressão positiva. Os registros de  $f_R$  e ECG foram gravados durante todo experimento, porém a coleta dos dados ocorreu antes e após 1 min a cada respiração aérea, e, ainda, para os dados de  $f_H$  foram coletados dados entre as RAs.

Tanto o monitor de vídeo, quanto o computador utilizado para registros, estavam localizados atrás do sistema, sendo que o animal não percebia a presença do observador, impedindo uma movimentação por estresse. Os peixes foram submetidos às seguintes tensões de  $O_2$  da água do tanque experimental: 140 (normóxia), 100, 70, 50, 30, 20 e 10 mmHg por 1 hora em cada tensão.



**FIGURA 4** - Ilustração do sistema experimental desenvolvido para animais de respiração aérea e utilizado na obtenção de dados de  $f_R$ ,  $f_{RA}$  e  $f_H$  do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, exposto a hipóxia gradual.

### 3.6. Análise Estatística

Inicialmente, utilizando-se os dados obtidos nos quatros experimentos, foram realizadas análises exploratórias por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a distribuição normal ajustava aos dados. Na etapa seguinte, foram realizadas análise de variância de uma entrada ou análise de variância simples “One-Way”, sendo que para o teste de hipótese de médias foi utilizado o teste de *Tukey*, para comparar a média de um tratamento com o controle, isto é, para identificar se houve diferença significativa entre o controle (normóxia –  $PwO_2 = 140$  mmHg) e o grupo experimental (as hipóxias graduais) foi utilizado o teste de *Dunnett*, para ambos os testes foi utilizado o nível de 5% de probabilidade.

Para estimar os valores da tensão crítica de oxigênio ( $PcO_2$ ) de *C. gariepinus* em função dos valores médios de  $\dot{V}O_2$ , foi utilizada regressão linear ( $y = a + bx$ ), cuja intersecção, quando projetada sobre o eixo das abcissas, resultou no valor da  $PcO_2$  (ver KALININ et al., 1999). Finalmente, para verificar a existência ou não de diferença significativa entre os pares de dados  $f_H$  e  $f_{RESP}$  das prés e pós respirações aéreas para a mesma tensão crítica de oxigênio foi utilizado o teste t de Student pareado (*Protocolo Experimental 4*). O software utilizado para análise foi o GraphPad Instat.

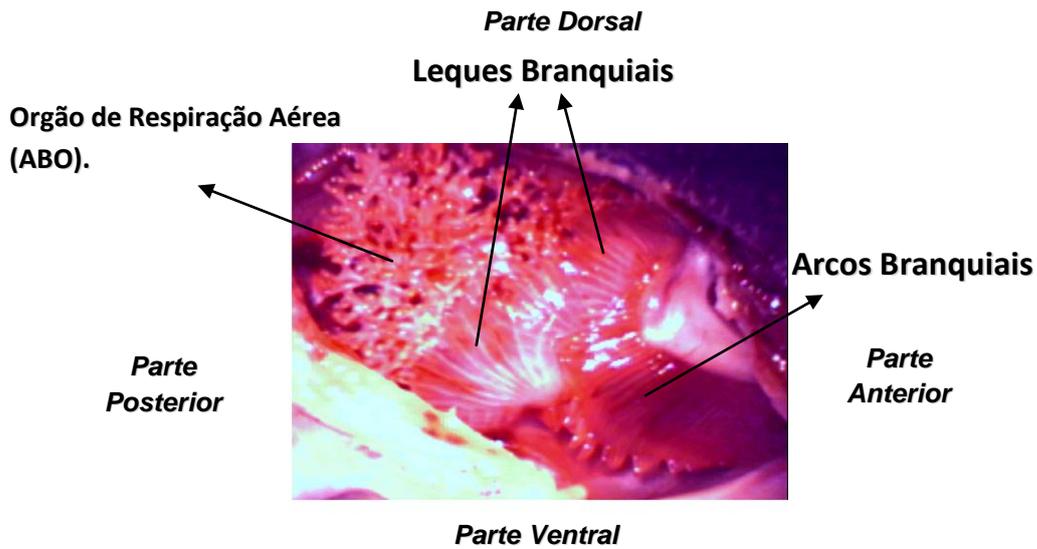
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Identificação das Estruturas morfo-funcionais de respiração de *Clarias gariepinus*

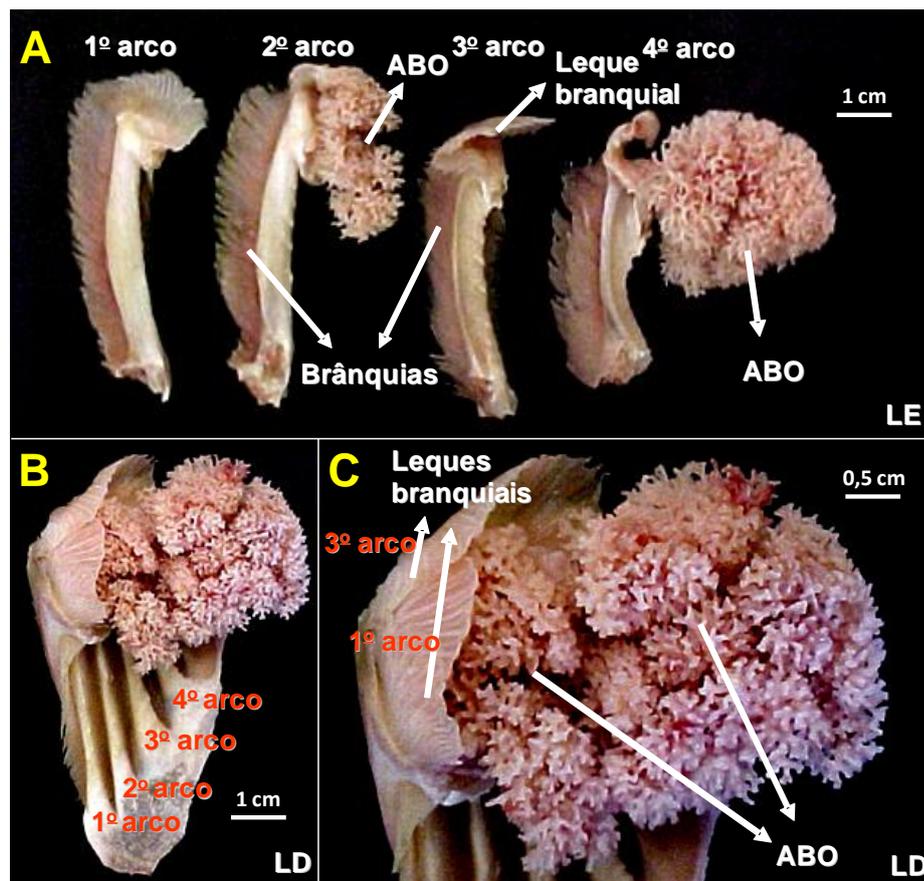
As figuras 5 e 6 apresentam fotografias da estrutura morfo-funcional de respiração de *C. gariepinus*. Na figura 5 é possível observar como o ABO é bem protegido pelos leques brânquias que ficam em contato direto com sua parte anterior impedindo seu contato com a água. A figura mostra que o ABO não fica compactado na câmara suprabranquial, o que preserva o seu arranjo arbóreo. Este formato do ABO, com grandes extensões (Fig. 7), proporciona uma maior área de superfície de troca-gasosa com o ar atmosférico.

Estes ABOs são semelhantes a de outros clariídeos, sendo extensões das extremidades posteriores dos 2<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> arcos branquiais (Fig. 7). Nesta espécie, a abertura de cada câmara suprabranquial pelos leques branquiais, que são extensões das últimos filamentos branquiais que se uniram. Eles funcionam como válvulas controlando a exalação e inalação do ar para a câmara suprabranquial. Em todos os arcos branquiais existem leques branquiais, porém são mais desenvolvidos no 1<sup>o</sup> e no 3<sup>o</sup> arcos e neste houve uma “torção” para melhor proteção dos ABO. Além disso, a figura mostra que nos 2<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> arcos branquiais os leques provavelmente são vestigiais devido aos formatos e tamanhos.

Pela da comparação anatômica da estrutura respiratória de *C. gariepinus* com a de outros clariídeos já estudados e detalhados na literatura, pode-se concluir que estas são similares a anatomia “superficial” deste gênero (MOUSSA, 1956, 1957; MUNSHI, 1961, 1976; SINGH *et al.*, 1982).



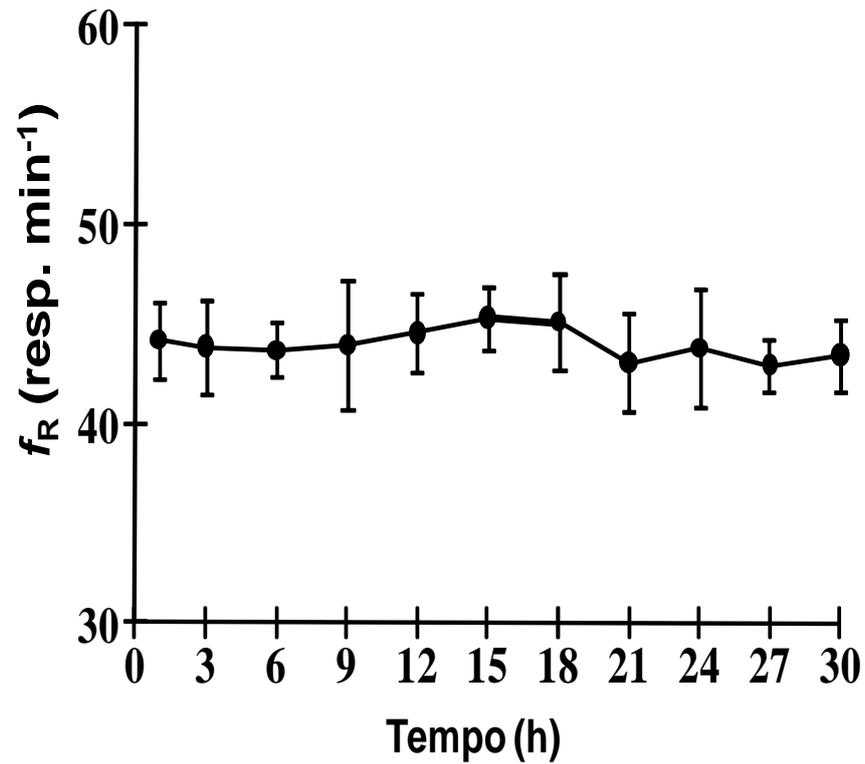
**FIGURA 5** - Fotografia da parte dorsal da câmara suprabranquial exposta mostrando as estruturas morfo-funcionais de respiração de um bagre-africano, *Clarias gariepinus* (480 g).



**FIGURA 6** - Fotografias das estruturas morfo-funcionais de respiração de um bagre-africano, *Clarias gariepinus* (~ 1.700 kg). **A**– Vista dos arcos branquiais separados; **B**– Vista dos arcos branquiais unidos; **C**– Vista aproximada dos leques branquiais e do ABO; LE – lado esquerdo, LD – lado direito.

#### 4.2. Respiração Aérea: “Obrigatória ou Facultativa?”

Os valores médios de frequência respiratória ( $f_R$ ) dos animais confinados na “gaiola” experimental, em normóxia e *sem* acesso ao ar atmosférico, são apresentados graficamente na figura 7. A análise desta figura revela que os animais mantiveram a  $f_R$  constante, em aproximadamente  $44, \pm 2,14 \text{ resp.min}^{-1}$ , durante as 30 horas de experimento. Comparando-se com outra espécie do mesmo gênero, *C. batrachus*, em normóxia e *sem* acesso ao ar apresentou um significativo aumento na  $f_R$  de 38 para  $50 \text{ resp.min}^{-1}$ . Além disso, após 6 a 8 h de experimento os animais começam a se esforçar para subir e tomar ar atmosférico (SINGH & HUGHES, 1971). Estas respostas de *C. batrachus* são comuns em teleósteos que apresentam um quadro hipoxêmico (McKenzie *et al.*, 1991). Devido *C. batrachus* necessitar da respiração aérea para suprir a demanda metabólica de que os tecidos necessitam, mesmo em normóxia, *C. batrachus* é considerado um respirador aéreo obrigatório (GRAHAM, 1997a). Diferentemente, outras espécies, como *C. macrocephalus*, apesar de conseguirem sobreviver sem acessar o ar atmosférico em normóxia, podem subir esporadicamente à superfície para tomadas de ar sendo, assim, classificadas como respiradoras aéreas facultativas contínuas (KRAMER, 1983). Este último comportamento é similar ao de *C. gariepinus*, pois tanto nos experimentos de respiração aérea, posteriormente comentados, quanto nos próprios tanques de aclimatação, é possível observar os animais respirando ar mesmo em normóxia (Fig. 15), e, além disso, quando submersos durante as 30 h de experimento *sem* acesso ao ar atmosférico e em normóxia *C. gariepinus* parece conseguir extrair o  $O_2$  necessário apenas pelas branquiais, sem aumentar a  $f_R$  (Fig. 8) ou hiperventilar suas brânquias. Desta forma, *C. gariepinus* consegue manter o metabolismo aeróbico sem necessidade do uso do ABO quando em condições normóxicas.



**FIGURA 7** - Respostas da frequência respiratória ( $f_R$  – resp.min<sup>-1</sup>) de *Clarias gariepinus* (n = 7; Wt = 350 ± 15g) sem acesso ao ar atmosférico e submerso em água normóxica ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2 > 130$  mmHg) durante 30 h. Média ± S.E.M.

#### 4.3. Experimento de Hipóxia *sem* Acesso ao Ar Atmosférico

Nestes experimentos, a  $P_wO_2$  foi reduzida de 140 mmHg para 100, 70, 50 e 30 mmHg. Os dados estão apresentados na tabela 1 e nas figuras de 8 a 12 como médias  $\pm$  S.E.M. e em função da água inspirada ( $P_{insp}O_2$  - mmHg), que é a  $PO_2$  da água dentro do respirômetro.

##### 4.3.1. Consumo de $O_2$ , Tensão Crítica de $O_2$ e Extração de $O_2$

Os valores de  $\dot{V}O_2$  do bagre africano frente à hipóxia gradual estão representados individualmente no gráfico da figura 8, juntamente com o gráfico das médias de  $EO_2$ . Durante normóxia, *C. gariepinus* apresentou médias de  $\dot{V}O_2$  de  $76,0 \pm 14,2$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$  e  $EO_2$  de  $48,9 \pm 3,03$  %.

A  $PcO_2$  foi estimada pela da intersecção da reta das abscissas, que passa por entre os pontos compreendidos entre as  $P_{insp}O_2$  de 123,6 e 62,7 mmHg e que foi ajustada pela média dos valores de  $\dot{V}O_2$  destas tensões ( $68,0$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ , valores estatisticamente iguais), e a reta de regressão ( $y = a + bx$ ) que passa pelos pontos de valores estatisticamente inferiores, plotados abaixo da  $P_{insp}O_2$  de 45 mmHg. A intersecção destas retas representa o ponto de inflexão abaixo do qual a espécie torna-se incapaz de acionar eficientemente os mecanismos homeostáticos carido-respiratórios, ou seja, a tensão (ou pressão) crítica de  $O_2$ , a  $PcO_2$ . Assim, pode-se dizer que a  $PcO_2$  de *C. gariepinus* é  $\sim 55$  mmHg.

A relação entre a  $\dot{V}O_2$  e a  $P_{insp}O_2$  é válida para várias espécies de teleósteos. Em normóxia, *C. gariepinus* apresentou uma média na  $\dot{V}O_2$  de  $76,0 \pm 0,68$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$  que se encontra entre os valores dos outros teleósteos tanto de respiração exclusivamente aquática quanto os de respiração bimodal (tabela 2). Ao contrário, a  $PcO_2$  de (55 mmHg) de *C. gariepinus* é a mais elevada quando comparada tanto com os teleósteos de respiração exclusivamente aquática quanto com os de respiração bimodal (silurimorfes e não-silurimorfes) como mostrado a tabela 2. Desta forma, *Clarias gariepinus* não consegue manter as demandas de oxigênio necessárias abaixo de 39,3 % de oxigênio na água ( $PcO_2 = 55$  mmHg) o que é verificado pela diminuição linear da  $\dot{V}O_2$  (Fig. 9), chegando a uma média de  $26,5 \pm 1,17$  mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$  na  $P_{i}O_2$  de 28,0 mmHg. Nesta hipóxia severa, os animais

começam a apresentar comportamentos de estresse e hiperatividade, na tentativa de alcançar a superfície da água para respirar ar, o que impede a continuação do protocolo experimental. Segundo HOCHACHKA (1980), a primeira escolha de um teleósteo frente a hipóxia seria fugir dela, porém como tal condição é inevitável no experimento, e, também para peixes de respiração exclusivamente aquática, a estratégia comportamental é a de “esperar para ver”, ou seja, redução máxima da sua atividade, respondendo “indolentemente” aos distúrbios externos. Isto aconteceu com *C. gariepinus* e sugere que esta espécie é mais dependente do ar atmosférico do que a maioria dos teleósteos de respiração bimodal.

A diminuição na  $\dot{V}O_2$  está estritamente relacionada tanto com o oxigênio disponível no ambiente aquático quanto com a eficiência da extração de oxigênio pelas brânquias do animal. Durante normóxia, *C. gariepinus* mostrou uma  $EO_2$  baixa (49%) em relação aos teleósteos de respiração exclusivamente aquática, como mostrado na tabela 2. FERNANDES et al. (1994) atribuem esta elevada  $EO_2$  dos respiradores exclusivamente aquáticos às suas grandes áreas superficiais de troca gasosa como, por exemplo, *Hoplias malabaricus* (83%), *Hoplias lacerdae* (78%) and *Piaractus mesopotamicus* (78%) cujas brânquias apresentam uma ampla superfície de troca gasosa (RANTIN et al., 1992; FERNANDES et al., 1994; AGUIAR et al., 2001). Contrariamente, peixes de respiração bimodal, por possuírem órgão de respiração acessória para tomada de  $O_2$  no ar atmosférico, geralmente não apresentam grandes áreas de troca-gasosa para extração de  $O_2$  da corrente ventilatória aquática como, por exemplo, *Hypostomus regani* ( $EO_2 = 40\%$ ) e *Hoplerythrinus unitaeniatus* ( $EO_2 = 71\%$ ) que possuem áreas branquiais bem menos amplas do que as espécies acima citadas (FERNANDES et al. 1994; PERNA & FERNANDES 1996). Além disso, dois clariídeos já estudados, *C. batrachus* e *C. mossambicus* (= *C. gariepinus*) possuem área branquial similar à de *H regani* e *H unitaeniatus* (TAMURA & MORIYAMA 1976). Desta forma, apesar de *C. gariepinus* apresentar uma baixa  $EO_2$  devido, provavelmente, a sua pequena área branquial, suas brânquias são suficientemente eficientes para manter uma adequada  $\dot{V}O_2$  em normóxia, podendo ser classificado como uma espécie respiradora aérea e oxirreguladora, segundo a definição de GRAHAM (1997a).

Durante hipóxia gradual ocorreu uma diminuição progressiva da  $EO_2$  alcançando valores significativos mesmo antes da  $PcO_2$ . Em hipóxia mais severa

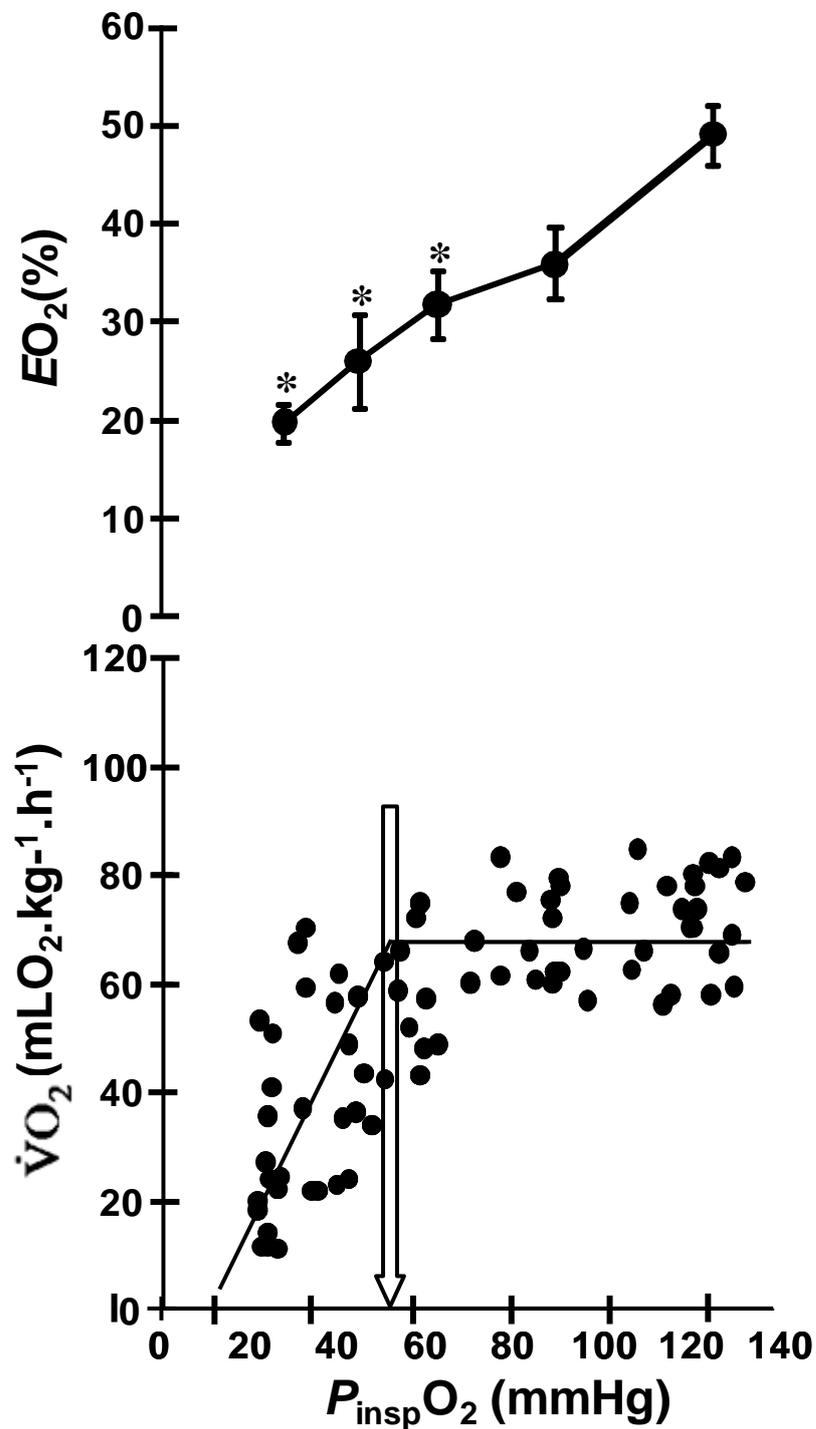
( $P_iO_2 = 28$  mmHg) a  $EO_2$  alcançou valores menores ( $19,6 \pm 1,91$  %). Estes dados de  $EO_2$  e  $PcO_2$  sugerem que *C. gariepinus* é uma das espécies que possui a maior dependência do ABO entre as espécies de respiração aérea facultativa para sobreviver em condições hipóxicas.

**TABELA 1** - Valores médios ( $\pm$  S.E.M.) de tensão de  $O_2$  da água inspirada ( $P_{\text{insp}}O_2$  – mmHg) e dos parâmetros cardiopulmonares obtidos de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual ( $PwO_2 = 140, 100, 70, 50$  e  $30$  mmHg) sem acesso ao ar atmosférico.

$P_{\text{insp}}O_2$ (mmHg)	$\dot{V}O_2$ (mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ )	$\dot{V}_G$ (mLH $_2$ O.kg $^{-1}$ .min $^{-1}$ )	$V_T$ (mLH $_2$ O.kg $^{-1}$ .resp $^{-1}$ )	$f_R$ (resp.min $^{-1}$ )	$EO_2$ (%)	$f_H$ (bpm)
123,6 $\pm$ 1,60	76,0 $\pm$ 0,6	768,8 $\pm$ 25,3	11,7 $\pm$ 0,9	38,8 $\pm$ 1,	48,9 $\pm$ 3,0	43,4 $\pm$ 0,4
88,6 $\pm$ 1,30	69,6 $\pm$ 0,7	1157,5 $\pm$ 30,7	24,3 $\pm$ 0,6	42,5 $\pm$ 0,6	35,8 $\pm$ 3,5	37,7 $\pm$ 1,2
62,7 $\pm$ 1,30	56,8 $\pm$ 0,8	1425,0 $\pm$ 53,0	26,6 $\pm$ 1,1	49,5 $\pm$ 1,3	31,6 $\pm$ 3,4	32,5 $\pm$ 1,3
45,0 $\pm$ 1,50	44,7 $\pm$ 1,1	1456,3 $\pm$ 58,1	29,6 $\pm$ 1,0	51,2 $\pm$ 1,0	25,8 $\pm$ 4,8	23,7 $\pm$ 2,2
28,0 $\pm$ 0,50	26,5 $\pm$ 1,1	1545,7 $\pm$ 63,5	33,9 $\pm$ 0,8	57,2 $\pm$ 1,4	19,6 $\pm$ 1,9	19,2 $\pm$ 3,0

**TABELA 2** - Comparação dos valores de tensão crítica de oxigênio ( $PcO_2$ ), consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e extração de oxigênio ( $EO_2$ ) de *Clarias gariepinus* com os valores de outros respiradores bimodais siluriformes e não-siluriformes, e teleósteos de respiração exclusivamente aquática durante normóxia.

	Espécies	$PcO_2$ (mmHg)	$\dot{V}O_2$ (mLO <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$EO_2$ (%)	Autor	
<u>Respiração bimodal</u>	Siluriformes	Tamoatá, <i>Hoplosternum littorale</i>	50	77	-	Affonso & Rantin, 2005
		Cascudo pintado, <i>Hypostomus regani</i>	34	~ 40	~ 20	Mattias et al., 1998
		Cascudo preto, <i>Rhinelepis strigosa</i>	24	22	42	Takasusuki et al., 1998
		Acari, <i>Hypostomus plecostomus</i>	33	~ 53	-	Perna & Fernandes, 1996
		Walking catfish, <i>Clarias lazera</i> (~1,8kg)	-	-	83	Ar & Zacks, 1989
	Não - siluriforme	Ancistrus chagresi	-	84	79	Graham, 1983
		Stinging catfish, <i>Heteropneustes fossilis</i>	50	63	-	Hughes & Singh, 1971
		<b>Bagre-africano, <i>Clarias gariepinus</i></b>	<b>55</b>	<b>76</b>	<b>49</b>	<b>presente estudo</b>
		Jeju, <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	40	~ 109	71	Oliveira et al., 2004
		Blotched snakehead, <i>Channa maculata</i>	40	-	-	Yu & Woo, 1985
<u>Respiração exclusivamente aquática</u>	Muçum, <i>Synbranchus marmoratus</i>	40	~ 27	67	Bicudo & Johansen, 1979	
	Saltona, <i>Piabucina festae</i>	25	-	-	Graham et. al., 1977	
	Dourado, <i>Salminus maxillosus</i>	42	69	75	Souza et al., 2001	
	Pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i>	34	73	78	Rantin et al., 1998	
	Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	18	56	83	Fernandes & Rantin, 1994	
	Traíra, <i>Hoplias malabaricus</i>	20	38	83	Rantin et al., 1992	
	Trairão, <i>Hoplias lacerdae</i>	35	58	78	Rantin et al., 1992	
Carpa, <i>Cyprinus carpio</i>	-	-	90	Lomholt & Johansen, 1979		



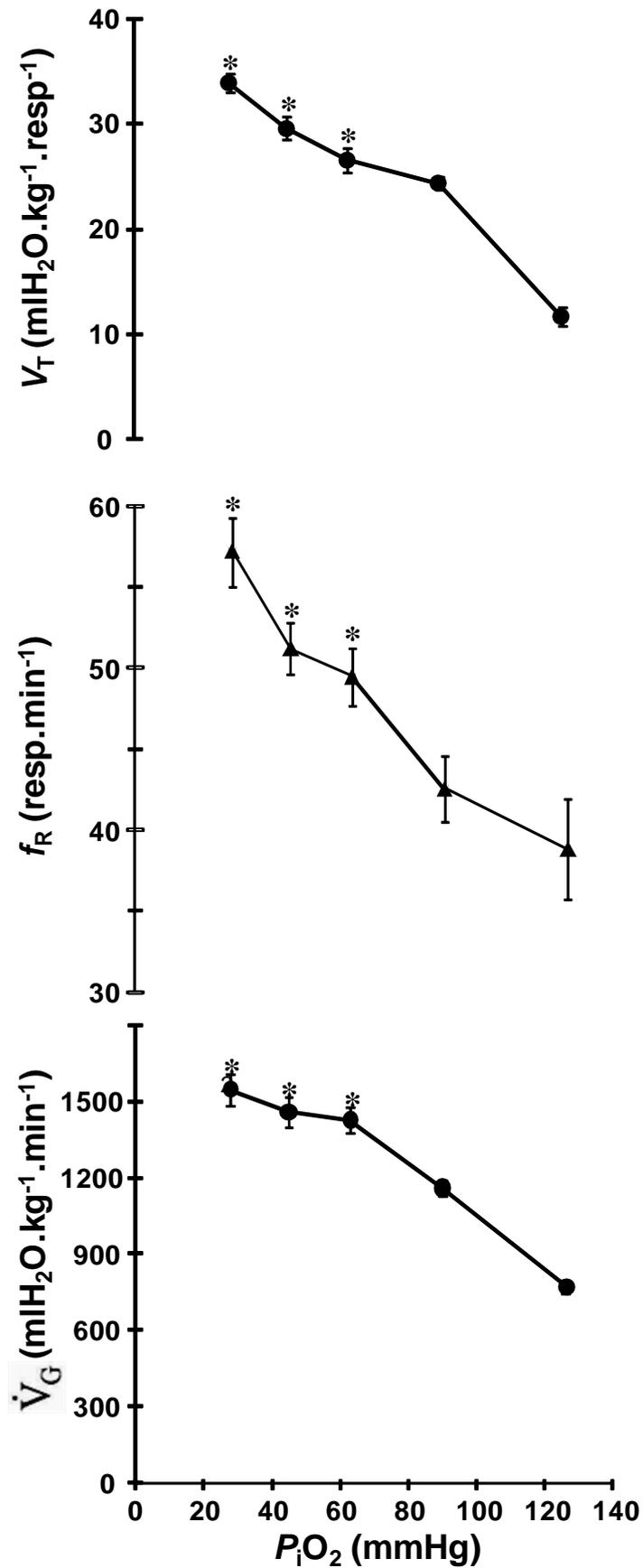
**FIGURA 8** - Efeito da redução das tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_{\text{insp}}O_2$ ) na extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$  - %) e na tomada de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  -  $\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual sem acesso ao ar atmosférico. A seta indica a tensão crítica de oxigênio ( $P_{cO_2} \sim 55$  mmHg). \* - indica diferença significativa dos valores em normóxia. Média  $\pm$  S.E.M.;  $n = 13$  ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2. Ventilação Branquial, Volume Ventilatório e Frequência Respiratória

Os valores da frequência respiratória ( $f_R$ ), do volume ventilatório ( $V_T$ ) e da ventilação braquial ( $\dot{V}_G$ ) estão representados na figura 9. A análise destes gráficos revela que houve um aumento progressivo nos dois parâmetros ventilatórios ( $V_T$  e  $f_R$ ) durante a hipóxia gradual.

Durante condições hipóxicas, a maioria dos peixes de respiração exclusivamente aquática aumenta tanto a  $\dot{V}_G$  quanto a  $f_R$  (HUGHES, 1973; HOLENTON, 1980; RANDALL, 1982), porém em peixes de respiração aérea tais condições podem afetar a ventilação aquática de vários modos. *Neoceratodus*, *Synbranchus* e *Lepisosteus* mantêm a frequência de ventilação branquial constante, enquanto *Erpitoichthys*, *Misgurnus*, *Hoplosternum*, *Brochis*, *Piabucina* diminuem consideravelmente a ventilação branquial. Ao contrário, *Potopterus*, *Polypterus*, *Heteropneustes*, *Umbra*, e *Amia*, assim como nos clariídeos já estudados, hiperventilam as brânquias até um limiar da  $PO_2$  onde começa a tomada de ar atmosférico, o que facilita a tomada de  $O_2$  através do órgãos de respiração acessória (GRAHAM, 1977). A figura 9 revela que o comportamento respiratório de *C. gariepinus*, durante o experimento de hipóxia *sem* acesso ao ar atmosférico, apresentou um aumento significativo da  $\dot{V}_G$  seguindo o padrão do gênero.

Desde o início das tensões de hipóxia,  $P_{insp}O_2 = 88,6$  mmHg, o aumento da  $\dot{V}_G$  ocorreu predominantemente por um maior aumento do  $V_T$  do que da  $f_R$  sendo estes de, respectivamente, 107,7 e 9,6 % com relação aos valores normóxicos. Em hipóxia severa ( $P_{insp}O_2 = 28$  mmHg), o  $V_T$  e a  $f_R$  chegam valores máximos de, respectivamente, 189,7 % e 47,2 % comparando-se com os valores normóxicos. Segundo RANTIN *et al.* (1992), este comportamento respiratório, em condições hipóxicas, pode ser considerado uma estratégia de redução do custo energético. Este menor gasto energético está relacionado a uma velocidade constante de contração muscular, sendo, portanto, energeticamente menos dispendiosa do que uma elevada frequência de contração, como no caso da  $f_R$ . Esta é limitada pelo trabalho contra uma grande viscosidade interna dos músculos operculares, além da viscosidade da água (RANTIN *et al.*, 1992).



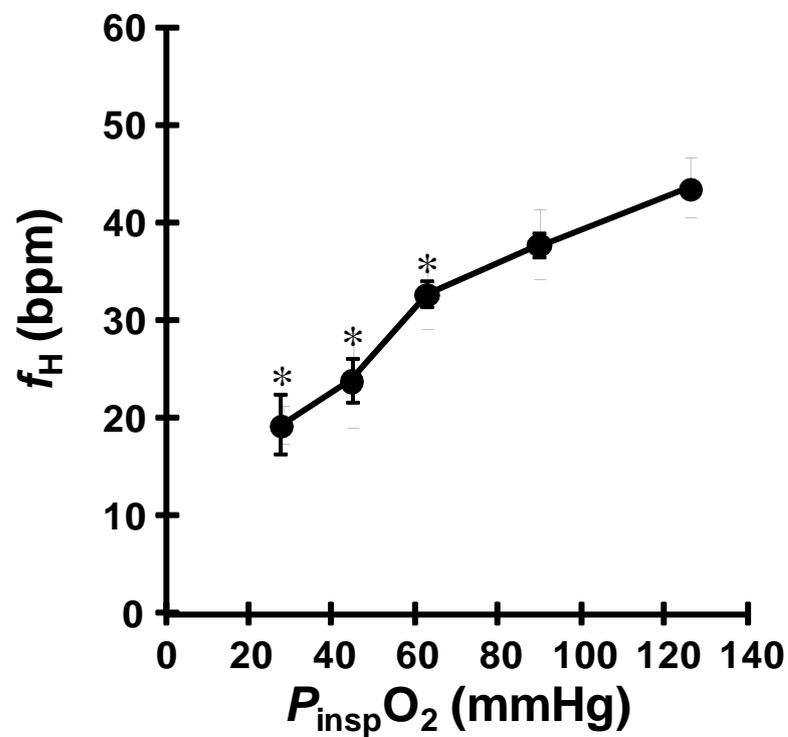
**FIGURA 9** - Relações entre a frequência respiratória ( $f_R$  –  $resp \cdot min^{-1}$ ), o volume ventilatório ( $V_T$  –  $mLH_2O \cdot kg^{-1} \cdot resp^{-1}$ ) e a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  -  $mLH_2O \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ ) e as tensões de água inspirada ( $P_{insp}O_2$  - mmHg) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual sem acesso ao ar atmosférico. ). \* - indica diferença significativa dos valores em normóxia. Média  $\pm$  S.E.M.;  $n = 13$  ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3.3. Frequência Cardíaca

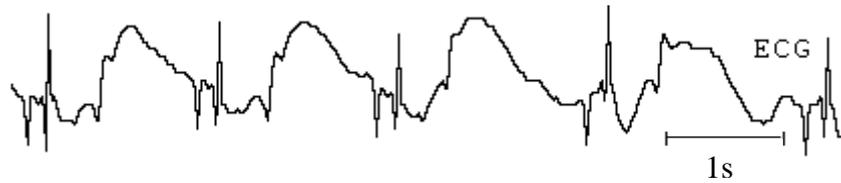
Os valores da frequência cardíaca ( $f_H$ ) estão representados na figura 10. A análise do gráfico revela que houve uma diminuição progressiva dos batimentos cardíacos durante hipóxia.

O bagre-africano manteve constante a  $f_H$ , em aproximadamente 37 – 44 bpm, até uma  $P_{\text{insp}}\text{O}_2$  de 88 mmHg, abaixo da qual o animal apresentou uma bradicardia significativa chegando a  $19,2 \pm 3,0$  bpm na menor  $P_{\text{insp}}\text{O}_2$  (28 mmHg). Esta resposta bradicárdica hipóxica *sem* acesso ao ar atmosférico é desenvolvida também por outros teleósteos, porém seu significado fisiológico ainda não é compreendido totalmente. Segundo FARREL (1984), uma resposta bradicárdica permite um maior tempo de permanência do sangue dentro do ventrículo, proporcionando uma maior extração de  $\text{O}_2$  pelo interior do miocárdio. Além disso, a bradicardia é importante para aumentar a eficiência na transferência de  $\text{O}_2$  da água para o animal através das próprias brânquias proporcionado por um sincronismo cardiorrespiratório apropriado. (RANDALL, 1982; FRITSCHÉ & NILSSON, 1989). Ainda, segundo TAYLOR et al. (1999), a bradicardia hipóxica é considerada uma resposta protetora ao músculo cardíaco, pois uma elevada  $f_H$  durante hipóxia conduziria o órgão a uma atividade anaeróbia diminuindo a eficiência do trabalho do mesmo.

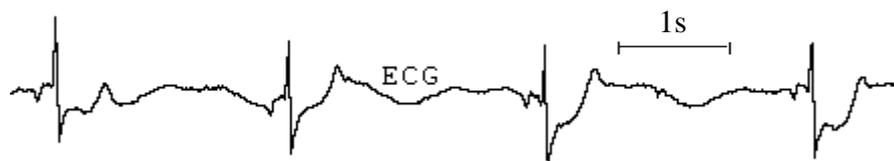
Muitos estudos com teleósteos mostram que existe uma relação entre a bradicardia e a  $P_{\text{CO}_2}$ , como, por exemplo, *Hoplias malabaricus* e *H. lacerdae* (RANTIN et al., 1993), *Piaractus mesopotamicus* (RANTIN et al., 1998) e *Salminus maxillosus* (SOUZA et al. 2001) e, também, o respirador aéreo facultativo *Hoplerythrinus unitaeniatus* (OLIVEIRA et al. 2004). Esta relação pode ser aplicada também para *Clarias gariepinus*, pois esta espécie desenvolveu uma bradicardia significativa em 62,7 mmHg, uma tensão de  $\text{O}_2$  próxima a  $P_{\text{CO}_2}$ .



**FIGURA 10** - Relações entre a frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) e as tensões de  $\text{O}_2$  da água inspirada ( $P_{\text{insp}}\text{O}_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, em hipóxia gradual sem acesso ao ar atmosférico. ). \* - indica diferença significativa em relação aos valores normóxicos. Média  $\pm$  S.E.M.;  $n = 13$  ( $P \leq 0,05$ ).



**FIGURA 11** - Registro dos complexos QRS do ECG de *Clarias gariepinus* em normóxia ( $P_{eO_2} = 140$  mmHg) e sem acesso ao ar atmosférico para obtenção dos valores da  $f_H$  (bpm).



**FIGURA 12** - Registro dos complexos QRS do ECG de *Clarias gariepinus* em hipóxia severa ( $P_{eO_2} = 30$  mmHg) e sem acesso ao ar atmosférico para obtenção dos valores da  $f_H$  (bpm). Observa-se um aumento no intervalo R-R quando comparado ao registro da figura anterior.

#### 4.4. Experimento de Hipóxia *com* Acesso ao Ar Atmosférico

Para os experimentos de respiração aérea utilizou-se a câmara experimental mostrada na Fig. 5 em que os animais ficam soltos para tomar ar atmosférico quando necessitarem. Os dados estão apresentados na tabela 3 e nas figuras de 13 a 16, como médias  $\pm$  S.E.M. e em função da  $PO_2$  da água da câmara experimental ( $P_wO_2$ ) que, neste caso, é igual à  $PO_2$  da água inspirada ( $P_{insp}O_2$ ).

Quando *C. gariepinus* é mantido em normóxia *com* acesso ao ar atmosférico, ele permanece no fundo da câmara experimental, alternando longos períodos de inatividade com poucos movimentos.

##### 4.4.1. Frequência Respiração Aquática e Frequência de Respiração Aérea

Os valores de  $f_R$  em função da hipóxia gradual do bagre-africano, *C. gariepinus*, estão apresentados na figura 13. Em condições de normóxia, *C. gariepinus* apresentou uma  $f_R$  praticamente constante ( $\sim 30$  resp.  $\text{min}^{-1}$ ) e durante hipóxia gradual não houve diferença significativa entre os valores de  $f_R$  pré e pós-RA, apenas pequenas oscilações entre estas. Porém, ao se comparar os valores pré e pós-RA com os respectivos valores normóxicos (controle) foi verificada diferença significativa nas menores tensões de  $O_2$  ( $P_wO_2 = 20$  e  $10$  mmHg), em que o bagre-africano apresentou uma diminuição da respiração branquial. Esta diminuição da  $f_R$  sugere que o bagre africano está em processo de redução de custos energéticos decorrentes da ventilação branquial. Além disso, esta estratégia sugere uma maior dependência da extração de  $O_2$  pela respiração aérea do que pela respiração branquial. Esta hipoventilação, comum a muitos teleósteos de respiração bimodal em hipóxia severa, também poderia evitar a difusão do  $O_2$  do sangue arterial para a água que banha as lamelas secundárias (RANTIN *et al.*, 1992).

A frequência de respiração aérea ( $f_{RA}$ ) em resposta a hipóxia gradual está apresentada na figura 14. As respirações aéreas ocorrem em todas as  $P_wO_2$ , porém apenas quatro animais subiram à superfície aquática para tomada de ar atmosférico em  $P_wO_2 > 70$  mmHg, sendo de  $\sim 2,0 \pm 0,69$  RA. $\text{h}^{-1}$ , isto é, uma respiração a aproximadamente cada 28 - 30 min. Este comportamento de respiração aérea mesmo em normóxia foi observado também nos tanques de aclimatação e permite classificar *Clarias gariepinus* como um respirador aéreo facultativo *contínuo*,

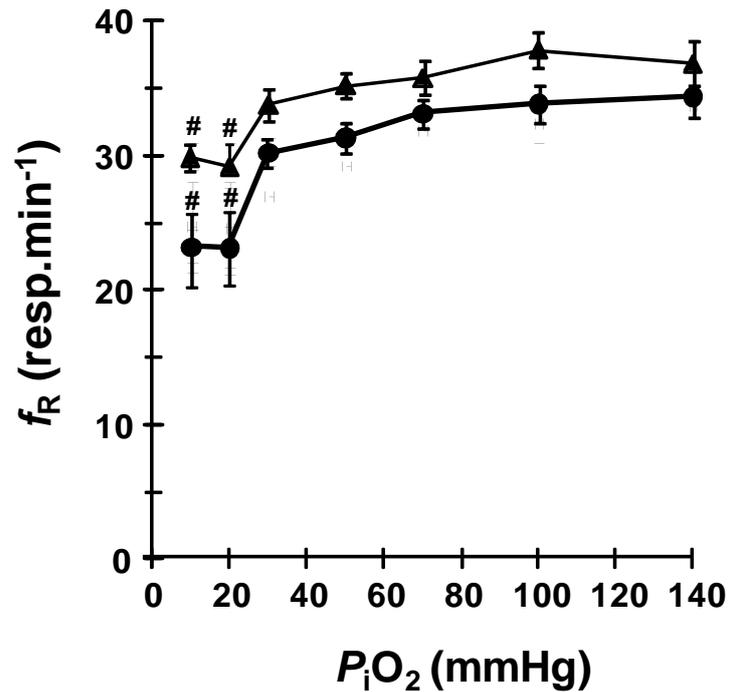
segundo Graham (1997a).

A  $f_{RA}$  aumentou progressivamente com a diminuição da  $P_wO_2$ . Abaixo da  $PcO_2$  o bagre mostrou valores de  $f_{RA}$  significativamente mais elevados do que os de normóxia. Em hipóxia severa ( $P_wO_2 = 10$  mmHg), a  $f_{RA}$  do *C. gariepinus* atingiu valores máximos, da ordem de  $11,50 \pm 2,33$  RA.h<sup>-1</sup>. Isto significa aproximadamente uma respiração aérea a cada 4 - 7 min. Adicionalmente, demonstra que a extração branquial de O<sub>2</sub> não está sendo suficiente para a manutenção de seu metabolismo aeróbico e, portanto, o bagre necessita acionar seu mecanismo acessório de respiração aérea.

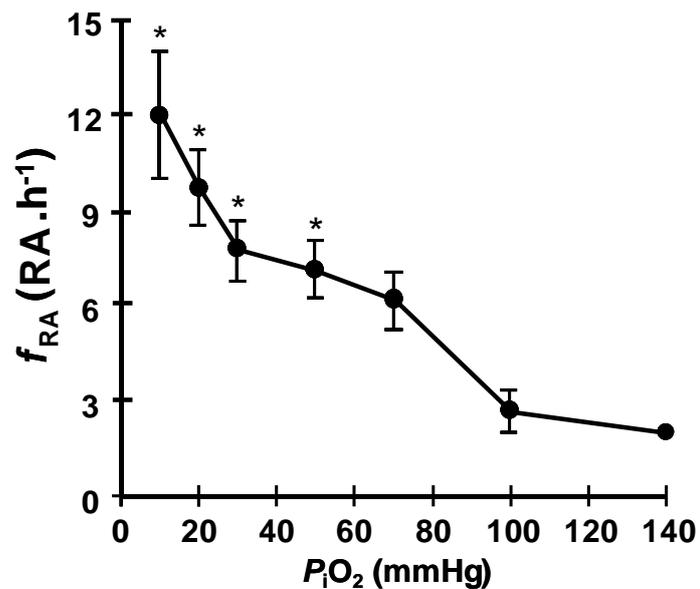
Comparando-se *C. gariepinus* com *C. batrachus*, este último demonstra uma respiração aérea a cada 15 s a 3 min em hipóxia severa (~ 5 – 10 % de O<sub>2</sub> ou ~ 7,5 - 15 mmHg; SINGH & HUGHES, 1971). Esta menor  $f_{RA}$  de *C. gariepinus* sugere que as brânquias desta espécie são mais eficientes na tomada de O<sub>2</sub> em hipóxia do que as de *C. batrachus*, que é um respirador aéreo obrigatório. Por outro lado, provavelmente o ABO de *Clarias batrachus* deve ser mais eficiente na obtenção do O<sub>2</sub> atmosférico do que o ABO de *C. gariepinus*.

**TABELA 3.** Valores médios ( $\pm$  S.E.M.) dos parâmetros cardiorrespiratórios de *Clarias gariepinus*, com acesso ao ar atmosférico, durante hipóxia gradual ( $P_wO_2 = 140, 100, 70, 50, 30$  e  $20$  e  $10$  mmHg), e porcentagem da diferença pré e pós-respiração aérea (pré-RA e pós-RA) em cada tensão.

$P_wO_2$ (mmHg)	$f_{RA}$ (ra.h <sup>-1</sup> )	Frequência respiratória (resp.min <sup>-1</sup> )			Frequência cardíaca (bpm)		
		pré-RA	pós-RA	%	pré-RA	pós-RA	%
140	2,0 $\pm$ 0,69	34,4 $\pm$ 1,69	36,9 $\pm$ 1,64	+ 7,2	42,9 $\pm$ 1,65	61,8 $\pm$ 3,24	+ 44,05
100	3,1 $\pm$ 0,79	33,8 $\pm$ 1,36	37,9 $\pm$ 1,35	+ 12,1	39,6 $\pm$ 3,92	58,0 $\pm$ 3,33	+ 46,46
70	5,0 $\pm$ 0,78	33,2 $\pm$ 1,04	35,8 $\pm$ 1,21	+ 7,8	34,7 $\pm$ 2,38	53,8 $\pm$ 2,29	+ 55,04
50	5,9 $\pm$ 0,75	31,3 $\pm$ 1,17	35,2 $\pm$ 0,94	+ 12,4	35,1 $\pm$ 2,49	53,8 $\pm$ 2,24	+ 53,27
30	8,0 $\pm$ 1,00	30,2 $\pm$ 1,07	33,8 $\pm$ 1,18	+ 11,9	38,3 $\pm$ 3,26	58,3 $\pm$ 3,27	+ 52,21
20	9,1 $\pm$ 1,65	23,1 $\pm$ 1,53	29,2 $\pm$ 1,61	+ 26,4	29,2 $\pm$ 3,82	49,7 $\pm$ 4,84	+ 70,20
10	11,5 $\pm$ 2,33	23,0 $\pm$ 1,18	29,9 $\pm$ 0,97	+ 30,0	30,4 $\pm$ 3,20	52,1 $\pm$ 2,94	+ 71,38



**FIGURA 13** - Relações entre a frequência respiratória ( $f_R$  – resp.min<sup>-1</sup>) pré (●) e pós (▲) respiração aérea e as tensões de O<sub>2</sub> inspirada ( $P_{insp}O_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, durante hipóxia gradual com acesso ao ar atmosférico.. # - indica diferença significativa com relação aos valores normóxicos. Médias  $\pm$  S.E.M.; n = 9 ( $P \leq 0,05$ ).



**FIGURA 14** - Relações entre a frequência de respiração aérea ( $f_{RA}$  – RA.h<sup>-1</sup>) e as tensões da água inspirada ( $P_iO_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, durante hipóxia gradual com acesso ao ar atmosférico. ). \* - indica diferença significativa com relação aos valores normóxicos. Média  $\pm$  S.E.M.; n = 9 ( $P \leq 0,05$ ).

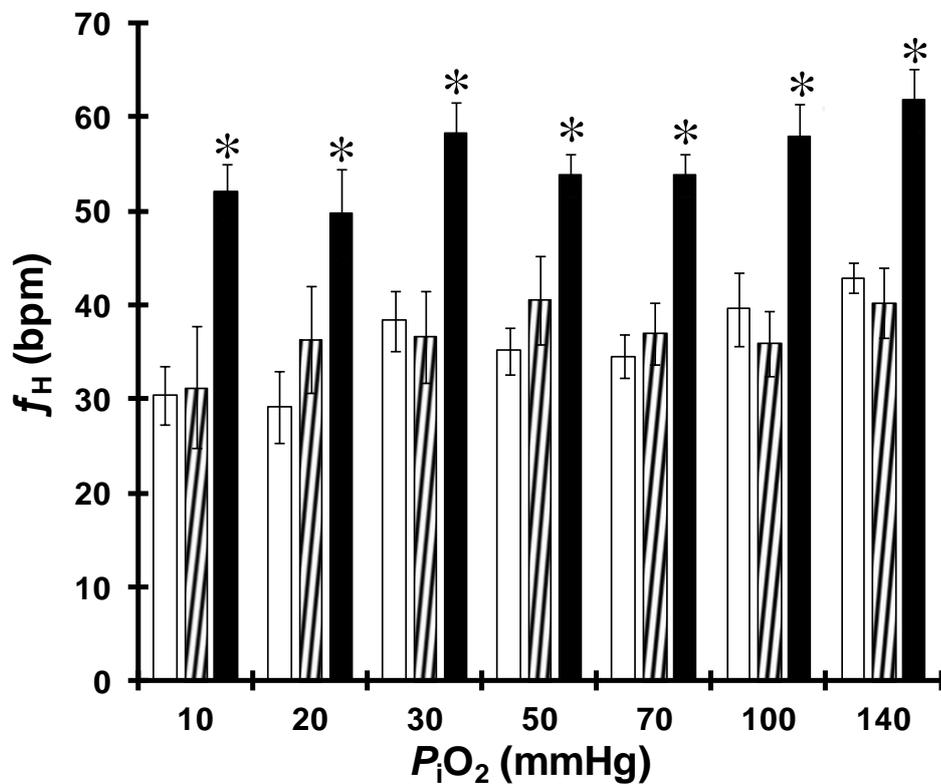
#### 4.4.2. Frequência Cardíaca

A frequência cardíaca está representada em gráfico de barras figura 15. Os dados foram coletados 1 min antes e após cada respiração aérea (RA) e a análise estatística foi feita tanto entre os valores de  $f_H$  pré e pós-RA com seus respectivos valores normóxicos, quanto entre os valores de  $f_H$  pré e pós-RA de uma mesma  $P_wO_2$ .

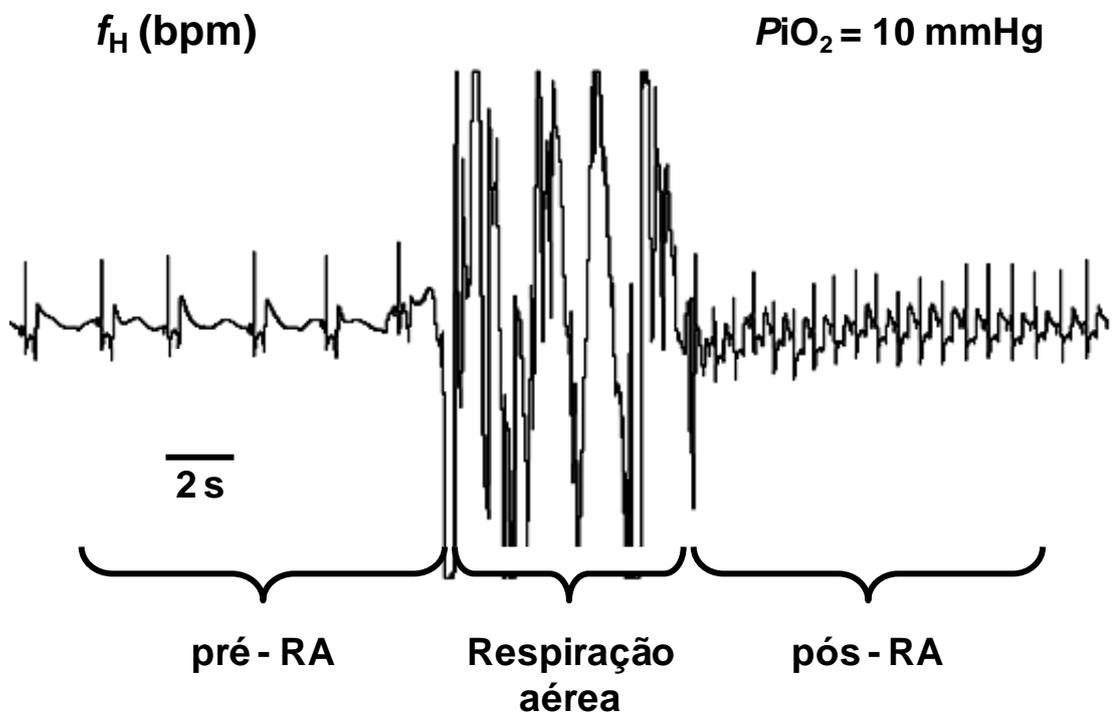
Quando *C. gariepinus* foi exposto à hipóxia com acesso ao ar atmosférico, o bagre apresentou bradicardia anterior às RAs, como um respirador exclusivamente aquático, e taquicardia logo após as RAs, sendo esta uma característica comum apresentada por respiradores aéreos expostos à hipóxia (Fig. 17 e Tab.4). O primeiro relato deste aumento pronunciado na frequência cardíaca após a subida à superfície aquática para respirar ar foi observado no muçum, *Synbranchus marmoratus*, por JOHANSEN (1966). Segundo este autor, esta taquicardia parece ser mediada por estimulações de mecanorreceptores na câmara buco-faríngeal durante a tomada de ar que conduz à inibição do tônus vagal no coração (GRAHAM *et al.*, 1995). Este típico ciclo de bradicardia seguido de taquicardia com a RA foi também demonstrado em jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* por FARREL (1978), assim como em outros teleósteos de respiração aérea (ver Tab. 4). Desta forma, praticamente todos os teleósteos de respiração aérea já estudados exibiram mudanças na  $f_H$  relacionadas com a subida à superfície aquática para respirarem ar atmosférico (GRAHAM 1997b; OLIVEIRA *et al.* 2004).

A taquicardia desenvolvida por *C. gariepinus* não é persistente, e permanece durante aproximadamente 1 a 2 min. Após este tempo, a  $f_H$  do bagre retorna lentamente aos níveis de bradicardia anteriores, até à próxima RA. Em hipóxia severa, o aumento da  $f_{RA}$  foi tão intenso que, em alguns casos, não havia tempo suficiente para o retorno da  $f_H$  aos níveis bradicárdicos. Este ajuste cardiorrespiratório provavelmente ocorre para enviar um maior volume de sangue às câmaras suprabranquiais melhorando a tomada de  $O_2$  pelo ABO (GRAHAM *et al.*, 1995) e, conseqüentemente, liberando mais  $O_2$  aos tecidos a fim de manterem o metabolismo aeróbico. Na maioria dos peixes de respiração aérea, a bradicardia está associada com a expiração do ar, enquanto que a taquicardia subsequente está associada com a inspiração. Em *Synbranchus marmoratus*, a taquicardia causada pela inspiração está associada com aumento significativo no débito cardíaco e com a

perfusão do ABO (JOHANSEN, 1966; SKALS *et al.*, 2006). Existem evidências de que a variação na  $f_H$  associada à respiração aérea está sob o controle autonômico, principalmente pela inibição colinérgica do tônus vagal (AXELSSON *et al.*, 1989; GRAHAM *et al.*, 1995), e foi proposto que sua função seria facilitar a tomada de  $O_2$  pela respiração aérea (JOHANSEN, 1966; GRAHAM *et al.*, 1995; SKALS *et al.*, 2006; MCKENZIE *et al.*, 2007). Provavelmente isto ocorra em *C. gariepinus*, mas tal hipótese precisa ser comprovada experimentalmente. Dados mais recentes (FARREL, 2007) sugerem que peixes de respiração aérea com acesso ao ar atmosférico nunca deveriam apresentar bradicardia associada à hipóxia caso sua estratégia de respirar ar permitisse a manutenção de  $O_2$  entregue ao miocárdio. Porém, isto não ocorreu em *C. gariepinus*. Portanto, esta hipótese necessita de comprovação.



**FIGURA 15** - Relações entre as frequência cardíacas ( $f_H$  – bpm) antes (□) e após (■) as respirações aéreas, durante as tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_wO_2$  – mmHg) de *Clarias gariepinus*, em hipóxia gradual. ▨ – representa os valores médios entre as respirações aéreas de cada  $P_wO_2$ . As barras representam as médias  $\pm 1$  S.E.M. ( $n = 9$ ) e os asteriscos ( \* ) a diferença significativa entre a  $f_H$  pré e pós-RA de uma mesma  $P_wO_2$  ( $P \leq 0,05$ ).



**FIGURA 16** - Registro dos complexos QRS do ECG de *Clarias gariepinus* em hipóxia severa ( $P_wO_2 = 10$  mmHg) antes e após uma respiração aérea para obtenção dos valores da  $f_H$  (bpm).pré e pós-RA.

**TABELA 4** - Comparação dos valores de frequência cardíaca ( $f_H$ ) pré e pós-RA de *Clarias gariepinus* com os valores de  $f_H$  pré e pós-RA de outros teleósteos de respiração aérea durante hipóxia severa.

Espécies	°C	Frequência Cardíaca (bpm)		Autor
		Pré - RA	Pós - RA	
<i>Synbranchus marmoratus</i>	20 - 22	6	27	Johansen, 1966
	-	21	35	Johansen et al., 1970
	24 - 27	3 - 10	40	Roberts & Graham, 1985
<i>Electrophorus electricus</i>	28	28	66	Johansen et al., 1968
	-	14	30	Johansen et al., 1970
<i>Anabas testudinus</i>	25	25	62	Singh & Hughes, 1973
<i>Clarias batrachus</i>	-	30	39	Jordan, 1976
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	26 - 30	61 (12)	83 (23)	Farrel, 1978
<b><i>Clarias gariepinus</i></b>	<b>25 ± 1</b>	<b>30</b>	<b>52</b>	<b>presente estudo</b>

## 5. CONCLUSÕES

1. O bagre africano, *Clarias gariepinus*, apresentou as mesmas estruturas morfo-funcionais branquiais que os demais clariídeos já estudados;

2. Por meio dos experimentos de normóxia *sem* acesso ao ar atmosférico, *C. gariepinus* mostrou-se uma espécie de respiração aérea facultativa;

3. *C. gariepinus* consegue manter sua  $\dot{V}O_2$  constante até a  $PcO_2$  de 55 mmHg por meio de um fino ajuste do sistema cardiorrespiratório, sendo, portanto considerado uma espécie *oxirreguladora*;

4. Experimentos de hipóxia gradual *com* e *sem* acesso ao ar atmosférico, *C. gariepinus* demonstrou ser uma espécie mais dependente do  $O_2$  atmosférico que outras espécies de respiração bimodal;

5. Por meio dos experimentos de respiração aérea, *C. gariepinus* demonstrou ser uma espécie de respiração aérea facultativa contínua, mostrando um ajuste cardíaco típico de respirador aquático (bradicardia - pré-RAs) e aéreo (taquicardia – pós-RAs), que deve auxiliar na manutenção do metabolismo aeróbico e, conseqüentemente, na sua sobrevivência em ambientes hipóxicos em que é frequentemente encontrado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO E.G.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 141(C), p. 275 – 280, 2005.
- AGUIAR, L.H.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of temperature on the cardio-respiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Thermal Biol.**, v. 27, p. 299 - 308, 2001.
- ALVES, C.B.M.; VONO, V.; VIEIRA, F. Presence of the walking catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) (Siluriformes, Clariidae) in Minas Gerais state hydrographic basins, Brazil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 16, p. 259 – 263, 1999.
- AR, A.; ZACKS, D. Alterations in the bimodal gas exchange of the African catfish *Clarias lazera*. In: PAGANELLI CV, FARHI LE (eds). **Physiological function in special environments**. Springer-Verlag, New York, 1989, p. 172 - 190.
- AXELSSON, M.; ABE, A.S.; BICUDO, J.E.P.W.; NILSSON, S. On the cardiac control in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 93(A), p. 561 - 565, 1989.
- BERNER, R. A. Dying, O<sub>2</sub> and mass extinction. **Nature**, v. 340, p. 603 – 604, 1989.
- BEVAN, D. J.; KRAMER, D. L. The respiratory behavior of an air-breathing catfish, *Clarias macrocephalus* (Clariidae). **Can. J. Zool.**, v. 65, p. 348 - 353, 1987.
- BICUDO, J.E.P.W.; JOHANSEN, K. Respiratory gas exchange in the air-breathing fish, *Sinbranchus marmoratus*. **Environ. Biol. Fishes**, v. 4, p. 1507 – 1510, 1979.
- BRUTON, M. N. The survival of habitat desiccation by air breathing Clariid catfishes. **Environ. Biol. Fish**, v. 4 (3), p. 273 - 280, 1979.
- BURGESS, W.E. **An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A preliminary survey of Siluriformes**. T.F.H. Publications (ed), Neptune, New Jersey, p.784, 1989.
- COURTENAY, W.R. Florida's walking catfish. **Ward's Bulletin**, v. 10, n. 69, 1970.

COURTENAY, W.R.; JR., H.F. SAHLMAN; W.W. MILEY, I.I.; HERREMA, D.J. Exotic fish in fresh and brackish waters of Florida. **Biol. Conservat.**, v. 6, n. 4, p. 292 - 302, 1974.

COURTENAY, W.R.; STAUFFER, J.R. **Distribution, Biology and Management of Exotic Fishes**. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, p. 431, 1984.

DAS, B. K. The bionomics of certain air-breathing fishes of India, together with an account of the development of their air-breathing organs. **Phil. Trans.**, v. 216(B), p. 183 - 217, 1927.

DEHADRAI, P. V.; TRIPATHI, S. D. **Environment and ecology of freshwater air-breathing teleosts**. In: HUGHES, G. M. (ed.). London: Academic Press, 1976, p. 39 – 72.

ERVIN, D.H. The end-permian mass extinction. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 21, p. 69 – 91, 1990.

FARBER, J.; RAHN, H. Gas exchange between air and water and the ventilation pattern in the electric eel. **Respir. Physiol.**, v. 9, p. 151 - 161, 1970.

FARREL, A.P. Cardiovascular events associated with air-breathing in two teleosts, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Arapaima gigas*. **Can. J. Zool.**, v.56, p. 953 – 958, 1978.

FARREL, A.P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 523 – 536, 1984.

FARRELL, A.P. Tribute to P. L. Lutz: a message from the heart – why hypoxic bradycardia in fishes? **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 1715 – 1725, 2007.

FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L.; MORON, S.E. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. **Can. J. Zool.**, v. 72, p. 160 - 165, 1994.

FERRARIS, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1 – 628, 2007.

FERRI, M. (2004) Bagre-africano ameaça espécies nativas. **Diário da Região, São José do Rio Preto, 25/04/2004**. Disponível em: [www.diarioweb.terra.com.br](http://www.diarioweb.terra.com.br). Acesso em: 06/08/2004.

FLORINDO, L.H. **O papel dos quimiorreceptores de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>/pH no controle dos reflexos cárdio-respiratórios e da respiração na superfície aquática (ASR) em tambaqui, *Colossoma macropomum*: Respostas a longo prazo durante a hipóxia e hipercarbia.** 2002. 116 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

FRASER, J.; de MELLO, L.V.; REES, H.H.; WILLIAMS, D.R.; FANG, Y.C.; BRASS, A.; GRACEY, A.Y.; COSSINS, A.R. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 2977 – 2981, 2006.

FRITSCHÉ, R.; NILSSON, S. Cardiovascular responses to hypoxia in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Exp. Biol.**, v. 48, p. 153 – 160, 1989.

GAREY, W. F.; RAHN, H. Normal arterial gas tensions and pH and the breathing frequency of electrical eel. **Respir. Physiol.**, v. 9, p. 141 – 150, 1970.

GLASS, M. L.; RANTIN, F. T.; VERZOLA, M. N.; FERNANDES, M. N.; KALININ, A. L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp, (*Cyprinus carpio* L.). **J. Fish Biol.**, 39:143-149, 1991.

GLASS, M. L. **Ventilatory responses to hypoxia in ectothermic vertebrates.** In: BY WOOD, S. C. et al. (eds.) Physiological adaptation in vertebrates respiration, circulation and metabolism. Marcel Dekker, New York, 1992.

GRAHAM, J.B.; KRAMER, D.L.; PINEDA, E. Respiration of the air breathing fish *Piabucina festae*. **J.Comp. Physiol. B**, v. 122, p. 295 – 310, 1977.

GRAHAM, J. B. The transition to air breathing in fishes. II. Effects of hypoxia acclimation on the bimodal gas exchange of *Ancistrus chagresi* (Loricariidae). **J. Exp. Biol.**, v. 102, p. 157 – 173, 1983.

GRAHAM, J. B. Air-breathing Fishes: evolution, diversity and adaptation. **Academic Press**, v. A, 1997a, p. 1 – 10.

GRAHAM, J. B. Air-breathing Fishes: evolution, diversity and adaptation. **Academic Press**, v. B, 1997b, p. 188.

GRAHAM, J.B.; KRAMER, D.L.; PINEDA, E. Respiration of the air-breathing fish *Piabucina festae*. **J. Comp. Physiol.**, v. 122, p. 295 – 310, 1977.

GRAHAM, J.B.; CHILLER, L.D.; ROBERTS, J.L. The transition to air breathing in fishes. V. Comparative aspects of cardiorespiratory regulation in *Synbranchus marmoratus* and *Monopterus albus* (Synbranchidae). **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 1455 – 1467, 1995.

GREENWOOD, P. H. A revision of genus *Dinotopterus* BLGR. (Pices, Clariidae) with notes on the comparative anatomy of the suprabranchial organs in the Clariidae. **Bull. British Mus.**, v. 7, p. 215 – 241, 1961.

GOLUBKOV, S.; ALIMOV, A. Ecosystem changes in the Neva Estuary (Baltic Sea): Natural dynamics or response to anthropogenic impacts? **Mar. Pollut. Bull.**, v. 61, p. 198 – 204, 2010.

GRUSZCZYNSKI, M.; HALAS, S.; HOFFMAN, A.; MALKOWSKI, K. A brachiopod calcite record of the oceanic carbon and oxygen isotope shifts at the Permian/Triassic transition. **Nature**, v. 337, p. 64 – 68, 1989.

HERNÁNDEZ-MIRANDA, E.; QUIÑONES, R.A.; AEDO, G.; VALENZUELA, A.; MERMOUD, N.; ROMÁN, C.; YAÑEZ, F. A major fish stranding caused by a natural hypoxic event in a shallow bay of the eastern South Pacific Ocean. **J. Fish Biol.**, v. 76, p. 1543-1564, 2010. (doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02580.x)

HILAIRE, G.ST. E. Sur les branchies du *Silurus anguillaris*. **Bull. Sci. Soc. philom. Paris**, 105-112, 1802.

HOCHACHKA, P.W. **Living without oxygen. Closed and open systems in hypoxia tolerance**. Harvard University, Cambridge, 1980, p. 181.

HOLENTON, G.F. Oxygen as an environmental factor of fishes. In: Ali, M.A. (ed.). **Environmental Biology of Fishes**. Plenum, New York, 1980, p. 7-32.

HORA, S. L. Physiology, bionomics, and evolution of air-breathing fishes of India. **Trans. Nat. Inst. Sci India I**, p. 1 – 16, 1935.

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

HUGHES, G. M.; SINGH, B. H. Respiration in an air breathing fish, the climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch). I- Oxygen uptake and carbon dioxide release into air and water. **J. Exp. Biol.**, v. 53(A), p. 265 - 280, 1970.

HUGHES, G. M.; SINGH, B. H. (1970). Respiration in an air breathing fish, the climbing perch *Anabas testudineus*. II- Respiratory patterns, and the control of breathing. **J. Exp. Biol.**, v. 53(B), p. 281 - 298, 1970.

Hughes, G.M.; SINGH, B.H. Gas exchange with air and water in an air-breathing catfish, *Saccobranchus (Heteropneustes) fossilis*. **J. Comp. Biol.**, v. 55, p. 667 – 682, 1971.

JOHANSEN, K. Air breathing in the teleost *Symbranchus marmoratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 18, p. 383 – 395, 1966.

JOHANSEN, K. Air breathing in fishes. In: Hoard, W. S.; Randall, D. J. **Fish Physiology**, v. IV. Academic Press, New York, 1970, p. 361 - 411.

JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; SCHMIDT, K.; PETERSEN, J.A. Gas exchange and control of breathing in electric eel *Electrophorus electricus*. **Z. Verg. Physiologie**, v. 61, p. 137 – 163, 1968.

JORDAN, J. The influence of body weight on gas exchange in the air-breathing fish, *Clarias batrachus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 53(A), p. 305 – 310, 1976.

KALININ, A.L.; MOGENSEN, G.L.; RANTINEN, F.T. A comparison of directly measured and estimated gill ventilation in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 122, p. 207 – 211, 1999.

KRAMER, D.L. The evolutionary ecology of respiratory mode in fishes - an analysis based on the costs of breathing. **Environ. Biol. Fish**, v. 9, p. 145 – 158, 1983.

KRAMER, D.L. Dissolved oxygen and fish behavior. **Environ. Biol. Fish**, v. 18(2), p. 81 - 92, 1987.

KRAMER, D.L.; McCLURE, M. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. **Environ. Biol. Fish**, v. 7, 47 – 55, 1982.

LACHNER, E.A.; ROBINS, C.R.; COURTENAY JR, W.R. Exotic fishes and other aquatic organisms introduced into North America. **Smithsonian Contrib. Zool.** v. 59, p. 1 - 29, 1970.

LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp - how it affects O<sub>2</sub> uptake, ventilation, and O<sub>2</sub> extraction from water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38 – 49, 1979.

- MAGID, A. M. A. The ability of *Clarias lazera* (Pices) to survive without air-breathing. **J. Zool.**, v. 163, p. 63 - 72, 1971.
- MATTIAS, A.T., RANTIN, F.T., FERNANDES, M.N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120, p. 311 – 315, 1998.
- McKENZIE, D.J.; AOTA, S.; RANDALL, D.J. Ventilatory and cardiovascular-responses to blood-pH, plasma PCO<sub>2</sub>, blood O<sub>2</sub> content, and catecholamines in an air-breathing fish, the bowfin (*amia-calva*). **Physiol. Zool.**, v. 64, p. 432 – 450, 1991.
- 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*. **J. Exp. Biol.**, v.210, p. 4224 – 4232, 2007.
- MILI, P.S.M.; TEIXEIRA, R.L. Notas ecológicas do bagre-africano, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Teleostei, Clariidae) de um córrego do Sudeste do Brasil. **Bull. Mus. Biol. Mello Leitão**, v. 19, p. 45 – 51, 2006.
- MOUSSA, T.A. Morphology of the accessory air-breathing organs of the teleost *Clarias lazera* (C and V). **J. Morph.**, v. 98, p. 125 – 160, 1956.
- MOUSSA, T.A. Physiology of the accessory respiratory organs of the teleost, *Clarias lazera* (C and V). **J. Exp. Zool.**, v. 136, p. 419 - 454, 1957.
- MUNSHI, J. S. D. The accessory respiratory organs of *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Morph.**, v. 109, p. 115 - 139, 1961.
- MUNSHI, J. S. D. Gross and fine structure of respiratory organs of air-breathing fishes. In: HUGHES, G. M. (ed.) **Respiration of Amphibious Vertebrates**. Academic Press, London, 1976, p. 73 - 104.
- OLIVEIRA, R.D.; LOPES, J.M.; SANCHES, J.R.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L. RANTIN, F.T. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.139(A), p. 479 – 485, 2004.
- PAXTON, J.R.; ESCHMEYER, W.N. **Encyclopedia of Fishes**. Academic Press, San Diego USA, 1995.

PERNA, S.A.; FERNANDES, M.N. Gill morphometry of the facultative air-breathing loricariid fish, *Hypostomus plecostomus* (Walbaum) with special emphasis on aquatic respiration. **Fish. Physiol. Biochem.**, v.15, p. 213 – 220, 1996.

PROSSER, C. L. Oxygen: respiration and metabolism. In: PROSSER, C. L. (ed.). **Comparative Animal Physiology**. Washington: W. B. Saunders Company, 1973, p. 165 - 206.

PULELLA, S. V. S. (1997). **Aquaculture of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and a comparison of its quality: microbiological, sensory and proximate composition**. 1997. 191 f. Dissertação (Mestrado em "Food Science and Technology") - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia - USA.

PURVES, W.; SADAVA, D.; ORIAN, G.; HELLER, H. **Vida: A ciência da biologia. [Life: the science of biology]**. In: ANA PAULA SOMER VINAGRE (Trad.) 6<sup>a</sup> ed., v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 382.

RANDALL, J.E. The control of respiration and circulation in fish during exercise in hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 275 – 288, 1982.

RANDALL, J.E.; ALLEN, G.R.; STEENE, R.C. **Fishes of the Great Barrier Reef and Coral Sea**. Revised edition. Crawford House, Bathurst, NSW, 1997, p. 557.

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

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

RANTIN, F. T., GLASS, M. L., KALININ, A. L., VERTOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N. Cardio-respiratory responses in two ecological distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environ. Biol. Fish**, v. 36, p. 93 - 97, 1993.

RANTIN, F. T.; GUERRA, C. D. R.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L. (1998). The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the

serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 119, p. 991-997, 1998.

ROBERTS, J.L.; GRAHAM, J.B. Adjustments of cardiac rate to changes in respiratory gases by a bimodal breathear, the Panamanian swamp eel, *Synbranchus marmoratus*. **Am. Zool.**, v. 25, p. 25 – 51, 1985.

SAUNDERS, R. L. The irrigation of the gills in fishes. 2. Efficiency of oxygen uptake in relation to the respiratory flow activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Can. J. Zool.**, v. 40, p. 817 – 862, 1962.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Energy metabolism. In: SCHMIDT-NIELSEN, K. (ed.). **Animal Physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997a, p. 5 – 61.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Energy metabolism. In: SCHMIDT-NIELSEN, K. (ed.). **Animal Physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997b, p. 169 – 211.

SINGH, B. N.; HUGHES, G. M. Respiration of an air-breathing catfish *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Exp. Biol.**, v. 55, p. 421 – 434, 1971.

SINGH, B. N.; HUGHES, G. M. Cardiac and respiratory responses in the climbing perch *Anabas testudineus*. **J. Comp. Physiol.**, v. 84, p. 205 – 226, 1973.

SINGH, B. R.; MISHRA, A. P.; SHEEL, M.; SINGH, I. Development of the air-breathing organ in the cat fish, *Clarias batrachus* (Linn.). **Zool. Anzeiger**, v. 208, p. 100 – 111, 1982.

SKALS, M.; SKOVGAARD, N.; TAYLOR, E.W.; LEITE, C.A.C.; ABE, A.S.; WANG, T. Cardiovascular changes under normoxic and hypoxic conditions in the airbreathing teleost *Synbranchus marmoratus*: importance of the venous system. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 4167 – 4173, 2006.

SMITH, H. M. The fresh-water fishes of Siam, or Thailand. **Bull. U.S. Natl. Mus.**, v. 188, p. 1 – 622, 1945.

SOUZA, R.H.S.; SONCINI, R.; GLASS, L.; SANCHES, J.R.; RANTIN, F.T. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. **J. Comp. Physiol.**, v. 171(B), p. 483 – 489, 2001.

STEFFENSEN, J. F.; LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. Gill ventilation and O<sub>2</sub> extraction during graded hypoxia in two ecologically distinct species of flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Environ. Biol. Fish**, v. 7, p. 157 - 163, 1982.

TAKASUSUKI, J.; FERNANDES, M.N.; SEVERI, W. The occurrence of aerial respiration in *Rhinelepis strigosa* during progressive hypoxia. **J. Fish Biol.**, v. 52, p. 369 – 379, 1998.

TAMURA, O.; MORIYAMA, T. On the morphological feature of the gill of amphibious and air-breathing fishes. **Bull. Fac. Fish.**, Nagasaki University, v. 41, p. 1 - 8, 1976.

TAYLOR, E.W.; JORDAN, D.; COOTE, J.H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol. Rev.** v. 79, p. 855 – 916, 1999.

TENNEY, S. M. A synopsis of breathing mechanisms. Lung Biology in Health and Disease. In: S. C. WOOD; C. LENFANT (eds.). **Evolution of Respiratory Processes: A Comparative Approach**, v. 13. New York, Marcel Dekker Inc, 1979, p. 51 - 106.

WITHERS, P. C. Animal energetics. In: Withers, P. C. (ed.). **Comparative Animal Physiology**. Toronto: Saunders College Publishing, 1992, p. 82 - 121.

YU, K. L.; WOO, Y. S. Effects of ambient oxygen tension and temperature on the bimodal respiration of an air-breathing teleost. **Physiol. Zool.**, v. 58, p. 181 – 189, 1985.