

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

**Distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais em
tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): Controle das respostas
cardiorrespiratórias à hipóxia**

Vivian Maria Zeraik

**São Carlos
2012**

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

**Distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais em
tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): Controle das respostas
cardiorrespiratórias à hipóxia**

Vivian Maria Zeraik

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin

**São Carlos
2012**

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

Z58do

Zeraik, Vivian Maria.

Distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): controle das respostas cardiorrespiratórias à hipóxia / Vivian Maria Zeraik. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 89 f.

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

1. Fisiologia comparada. 2. Quimiorreceptores de oxigênio. 3. Função cardio-respiratória. 4. Hipóxia. 5. Tilápia do Nilo. 6. *Oreochromis niloticus*. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)

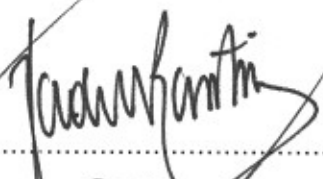
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Vivian Maria Zeraik

Dia 31/08/2012

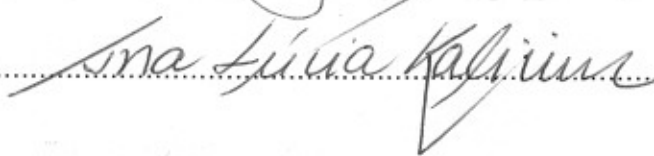
Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin.....



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



Profª. Drª. Ana Lúcia Kalinin.....



Dedico este trabalho aos amores da
minha vida: meus queridos pais,
Marcia e Otávio e às minhas irmãs
Xuxu e Pi.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pela oportunidade, confiança, paciência, exemplo profissional e em especial pela amizade.

À Prof. Dra. Ana Lúcia Kalinin pelo agradável convívio e contribuições para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo e Prof. Dr. Cleo Alcantara Leite pelas discussões importantes para o presente trabalho.

Aos professores que oferecem as disciplinas para o PIPGCF, em especial à Prof. Dra. Luciane G. Batalhão e Prof. Dra. Kênia Bícego pelo aprendizado.

À minha mãe Marcia, e meu pai Otávio, por todo o apoio, amor e exemplo de como a vida deve ser levada com tranquilidade e por me ensinarem o que realmente é importante.

Às minhas queridas irmãzinhas Xuxu e Pi por todo o carinho, amizade, conselhos e sem as quais não teria feito esse trabalho.

Ao meu querido gordinho, Djodrigo, pelo amor, companheirismo e, sobretudo pela paciência de ouvir sobre o trabalho e ainda me ajudar nas soluções dos problemas.

Aos amigos do laboratório: Gabi, Dani, André, Lucas, Eliton, Fer, Felipe, Diana, Samuel, Vô, Aline e especial ao Nathan pela sua alegria diária, ao meu companheiro e amigo Z, à Nati (Lab prof. Marisa) pela amizade e ótima companhia, à Ju pelos ensinamentos e conselhos e ao Thiago pelas técnicas ensinadas, discussões e paciência.

Às minhas amigas Beatris e Nicole pela amizade tão longa e sincera, aos amigos de Bauru: Nati, Fer, Dani, Sheila, Laris, Ju, Danilo e Pedro que apesar da distância continuamos juntos, aos amigos de Jaboticabal: Camis, Lucas e Carol.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas em especial ao Sr. Angelo, José Roberto e a Nadir.

Às tilápias-do-Nilo que possibilitaram que esse trabalho fosse desenvolvido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

À todos que contribuíram para a produção desse trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Em peixes, os quimiorreceptores de O_2 são encontrados principalmente nas brânquias e são responsáveis pelo monitoramento das tensões de O_2 (PO_2) da água inspirada e/ou do sangue arterial. Frente à hipóxia esses receptores acionam ajustes cardiorrespiratórios para manter a transferência do O_2 até os tecidos onde este gás é utilizado nos processos aeróbicos. O presente projeto teve por objetivo determinar a distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O_2 pelos arcos branquiais de tilápia-do-Nilo e o papel desses receptores nos ajustes cardiorrespiratórios desta espécie em resposta à hipóxia. Em um grupo de peixes intactos (grupo controle, $n = 10$; $Wt = 258,4 \pm 7,4$ g) foram implantados uma cânula bucal, duas operculares e eletrodos de ECG para a medição das seguintes variáveis: frequência respiratória - f_R , volume ventilatório - V_T , ventilação branquial - \dot{V}_G , extração de O_2 da corrente ventilatória - EO_2 , consumo de O_2 - $\dot{V}O_2$ e frequência cardíaca - f_H , nas tensões de O_2 de 140, 100, 70, 50, 30 e 20 mmHg, sendo os peixes mantidos por 40 min em cada tensão. Para se verificar se os receptores se distribuem em todos os arcos branquiais foi realizada a extirpação bilateral do primeiro par de arcos (grupo operado, $n = 10$; $Wt = 232,5 \pm 8,8$ g) e após 4 dias de recuperação foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o grupo controle. Para a determinação da orientação dos quimiorreceptores, um outro grupo de peixes intactos ($n = 10$; $Wt = 259,6 \pm 6,2$ g) e operados ($n = 10$; $Wt = 248,7 \pm 6,5$ g) foram submetidos à implantação de uma cânula bucal, uma cânula inserida na veia caudal e eletrodos de ECG para a medição das seguintes variáveis: amplitude ventilatória - V_{amp} , f_R , e f_H . Esses animais foram submetidos a 2 injeções internas (administradas por meio da cânula na veia caudal): a) 0,5 mL intravenoso de salina (0,9%); b) 0,5mL intravenoso de NaCN ($750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NaCN em salina) e 2 injeções externas (injetadas por meio da cânula bucal): c) 1 mL H_2O d) 1 mL NaCN ($750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NaCN em água). A $\dot{V}O_2$ dos peixes operados foi significativamente menor somente em hipóxia mais severa. Tanto a bradicardia, quanto os parâmetros respiratórios não foram abolidos com a remoção do primeiro par de arcos branquiais. A EO_2 do grupo operado foi 18% menor do que a do grupo controle. As respostas internas e externas ao NaCN incluíram diminuição da f_H , e aumento da f_R e V_{amp} . Os parâmetros foram atenuados no grupo operado demonstrando a existência de quimiorreceptores, mas não exclusivamente no primeiro arco branquial. Em tilápia-do-Nilo, os quimiorreceptores de O_2 não estão restritos ao primeiro par de arcos branquiais e monitoram tanto a PO_2 do sangue arterial quanto da água inspirada. Os receptores são, provavelmente, distribuídos por todos os demais arcos, o que confere a esta espécie uma grande capacidade de ajustar as variáveis cardiorrespiratórias frente à hipóxia gradual que frequentemente ocorre nos ambientes em que vive em condições naturais.

ABSTRACT

In fish the O_2 chemoreceptors are mainly found in the gill arches and monitor the O_2 tensions (PO_2) of the inspired water (externally oriented) and/or the arterial blood (internally oriented). During hypoxia these receptors trigger cardiorespiratory adjustments in order to maintain an adequate O_2 transfer to the tissues. The aim of the present study was to determine the O_2 chemoreceptors distribution through the gill arches of Nile tilapia and the role of these receptors on the cardiorespiratory responses to hypoxia in this species. One buccal and two opercular cannulae, and a pair of ECG electrodes were implanted in a group of intact fish (control group, $n = 10$; $Wt = 258.4 \pm 7.4$ g). This procedure served to measure the following cardiorespiratory variables: respiratory frequency - f_R , ventilatory tidal volume - V_T , gill ventilation - \dot{V}_G , O_2 extraction from the ventilatory current - EO_2 , oxygen uptake - $\dot{V}O_2$, and heart rate - f_H . After an overnight recovery period from surgery fish were subjected to the following O_2 tensions during 40 min each: 140 (normoxia), 100, 70, 50, 30 e 20 mmHg. To verify the O_2 receptors distribution in the gills, the first pair of gill arches was surgically extirpated (operated group, $n = 10$; $Wt = 232.5 \pm 8.8$ g). After a recovery period of 4 days, operated fish were subjected to the same procedures described above for the intact ones. To examine the orientation of these receptors, other intact ($n = 10$; $Wt = 259.6 \pm 6.2$ g) and operated ($n = 10$; $Wt = 248.7 \pm 6.5$ g) groups had a PE catheter implanted into the buccal cavity, another catheter implanted inside the caudal vein and fitted with ECG electrodes to measure the following variables: ventilatory amplitude (V_{amp}), f_R , and f_H . Two internal injections (administered through the cannula into the caudal vein): a) 0.5 mL intravenous saline (0.9%), b) 0.5 mL intravenous NaCN ($750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of NaCN in saline) and two external injections (injected by oral cannula): c) 1 mL H_2O , d) 1 mL NaCN ($750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of NaCN in water) were administered in both groups. The $\dot{V}O_2$ of operated fish was significantly lower only in severe hypoxia. Both bradycardia, and respiratory parameters were not abolished by ablation of the first pair of gill arches. EO_2 of operated group remained about 18% lower than that of control group. The responses to internal and external NaCN included decreases in f_H and increases in f_R and V_{amp} . The cardiorespiratory parameters were attenuated in the operated group, indicating the presence of chemoreceptors, but not limited to the first gill arch. In Nile tilapia the O_2 chemoreceptors are distributed beyond the first gill arch, probably through the four gill arches. Furthermore, these receptors are internally and externally oriented, possibly along all gill arches, triggering the cardiorespiratory adjustments necessary to face the hypoxic conditions at which the species is frequently subjected in its natural environmental conditions.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura branquial de um teleósteo. Destaque para o fluxo contracorrente entre a água e o sangue (MOYES & SCHULTE, 2010). 14
- Figura 2.** Ventilação unidirecional com fluxo contracorrente, mostrando o sangue e o meio fluído em direções opostas e a alta PO_2 mantida no sangue ao longo da distância na superfície de troca gasosa (Adaptado de PIIPER & SCHEID, 1992). 14
- Figura 3.** Localização dos nervos cranianos de tambaqui, *Collossoma macropomum*. Evidência para origem dos nervos na porção dorsal do encéfalo e a inervação dos arcos branquiais (Modificado de MILSOM, 2002). 19
- Figura 4.** Localização dos quimiorreceptores periféricos em mamíferos (Modificado de GUYTON & HALL, 2006). 21
- Figura 5.** Células quimiorreceptoras de mamíferos (células glomus) (RANDALL et al., 1997). 22
- Figura 6.** Exemplar de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. Fonte: <http://investigacion.izt.uam.mx/ocl/Peces/Fotos/Oreochromis%20niloticus.jpg>. 22
- Figura 7.** Localização das cânulas de polietileno operculares com destaque para fixação dos cateteres feito através das travas e posição dos eletrodos de ECG em *Oreochromis niloticus*. 27
- Figura 8.** Localização das cânulas de polietileno e posição de eletrodos de ECG no grupo de *Oreochromis niloticus* submetido às injeções de NaCN. 27
- Figura 9.** Técnica para remoção bilateral do primeiro arco branquial. 29
- Figura 10.** Tilápia-do-Nilo após remoção do primeiro arco branquial. 29
- Figura 11.** Tilápia-do-Nilo após quatro dias de recuperação do procedimento de remoção do primeiro par de arcos branquiais. 30
- Figura 12.** Tanque experimental com destaque para respirômetro e direção do fluxo de água que passa através dele (setas vermelhas). 32
- Figura 13.** Sistema de respirometria de fluxo constante utilizado para a obtenção dos parâmetros cardiorrespiratórios em diferentes condições (tensões de O_2 no presente estudo). **a.** respirômetro, **b.** cânula de polietileno para coleta de amostra de água que entra (P_eO_2) no respirômetro, **c.** cânula de polietileno para coleta de amostra de água que sai (P_sO_2) do respirômetro, **d.** cânula de polietileno bucal para coleta de amostra de água inspirada ($P_{insp}O_2$), **e.** cânula de polietileno opercular para coleta de amostra de água expirada ($P_{exp}O_2$), **f.g.** eletrodos para obtenção da f_H , **h.** torneira de 3 vias, **i.**

transdutor de pressão, **j.** cuvetas com eletrodos de O₂, **k.** analisadores de O₂, **l.,m,n.** sistema de aquisição de dados **o.** computador para aquisição de dados em tempo real, **p.** frasco para ajuste de fluxo, **q.** bomba para circulação de água, **r.** balde para manter a mesma água circulando **s.** controlador de temperatura, **t.** entrada por borbulhamento de quantidades de N₂ ou O₂ comprimido. (Adaptado de Massari et al., 1998)..... 32

Figura 14. Set experimental, demonstrando sistema de respirometria de fluxo constante. A- tanque experimental, B- Sistema de aquisição de dados Power-Lab (ADInstruments) C- Analisador de O₂, D- Computador. 33

Figura 15. “Set” experimental para identificar a orientação dos quimiorreceptores em *Oreochromis niloticus*. 36

Figura 16. Efeito da redução gradual da PO₂ da água inspirada ($P_{\text{insp}}\text{O}_2$) sobre o consumo de O₂ ($\dot{V}\text{O}_2$ - mL O₂.kg⁻¹.h⁻¹) do grupo controle e operado. Símbolos vazios indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios ± SEM.; n = 10 (P ≤ 0,05). 42

Figura 17. Relação entre os parâmetros: \dot{V}_G (mL H₂O.kg⁻¹.min⁻¹), f_R (resp.min⁻¹) e V_T (mL H₂O.kg⁻¹.resp⁻¹) frente à diminuição da tensão de O₂ inspirada ($P_{\text{insp}}\text{O}_2$). Símbolos vazios indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios ± SEM.; n = 10 (P ≤ 0,05). 48

Figura 18. Efeito da redução da PO₂ na água inspirada ($P_{\text{insp}}\text{O}_2$) na extração de O₂ da corrente ventilatória (EO_2 - %). Símbolos vazios apontam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) mostram diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios ± SEM.; n = 10 (P ≤ 0,05). 51

Figura 19. Frequência respiratória (f_R) de tilápia-do-Nilo após injeções internas de salina e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). A seta indica o momento da injeção e os símbolos vazios representam diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias ± SEM.; n = 10, (P ≤ 0,05). 56

Figura 20. Comparação da frequência respiratória (f_R) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção interna de NaCN. Os asteriscos mostram diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias ± SEM.; n = 10, (P ≤ 0,05). 57

Figura 21. Amplitude ventilatória (V_{amp}) de *Oreochromis niloticus* após injeções internas de salina e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). Os símbolos vazios mostram diferença significativa dentro do grupo em

- relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05). 58
- Figura 22.** Comparação da amplitude ventilatória (V_{amp}) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção interna de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, P \leq 0,05.59
- Figura 23.** Frequência respiratória (f_R) de *Oreochromis niloticus* após injeções externas de H₂O e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). A seta indica o momento da injeção e os símbolos vazios mostram diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05). 60
- Figura 24.** Comparação da frequência respiratória (f_R) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção externa de NaCN. Os asteriscos mostram diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05). 61
- Figura 25.** Amplitude ventilatória (V_{amp}) de *Oreochromis niloticus* após injeções externas de H₂O e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). Os símbolos vazios mostram diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05).62
- Figura 26.** Comparação da amplitude ventilatória (V_{amp}) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção externa de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05). 63
- Figura 27.** Efeito da hipóxia gradual na frequência cardíaca (f_H - bpm) do grupo controle e operado. Símbolos vazios apontam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios \pm SEM.; n = 10(P \leq 0,05). 68
- Figura 28.** Registro dos complexos QRS em *Oreochromis niloticus* do grupo operado, na tensão de 140 mmHg (A) e 20 mmHg (B), para contagem e obtenção da frequência cardíaca (f_H - bpm). Detalhe para bradicardia evidenciada na tensão de 20 mmHg. 69
- Figura 29.** Respostas cardíacas (f_H) de *Oreochromis niloticus* após injeções internas de salina e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). A seta indica o momento da injeção. Os símbolos vazios indicam diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05). 72

- Figura 30.** Comparação da frequência cardíaca (f_H) de *Oreochromis niloticus*, do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção interna de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, ($P \leq 0,05$)..... 73
- Figura 31.** Frequência cardíaca (f_H) de *Oreochromis niloticus* após injeções externas de H₂O e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). Os símbolos vazios demonstram diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, ($P \leq 0,05$). 74
- Figura 32.** Comparação da frequência cardíaca (f_H) de *Oreochromis niloticus*, do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção externa de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, ($P \leq 0,05$)..... 75
- Figura 33.** Traçados representativos dos registros dos complexos QRS e da pressão intrabucal (P_{bucal}) em *Oreochromis niloticus*, evidenciando as alterações cardiorrespiratórias apresentadas após administração intravenosa de NaCN. 76
- Figura 34.** Esquema da fosforilação oxidativa mitocondrial, evidenciando o local de atuação do NaCN (Modificado de MOYES & SCHULTE, 2010). 76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios do consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$ mL O_2 .kg⁻¹.h⁻¹) frente às reduções das tensões de O_2 da água inspirada ($P_{insp}O_2$) nos grupos controle e operado 42
- Tabela 2.** Valores médios (\pm S.E.M.) da ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹min⁻¹), frequência respiratória (f_R - resp.min⁻¹) e volume ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹ resp⁻¹), dos grupos controle e operado frente à redução gradual da $P_{insp}O_2$ 47
- Tabela 3.** Valores médios \pm S.E.M. da extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %) dos grupos controle e operado frente à diminuição da $P_{insp}O_2$ 51
- Tabela 4.** Valores médios \pm S.E.M. da frequência cardíaca (f_H - bpm) no grupo controle e operado frente às reduções da PO_2 da água. 68

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	11
1. Introdução.....	13
1.1. Hipóxia e adaptações dos peixes.....	13
1.2. Quimiorrecepção de O ₂	16
1.3. Localização e identificação dos quimiorreceptores em peixes	16
1.4. Quimiorreceptores de mamíferos <i>versus</i> quimiorreceptores de peixes	19
1.5. A tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	22
2. Objetivos	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Coleta e manutenção em laboratório	25
3.2. Procedimentos cirúrgicos:.....	25
3.2.1. Implantação de cânulas de polietileno e eletrodos de ECG para a determinação dos parâmetros cardiorrespiratórios:.....	25
3.3. Medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios em hipóxia:	31
3.3.1. Tomada de O ₂ – $\dot{V}O_2$	31
3.3.2. Frequência respiratória - f_R	33
3.3.3. Ventilação branquial - \dot{V}_G	33
3.3.4. Volume ventilatório - V_T	34
3.3.5. Extração de O ₂ pela corrente ventilatória – EO_2	34
3.3.6. Frequência cardíaca – f_H	34
3.3.7. Medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios nos peixes operados do grupo hipóxia:.....	34
3.4. Medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios às injeções de NaCN:	34
3.4.1. Frequência respiratória – (f_R)	35
3.4.2. Amplitude ventilatória – (V_{amp}).....	35
3.4.3. Frequência cardíaca – f_H	35
3.5. Protocolos Experimentais	36

3.5.1. Respostas cardiorrespiratórias à hipóxia:.....	36
3.5.2. Respostas cardiorrespiratórias ao NaCN:.....	36
3.6. Análise dos dados	37
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Parâmetros ventilatórios de <i>Oreochromis niloticus</i> à hipóxia gradual nos grupos controle e operado.....	39
4.1.1. Tomada de O ₂ - $\dot{V}O_2$	39
4.1.2. Ventilação branquial (\dot{V}_G), frequência respiratória (f_R), volume ventilatório (V_T).....	43
4.1.3 Extração de O ₂ (EO_2 - %).....	49
4.2.Parâmetros ventilatórios de <i>Oreochromis niloticus</i> em resposta ao NaCN.....	52
4.2.1. Frequência respiratória (f_R) e Amplitude ventilatória (V_{amp}).....	52
4.3. Parâmetro cardíaco de <i>Oreochromis niloticus</i> frente à redução gradual da PO_2 na água.....	63
4.3.1. Frequência cardíaca (f_H)	63
4.4. Parâmetro cardíaco de <i>Oreochromis niloticus</i> em resposta ao NaCN.....	69
4.4.1. Frequência cardíaca (f_H)	69
5. Conclusões.	77
6. Referências bibliográficas	78

1. Introdução

1.1. Hipóxia e adaptações dos peixes

Os animais de respiração aquática vivem em um ambiente com menor disponibilidade de oxigênio do que os animais de respiração aérea, já que a água contém 30 vezes menos oxigênio dissolvido, é um meio 800 vezes mais denso e 50 vezes mais viscoso do que o ar. Além disso, as moléculas de gás difundem-se 10.000 vezes mais rapidamente no ar que na água (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Ao nível do mar a 20 °C, por exemplo, a concentração molar de O₂ no meio aéreo é de aproximadamente 9 mM, enquanto na água, sob estas mesmas condições, a concentração desse gás é menor que 0,3 mM. Portanto, para a obtenção de uma mesma quantidade de oxigênio, um animal que use água como meio respiratório precisa mover, neste caso, 30 vezes mais meio inerte através da sua superfície respiratória do que um organismo de respiração aérea (MOYES & SCHULTE, 2010). Porém esse valor é menor devido ao fluxo contracorrente que ocorre entre o sangue e a água nas brânquias dos peixes. A vantagem desse fluxo é que uma grande diferença na pressão parcial de O₂ (PO₂) pode ser mantida através da superfície de trocas, permitindo maior transferência do O₂ da água para os capilares sanguíneos (Figuras 1 e 2) (RANDALL et al., 1997; REID et al., 2006).

Assim, devido às diferenças nas quantidades de O₂ encontradas nos dois meios observamos a importância da estratégia respiratória em relação ao gasto energético. Em geral, a respiração aérea consiste em movimentos recíprocos do ar para dentro e para fora da superfície respiratória. Por outro lado, a maioria dos sistemas branquiais tem um fluxo de água em uma direção com via inalante (entrada de água) e exalante (saída da água). O trabalho mecânico necessário para acelerar e desacelerar a água, seria muito maior do que para o fluxo de ar (WITHERS, 1992). Dessa maneira, a respiração aquática em fluxo unidirecional de água sobre as brânquias, é menos custosa energeticamente para esses animais (RANDALL et al., 1997; SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

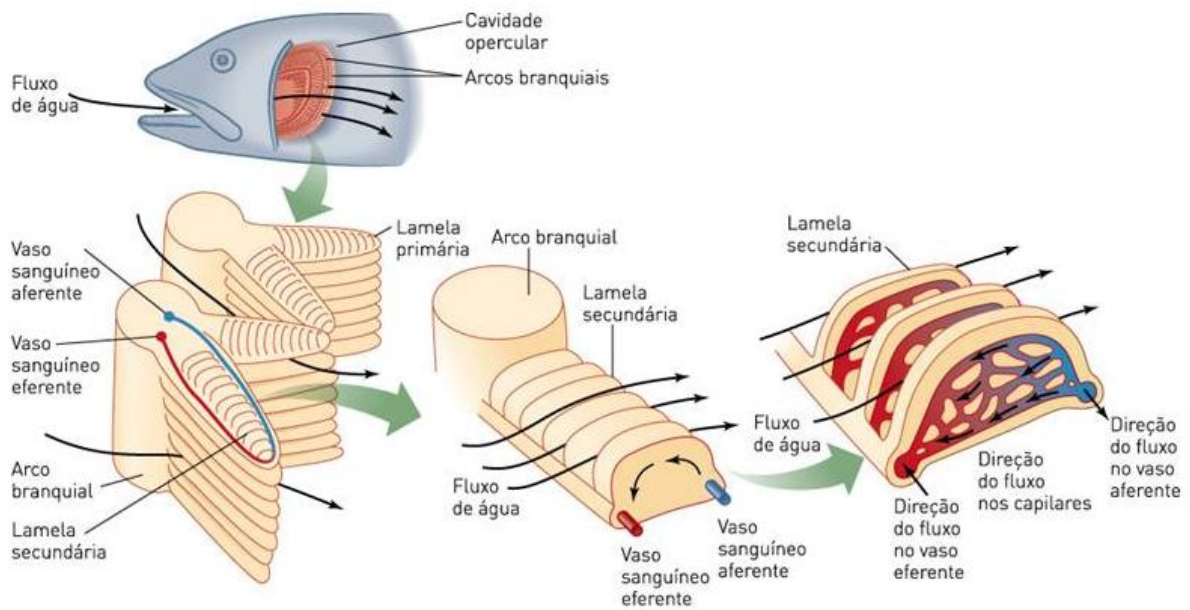


Figura 1. Estrutura branquial de um teleosteo. Destaque para o fluxo contracorrente entre a água e o sangue (MOYES & SCHULTE, 2010).

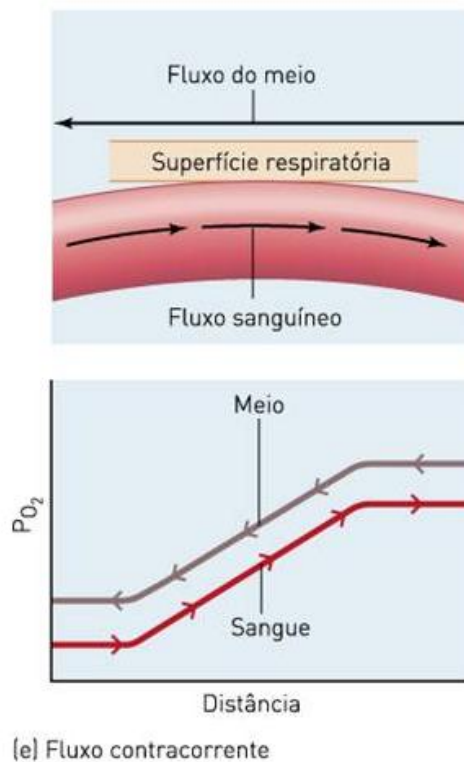


Figura 2. Ventilação unidirecional com fluxo contracorrente, mostrando o sangue e o meio fluindo em direções opostas e a alta PO_2 mantida no sangue ao longo da distância na superfície de troca gasosa (Adaptado de PIIPER & SCHEID, 1992).

Nos ambientes aquáticos podem ocorrer grandes flutuações diárias do O₂ dissolvido e severas reduções do mesmo, o que é conhecido como hipóxia ambiental (RANDALL et al., 1997).

Altas temperaturas e baixos níveis de O₂ são limitações frequentemente impostas aos peixes. Além disso, o “input” de matéria orgânica e sua decomposição por microorganismos em ambientes aquáticos tropicais provocam uma redução drástica nos níveis de O₂ dissolvido. Isto também pode ocorrer devido à ação antropogênica de lançamento de nutrientes orgânicos (FERNANDES & RANTIN, 1989). Tais fatos vêm recebendo crescente atenção à medida que agentes poluentes geralmente provocam um decréscimo na PO₂ aquática destes sistemas, prejudicando, assim, toda a fauna e a flora desses ambientes e particularmente os peixes (GLASS, 1992).

Assim, em condições hipóxicas, quando os peixes não conseguem empreender uma fuga como resposta comportamental, há a necessidade de mobilização de mecanismos compensatórios. Entre tais mecanismos pode-se citar o aumento da ventilação branquial (\dot{V}_G), para que ocorra uma adequação entre a demanda de O₂ do animal e a captação adequada desse gás a cada ciclo respiratório, assim como sua distribuição aos tecidos. Conseqüentemente, os peixes, por serem em geral, animais de respiração aquática, são obrigados a promover ajustes cardiovasculares e respiratórios para manter a transferência do O₂ até os tecidos onde este gás é utilizado nos processos aeróbicos (FERNANDES & RANTIN, 1989).

Em geral, os peixes respondem à hipóxia ambiental com um aumento da frequência respiratória (f_R) e/ou amplitude ventilatória (V_T) para elevar o volume de água que passa através das lamelas secundárias das brânquias. Concomitantemente ocorre uma redução da frequência cardíaca (f_H). Essa bradicardia causa um aumento no tempo de passagem do sangue através das brânquias que resulta em uma maximização na eficiência da transferência do O₂ da água para os capilares lamelares e daí para a circulação sistêmica (CAMPBELL & EGGINTON, 2007; TAYLOR et al., 1999).

Os teleósteos mais tolerantes à hipóxia respondem às reduções do O₂ ambiental com um aumento na \dot{V}_G (hiperventilação) causada por um maior incremento no V_T do que na f_R . Este mecanismo compensatório parece ser menos custoso do ponto de vista energético (RANTIN et al., 1992).

1.2. Quimiorrecepção de O₂

Para que os animais obtenham o O₂, para atender adequadamente as demandas metabólicas, é necessário que eles “sintam” e respondam às diferentes concentrações desse gás tanto no ambiente quanto no sangue arterial. Em peixes, é preciso um fino controle nas trocas gasosas branquiais devido ao baixo conteúdo de O₂ na água e a grande variação espacial e temporal na disponibilidade deste gás nesse meio (BURLESON et al., 1992).

O monitoramento frente às mudanças na PO_2 , tanto interna quanto externamente, é feito por meio de quimiorreceptores que fornecem um sinal para que ocorra uma mudança nas respostas fisiológicas e comportamentais. Estas incluem regulação da \dot{V}_G e da f_H , bem como locomoção e alterações hormonais (GILMOUR & PERRY, 2007).

Os reflexos desses receptores envolvem a detecção do estímulo e a transmissão por via aferente da informação sensorial até locais centrais de integração, onde é processada. O centro de integração envia sinais eferentes que comandarão a resposta fisiológica necessária para manter a homeostase do animal, mesmo em situação hipóxica (GILMOUR & PERRY, 2007; MOYES & SCHULTE, 2010). Porém, o entendimento desse mecanismo sensorial e as vias aferentes que medeiam essas respostas cardiorrespiratórias em peixes ainda permanece incompleto (GILMOUR & PERRY, 2007).

Dessa maneira, estes receptores são responsáveis pelo acionamento de mecanismos ventilatórios de compensação, os quais vão atuar na regulação, tanto do fluxo da água através das brânquias, quanto no fluxo de sangue através das lamelas secundárias, garantindo assim uma eficiente relação de ventilação/perfusão através da superfície de troca gasosa (NILSSON & SUNDIN, 1998). Independente do estímulo exato, as respostas ventilatórias são amplas nas diferentes espécies de teleósteos e, aparentemente, devem ser suficientes para manter a PO_2 do sangue arterial durante períodos de hipóxia (MILSON, 1996).

1.3. Localização e identificação dos quimiorreceptores em peixes

A localização anatômica específica e a identificação histológica desses receptores não são completamente conhecidas, mas evidências fisiológicas e farmacológicas apontam as brânquias como principal sítio desses quimiorreceptores

(BURLESON, 2009). Porém há uma variabilidade tanto na distribuição dos receptores entre os diferentes arcos branquiais, em diferentes espécies, bem como a sua localização em cada arco branquial (BURLESON & MILSOM 1993; SUNDIN et al., 2000). Além disso, há evidências de sítios receptores fora do aparato branquial de peixes, incluindo os receptores venosos de O_2 (BARRETT & TAYLOR, 1984) e receptores extrabranquiais, encontrados na cavidade orobranquial em dogfish (BUTLER et al., 1977).

Além disso, os quimiorreceptores podem ser orientados internamente, monitorando a PO_2 do sangue arterial, ou orientados externamente, monitorando a PO_2 da água inspirada, ou ambos (BURLESON & MILSOM, 1993).

Devido à carência de métodos para uma identificação histológica direta dos quimiorreceptores, as áreas dos principais locais onde se encontram esses receptores como as pseudobrânquias (McKENZIE et al., 1991), a vasculatura venosa (BARRETT & TAYLOR, 1984), a arterial aferente (SMATRESK et al., 1986) além das brânquias (estruturas mais investigadas) têm sido sugeridas através de métodos indiretos de identificação desses receptores.

Os arcos branquiais (principal centro de quimiorrecepção) recebem inervação do nervo glossofaríngeo (IX) e do nervo vago (X) (BURLESON et al., 1992; SUNDIN & NILSSON, 2002). O IX envia seus ramos para o primeiro arco branquial e para a pseudobrânquia (quando presente). Já o nervo vago envia seus ramos para todos os arcos branquiais (ROMER, 1962; SUNDIN & NILSSON, 2002) (Figura 3). Os receptores também podem estar presentes na cavidade orobranquial inervados pelo V (trigêmio) e VII (facial) (BUTLER et al., 1977; MILSOM et al., 2002; SUNDIN et al., 1999).

Entre as técnicas usadas para identificação desses receptores estão a remoção seriada de arcos branquiais e a total ou parcial denervação das brânquias. Além disso, a administração de cianeto de sódio (NaCN), um bloqueador da fosforilação oxidativa que interfere na cadeia transportadora de elétrons e estimula a atividade dos quimiorreceptores de O_2 (BURLESON et al., 1992), tem sido amplamente utilizado na identificação, orientação e distribuição desses receptores.

Estudos demonstraram que em truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss*, a remoção do primeiro arco branquial preveniu a bradicardia e o aumento da amplitude ventilatória, durante a hipercarbia (PERRY & REID, 2002). Porém, não só o primeiro par é envolvido nessas respostas cardiorrespiratórias. No elasmobrânquio “dogfish” a

secção bilateral dos nervos cranianos V (trigêmio), VII (facial), IX (glossofaríngeo) e X (vago) aboliu a bradicardia hipóxica e os quimiorreceptores foram encontrados em todos os arcos branquiais e também na cavidade orobranquial (BUTLER et al., 1977). Em catfish, *Ictalurus punctatus*, esses receptores encontram-se distribuídos nos três primeiros pares de arcos branquiais (BURLESON & SMATRESK, 1990). Já o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, apresenta receptores localizados em todos os arcos branquiais, possivelmente na pseudobrânquia e em regiões extrabranquiais (LEITE et al., 2007).

Recentes estudos com espécies tropicais que não possuem pseudobrânquias mostram que os parâmetros respiratórios de algumas espécies são controlados, em parte, por receptores extrabranquiais. A denervação branquial total da traíra, *Hoplias malabaricus*, não elimina as alterações na amplitude ventilatória e de pressão arterial (P_a) durante a hipóxia. De maneira semelhante, o tambaqui, *Colossoma macropomum*, apresenta receptores localizados em todos os arcos branquiais e em regiões extrabranquiais (MILSOM et al., 2002).

Diante disso, não se pode atualmente determinar uma padronização quanto à localização e os padrões de distribuição e orientação dos quimiorreceptores em peixes. Mesmo espécies filogeneticamente muito próximas, às vezes pertencentes ao mesmo gênero, podem apresentar padrões de localização, distribuição e orientação de quimiorreceptores distintos. Como exemplo, podemos citar as diferenças encontradas na traíra e no trairão, *Hoplias lacerdae* (MICHELI-CAMPBELL et al., 2009; SUNDIN et al., 1999) e entre tambaqui e pacu (LEITE et al., 2007; SUNDIN et al., 2000).

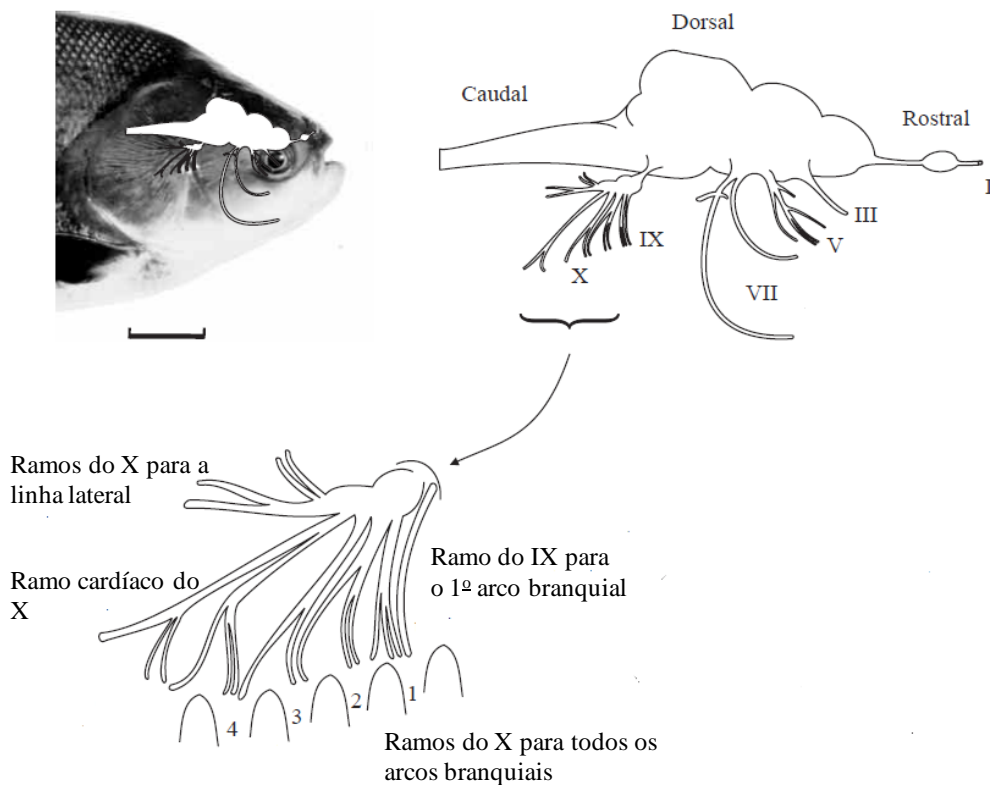


Figura 3. Localização dos nervos cranianos de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Evidência para origem dos nervos na porção dorsal do encéfalo e a inervação dos arcos branquiais (Modificado de MILSOM et al., 2002).

1.4. Quimiorreceptores de mamíferos *versus* quimiorreceptores de peixes

Outro aspecto explorado na literatura são as comparações entre as células quimiorreceptoras de mamíferos (células glomus) com as possíveis células quimiorreceptoras de peixes.

Os quimiorreceptores periféricos de mamíferos são inervados por ramos dos nervos cranianos IX e X e são localizados nos corpos aórticos e na bifurcação das artérias carótidas, nos corpos carotídeos (Figura 4) (BUTLER et al., 1977; MILSOM & BURLESON, 2007). Os arcos branquiais dos peixes são considerados filogeneticamente precursores e homólogos à artéria carótida onde são encontrados os quimiorreceptores periféricos de mamíferos (BURLESON et al., 2006; BUTLER et al., 1977; COOLIDGE et al., 2008; REID & PERRY, 2003; SUNDIN & NILSON 2002).

Além disso, as possíveis células quimiorreceptoras de O₂ do primeiro arco branquial e do corpo carotídeo têm ultra-estrutura similar (BAILLY et al., 1992) e padrões e níveis de descarga nervosa aferente (BURLESON & MILSOM, 1993; MILSOM & BRILL, 1986).

Dessa maneira, pela falta de evidência direta de células quimiorreceptoras sensíveis ao O₂ em peixes, tem-se dado essa possível função às células neuroepiteliais (NECs) encontradas nos arcos branquiais. As NECs apresentam, além da localização, anatomia celular e conteúdo neuroquímico que sugerem essa função quimiorreceptora (BURLESON et al., 2006).

Após a primeira descrição dessas células (DUNEL-ERB et al., 1982) constatou-se que elas se assemelhavam com as células glomus (ou do Tipo I) (Figura 5) e com as células neuroepiteliais encontradas nos pulmões de mamíferos. A partir do seu primeiro registro, as NECs foram detectadas em todos os peixes estudados até o momento, com a maioria dos estudos se concentrando exclusivamente no primeiro arco branquial (COOLIDGE et al., 2008).

Em estudo com catfish, *Ictalurus punctatus*, foram identificadas por meio de técnicas de imunohistoquímica a presença de serotonina (5-HT), enolase neurônio-específica (NSE) e tirosina hidroxilase (TH) nas NECs dessa espécie. A NSE é um marcador comum para células derivadas da crista neural e tem sido usada para diferenciar células do Tipo I das células do Tipo II nas culturas de corpos carotídeos de mamíferos (KONDO et al., 1982). NSE também foram identificadas em *Amia calva* (ZACCONE et al., 1995). A TH é uma enzima limitante para a produção de catecolaminas, amplamente utilizada para confirmar a identidade das células glomus em mamíferos (NURSE, 1990). A 5-HT é um neurotransmissor central e periférico, acredita-se que ela tenha um papel na modulação da descarga dos corpos carotídeos (ZHANG & NURSE, 2000). A presença desses neuroquímicos sustenta a função quimiorreceptora dessas células, mas o papel preciso dessas substâncias na quimiorrecepção de O₂ ainda é pouco conhecido em vertebrados (BURLESON et al., 2006).

Uma importante característica eletrofisiológica dos quimiorreceptores de O₂ é a presença dos canais de K⁺ sensíveis à hipóxia (LOPEZ-BARNEO et al., 1988). A hipótese para a transdução de O₂ sugere que a baixa PO₂ diminua a condutância dos canais K⁺ na membrana causando a despolarização, influxo de Ca²⁺ com subsequente liberação de neurotransmissores e aumento da descarga neural. Várias hipóteses diferentes têm sido propostas para explicar como os canais de K⁺ influenciam na quimiorrecepção de O₂, mas ainda não há um consenso sobre esta função (BURLESON et al., 2006; DONNELLY, 1999).

Desta maneira, nota-se que os reflexos à hipóxia tem sido bem descritos na literatura, porém a caracterização das células que medeiam esses disparos para o acionamento dos mecanismos cardiorrespiratórios e estudos comparativos com vertebrados não-mamíferos são necessários para determinar a variabilidade intra e inter-espécies o que possivelmente ajudaria a uma melhor compreensão dos mecanismos de quimiorrecepção de O_2 (BURLESON et al., 2006).

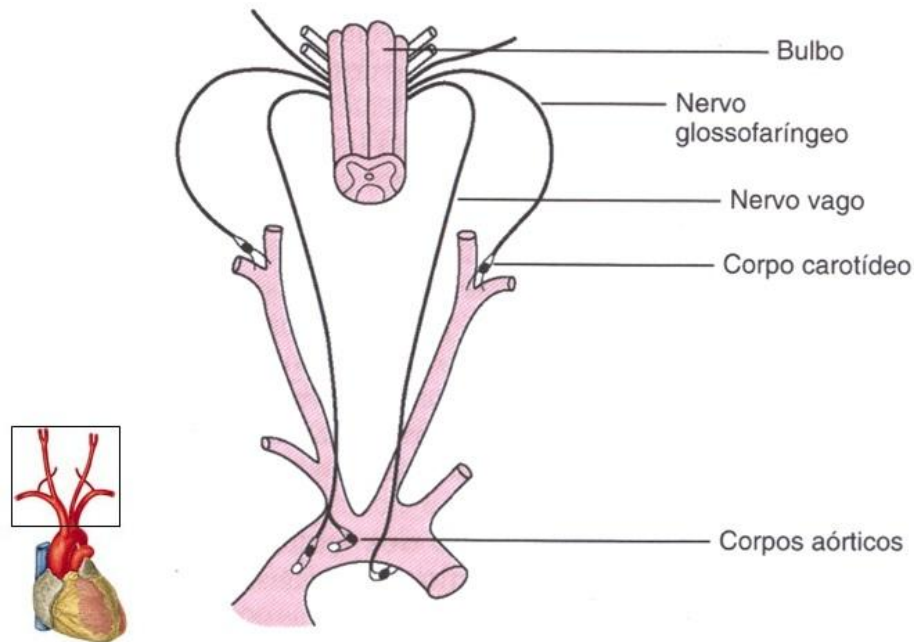


Figura 4. Localização dos quimiorreceptores periféricos em mamíferos (Modificado de GUYTON & HALL, 2006).

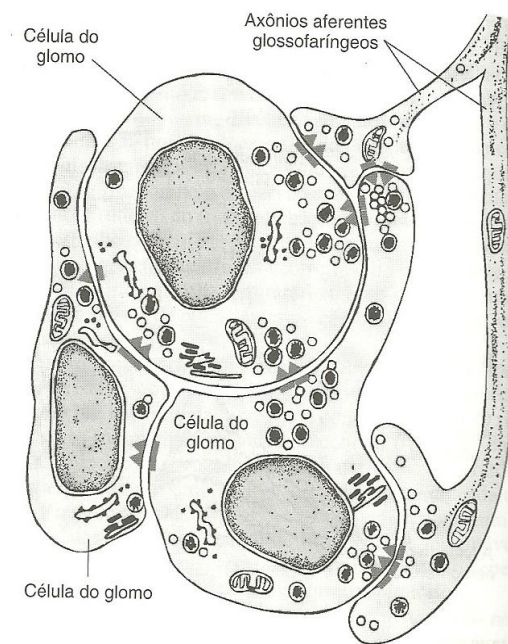


Figura 5. Células quimiorreceptoras de mamíferos (células glomo) (RANDALL et al., 1997).

1.5. A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Figura 6), é uma espécie oriunda da África e foi introduzida em 1971 no nordeste brasileiro onde as condições térmicas da água eram muito semelhantes à de seu habitat original. Pertencente à família *Cichlidae*, ordem *Perciformes*, os peixes do gênero *Oreochromis* são muito tolerantes a variações nos parâmetros abióticos ambientais. A tilápia-do-Nilo é particularmente tolerante a altas temperaturas e baixos níveis de oxigênio dissolvido na água.



Figura 6. Exemplar de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. Fonte: <http://investigacion.izt.uam.mx/ocl/Peces/Fotos/Oreochromis%20niloticus.jpg>

Em muitos países a espécie foi introduzida para o controle da vegetação e, principalmente, para a pesca comercial devido ao seu excelente potencial de aquicultura. A espécie possui um rápido crescimento, resistência ao manejo e a doenças, hábito alimentar onívoro e tolerância a águas de baixa qualidade (CHERVINSKI, 1982).

A eficiência na captação de O_2 na água é diferente entre as espécies e parece depender de fatores abióticos, principalmente temperatura. Fernandes & Rantin (1986a, b) observaram a relação de temperatura com metabolismo em tilápia-do-Nilo. Porém, a taxa metabólica ($\dot{V}O_2$) de *O. niloticus* mostrou-se independente da PO_2 dentro de uma vasta gama de temperaturas, até alcançar baixos valores de tensão crítica de O_2 (P_cO_2) a qual, a 25 °C, está em torno de 18 mmHg. Essa baixa P_cO_2 do ponto de vista ecológico é muito importante uma vez que ela denota, pelo menos em parte, a sua ampla distribuição e capacidade de habitar ambientes tropicais, normalmente submetidos a hipóxia (FERNANDES & RANTIN, 1987).

Essa espécie se mostra muito eficiente na captação de O_2 do ambiente, apresentando altos valores de extração de O_2 da corrente ventilatória (75-85%) em condições normóxicas e em hipóxia moderada. Estes valores de EO_2 são maiores do que os encontrados na maioria das espécies de peixes já estudadas (FERNANDES & RANTIN, 1989). Nessas condições, estudos apontam que numa faixa de 20 a 35 °C a \dot{V}_G é menor em tilápia-do-Nilo se comparada com outros teleósteos, como por exemplo a traíra (RANTIN & JOHANSEN, 1984) e o trairão (RANTIN & FERNANDES, 1986). Além disso, tilápia-do-Nilo apresenta um grande potencial para aumentar a \dot{V}_G mantendo a EO_2 constante, o que, segundo Steffensen et al. (1982), é característico de espécies muito tolerantes à hipóxia.

Embora as respostas cardiorrespiratórias da tilápia-do-Nilo já estejam bem elucidadas, os mecanismos de sensoriamento do O_2 ambiental por esta espécie ainda não são conhecidos. Também está por ser elucidado como os quimiorreceptores envolvidos nas respostas à hipóxia medeiam as respostas cardiorrespiratórias frente às reduções do O_2 no ambiente.

Para isso, o objetivo principal do presente trabalho é identificar os quimiorreceptores de O_2 branquiais, bem como sua distribuição (se estão restritos ao primeiro arco branquial ou difundidos por toda a superfície branquial) e a orientação

desses receptores (se detectam as variações de O_2 na corrente ventilatória e/ou no sangue).

2. Objetivos

Os objetivos do projeto foram:

a. Determinar a distribuição dos quimiorreceptores, ou seja, se estão restritos ao primeiro par de arcos branquiais ou distribuídos pelos 4 pares de arcos.

b. Avaliar como esses quimiorreceptores de O_2 branquiais medeiam as alterações das variáveis cardiorrespiratórias ($\dot{V}O_2$, \dot{V}_G , V_T , EO_2 , f_R , f_H) em resposta à hipóxia gradual.

c. Determinar se os quimiorreceptores branquiais de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* estão orientados internamente (monitorando as variações da PO_2 no sangue) ou externamente (monitorando a PO_2 na água que passa pelas brânquias)

3. Material e Métodos

3.1. Coleta e manutenção em laboratório

No presente estudo foram utilizados cerca de 40 exemplares de tilápia-do-Nilo (Wt ~ 220 - 260g) obtidos na estação de piscicultura do município de Santa Cruz da Conceição (Estado de São Paulo). No Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar, os peixes foram mantidos em tanques de 1.000 L, com fluxo contínuo de água normóxica ($P_wO_2 \sim 140$ mmHg) não clorada, a 25 ± 1 °C. Os animais foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial. Antes da execução dos protocolos experimentais, os peixes foram mantidos em jejum por 48 h para evitar a eliminação de produtos de excreção dentro dos sistemas experimentais.

3.2. Procedimentos cirúrgicos:

3.2.1. Implantação de cânulas de polietileno e eletrodos de ECG para a determinação dos parâmetros cardiorrespiratórios:

Nestes experimentos os animais foram separados em dois grupos: controle (n = 10, Wt = $258,4 \pm 7,4$ g) e operado (n = 10, Wt = $232,5 \pm 8,7$ g). Para a identificação da distribuição dos quimiorreceptores ambos os grupos foram submetidos à hipóxia, sendo denominado, dessa maneira, “grupo hipóxia” o conjunto de animais (controle e operado) que foram submetidos à essa condição.

Para identificarmos a orientação dos quimiorreceptores, um outro grupo de animais controle (n = 10, Wt = $259,6 \pm 6,2$ g) e operado (n = 10, Wt = $248,7 \pm 6,5$ g) foram submetidos a outros procedimentos cirúrgicos e protocolos experimentais. Estes animais (tanto controle quanto os operados) foram submetidos às injeções de NaCN e foram designados “grupo cianeto”. A denominação “grupo cianeto” e “grupo hipóxia” foi somente utilizada para a diferenciação dos protocolos e procedimentos cirúrgicos.

Ambos os grupos de peixes “hipóxia e cianeto” foram previamente anestesiados em solução de benzocaína (1g diluída em 10 L de água) até que seus movimentos ventilatórios cessassem. Em seguida, foram transferidos para uma mesa cirúrgica, e suas brânquias foram ventiladas artificialmente com uma solução mais fraca de benzocaína (0,5 g diluída em dez litros de água).

Nos animais do “grupo hipóxia” foi introduzida uma cânula de polietileno (PE 90) dentro da cavidade bucal através de uma perfuração na região dorsal no palato e

outras duas nas bordas dos opérculos (Figura 7). As cânulas foram fixadas com uma flange (trava) e com cola de secagem rápida (Super Bonder[®]). A cânula bucal foi utilizada para medir a frequência respiratória (f_R) e coletar amostras de água antes de passar pelas brânquias (água inspirada). As cânulas operculares serviram para coletar amostras da água que já passaram pelas brânquias (água expirada). Como as medidas da frequência cardíaca foram determinadas por eletrocardiografia, implantou-se na pele e suturou-se com pontos cirúrgicos eletrodos de ECG na seguinte seqüência: O eletrodo principal foi inserido ventralmente entre as brânquias e o coração, enquanto que o de referência foi inserido em uma posição ventrocaudal, próximo às nadadeiras pélvicas (GLASS et al., 1991; RANTIN et al., 1993). Esta preparação resulta em um eletrocardiograma com as características da derivação D1 da eletrocardiografia padrão.

Nos animais do “grupo cianeto” também se introduziu um cateter de polietileno (PE 90) dentro da cavidade bucal por meio de uma perfuração no palato, feita com o auxílio de uma broca. A cânula foi fixada com uma flange (trava) e com cola de secagem rápida (Super Bonder[®]). Esta cânula bucal foi utilizada para medir a f_R , a amplitude ventilatória (V_{amp}) e para a administração intrabucal de água e NaCN. Também canulou-se (PE 10) a veia caudal de *Oreochromis niloticus* para a administração intravenosa de salina e NaCN. Para esta canulação foi feita uma incisão de cerca de 1 cm com um bisturi abaixo da linha lateral e na altura do ânus dos peixes (Figura 8). A musculatura foi espaçada com o auxílio de um afastador cirúrgico para a observação e posterior canulação do vaso. Para a determinação da f_H implantou-se e suturou-se na pele eletrodos de ECG na mesma posição descrita acima.

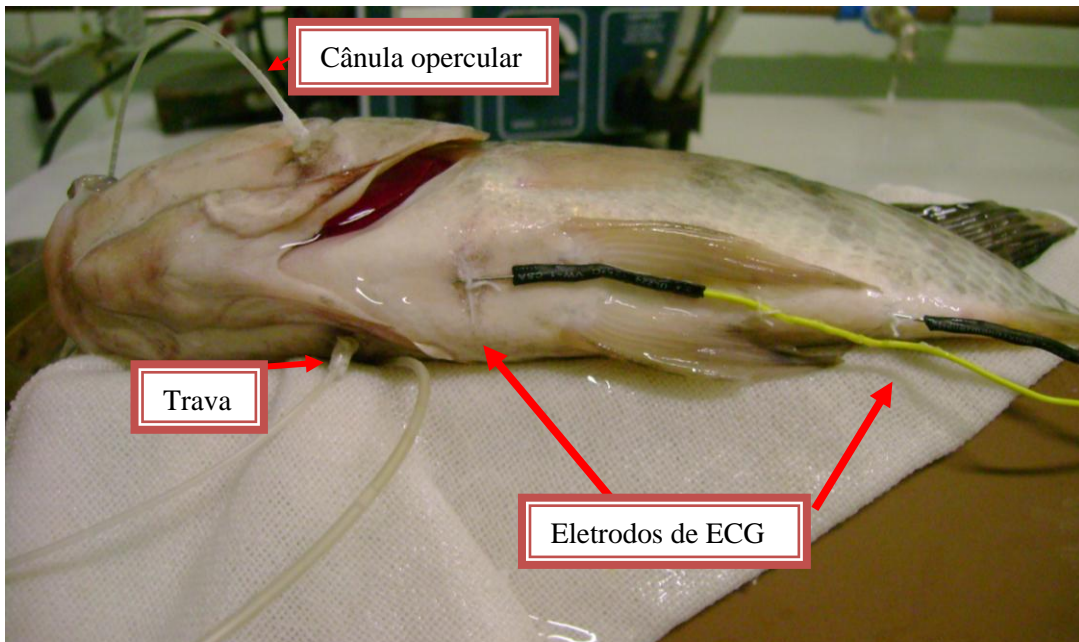


Figura 7. Localização das cânulas de polietileno operculares com destaque para fixação dos cateteres feito através das travas e posição dos eletrodos de ECG em *Oreochromis niloticus*.

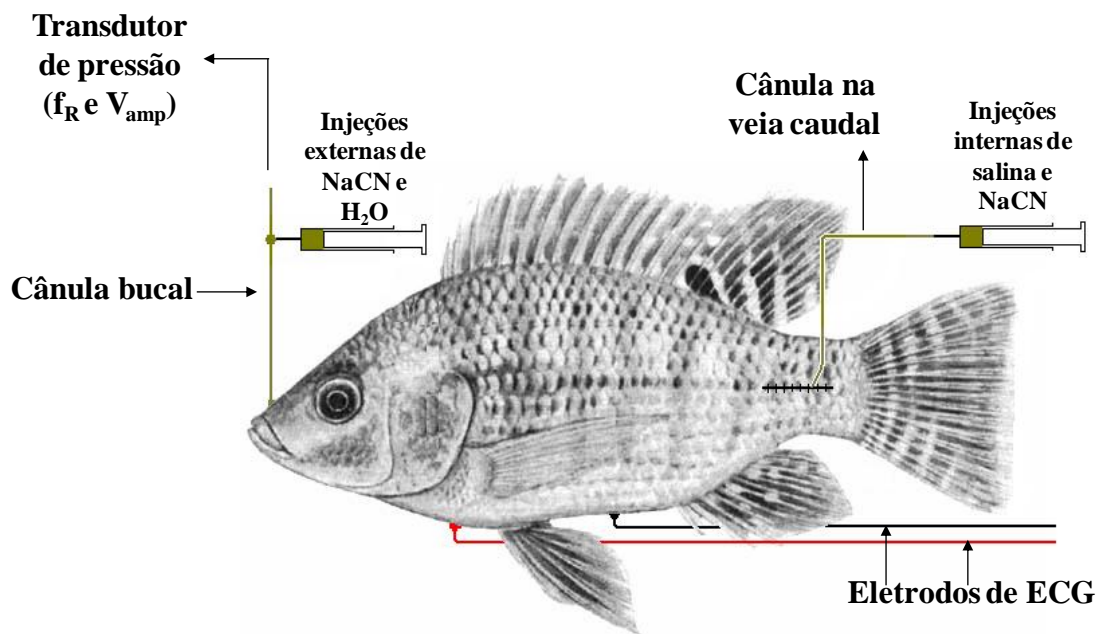


Figura 8. Localização das cânulas de polietileno e posição de eletrodos de ECG no grupo de *Oreochromis niloticus* submetido às injeções de NaCN.

3.2.2. Ablação dos primeiros arcos branquiais:

Para testar se os quimiorreceptores de *Oreochromis niloticus* estão restritos ao primeiro par de arcos branquiais, estes foram extirpados de acordo com o método descrito por Perry & Reid (2002). Em estudos realizados com traíra (SUNDIN et al., 1999), tambaqui (SUNDIN et al., 2000) e pacu (LEITE et al., 2007) os nervos cranianos (IX para o 1^o arco branquial e X para o 1^o e demais arcos) que inervam as brânquias puderam ser seccionados, provocando a denervação das mesmas e, conseqüentemente, as aferências dos quimiorreceptores de O₂, para uma posterior análise de parâmetros relacionados a esses receptores. Na tilápia-do-Nilo o acesso aos nervos cranianos não é possível devido à anatomia da espécie. O acesso aos nervos cranianos somente seria possível com a remoção da musculatura ventilatória que os recobre, o que causaria sérios danos à mecânica ventilatória e, como consequência, ao V_T e à \dot{V}_G .

Antes da ablação do primeiro par de arcos os peixes foram anestesiados como descrito em 3.2.1. Inicialmente os arcos foram presos com duas pinças hemostáticas (Figura 9) nas suas extremidades ventrais e dorsais e então removidos com tesoura. Em seguida, os cotos foram cauterizados (Figura 10) para se evitar hemorragia e nos mesmos passou-se com um cotonete uma pomada antifúngica (Trok - cetoconazol e dipropionato de betametasona) e antibiótico Rifamicina (10mg/mL Solução Topica Spray Frasco 20 mL) para impedir uma possível proliferação de fungos e bactérias. Os cotos mostraram uma boa cicatrização (Figura 11). Após a cirurgia (duração aproximadamente de 15 min) o peixe foi devolvido ao tanque para recuperação, no qual ficou por quatro dias antes de ser submetido aos protocolos experimentais. Nos dois dias seguintes ao procedimento, os animais operados foram alimentados, respeitando, assim, 48h de jejum antes dos protocolos experimentais. Os animais operados, tanto do “grupo hipóxia” quanto do “grupo cianeto”, foram submetidos a esse procedimento cirúrgico de remoção bilateral do primeiro arco branquial.

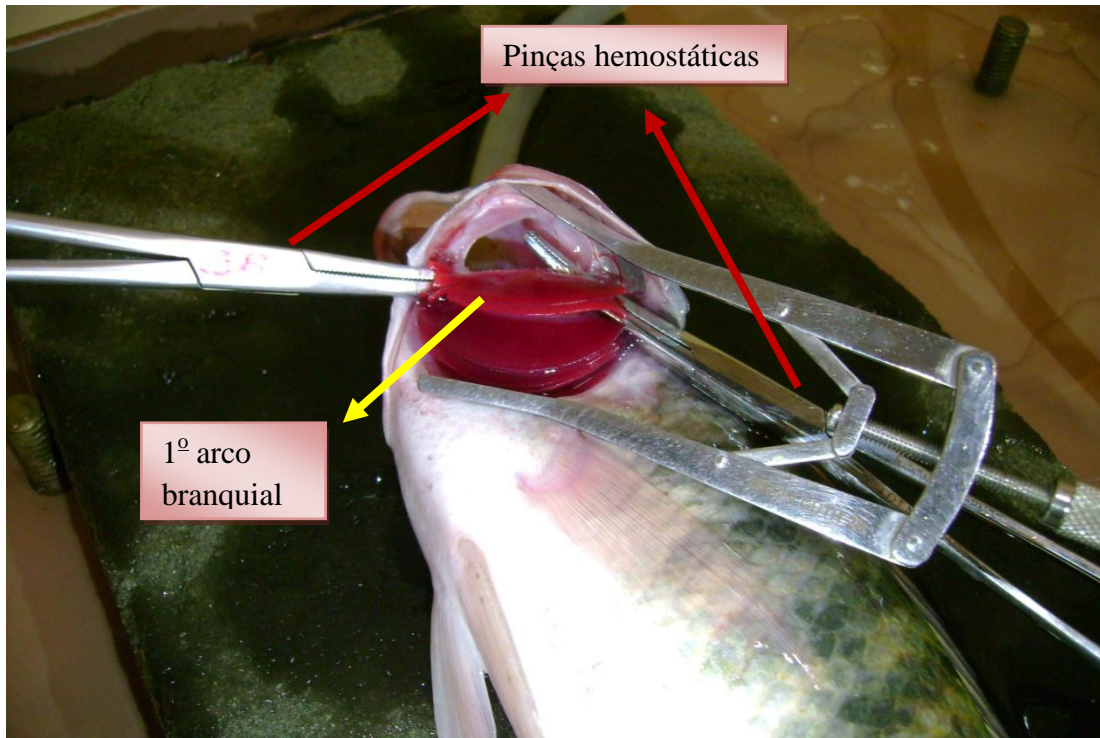


Figura 9. Técnica para remoção bilateral do primeiro arco branquial.

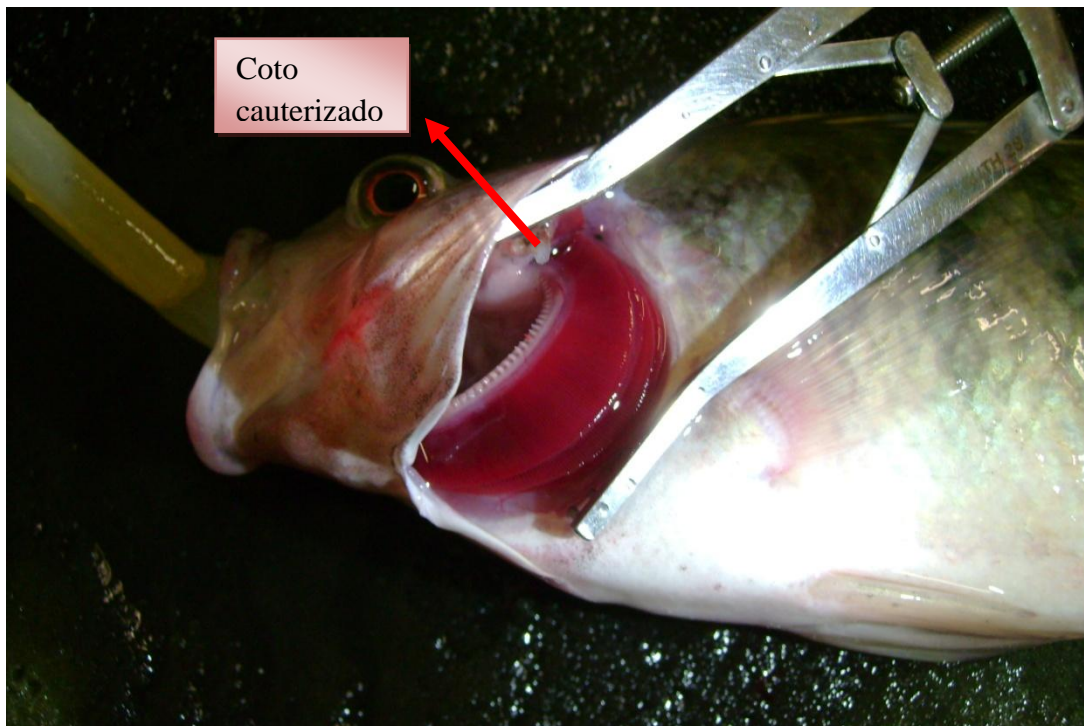


Figura 10. Tilápia-do-Nilo após remoção do primeiro arco branquial.



Figura 11. Tilápia-do-Nilo após quatro dias de recuperação do procedimento de remoção do primeiro par de arcos branquiais.

3.3. Medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios em hipóxia:

3.3.1. Tomada de O_2 – $\dot{V}O_2$

Após os procedimentos cirúrgicos os peixes do “grupo hipóxia” foram introduzidos individualmente no interior de um respirômetro de fluxo constante (Figura 12) e este posicionado dentro de um tanque experimental (Figura 13). Em seguida os peixes foram deixados em repouso, no período noturno, por pelo menos 12 h para recuperação da anestesia. As medidas da PO_2 da água de entrada do respirômetro (P_eO_2 – mmHg), de saída do respirômetro (P_sO_2 – mmHg) juntamente com as $P_{insp}O_2 = PO_2$ (mmHg) da água inspirada (cânula bucal) e $P_{exp}O_2 = PO_2$ (mmHg) da água expirada (cânulas operculares) foram monitoradas através da conexão dessas cânulas e de cateteres que coletavam a água da entrada e saída do respirômetro por uma torneira de três vias conectada ao eletrodo de O_2 do analisador de O_2 FAC-204A (FAC, São Carlos, SP) que teve seu eletrodo calibrado com solução de Borax e sulfito de sódio (solução com 0 mmHg de O_2) e com água saturada de O_2 (~ 140 mmHg) (Figura 14). O fluxo constante de água através do respirômetro foi regulado em função da manutenção adequada de uma diferença de aproximadamente 30% entre a P_eO_2 e P_sO_2 . A tomada de O_2 foi calculada como:

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

onde: α = coeficiente de solubilidade do O_2 na temperatura experimental e pressão barométrica local; V_R = fluxo através do respirômetro e Wt = peso dos animais. Os valores de $\dot{V}O_2$ foram expressos em $mLO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$.

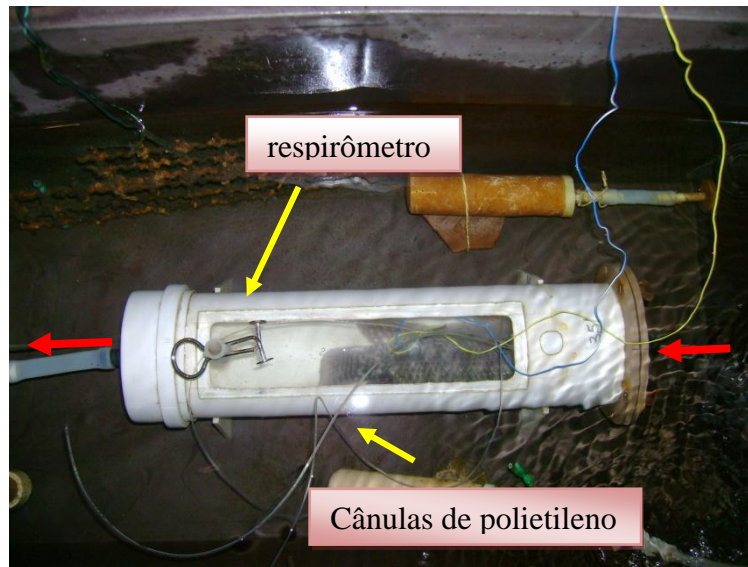


Figura 12. Tanque experimental com destaque para respirômetro e direção do fluxo de água que passa através dele (setas vermelhas).

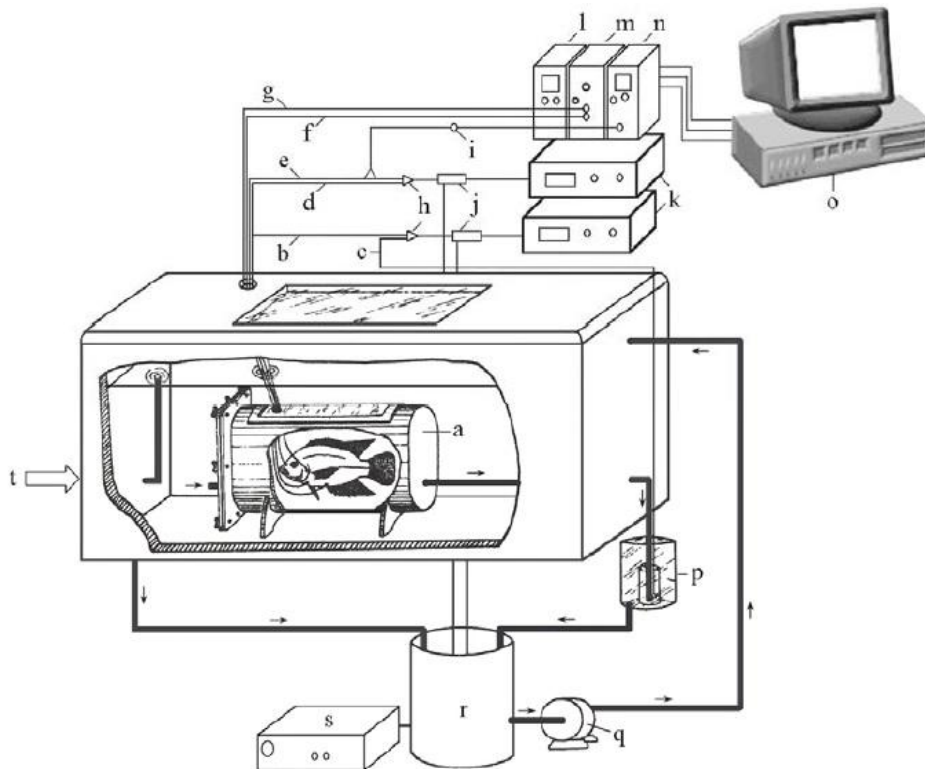


Figura 13. Sistema de respirometria de fluxo constante utilizado para a obtenção dos parâmetros cardiorrespiratórios em diferentes condições (tensões de O_2 no presente estudo). **a.** respirômetro, **b.** cânula de polietileno para coleta de amostra de água que entra (P_eO_2) no respirômetro, **c.** cânula de polietileno para coleta de amostra de água que sai (P_sO_2) do respirômetro, **d.** cânula de polietileno bucal para coleta de amostra de água inspirada ($P_{insp}O_2$), **e.** cânula de polietileno opercular para coleta de amostra de água expirada ($P_{exp}O_2$), **f.g.** eletrodos para obtenção da f_H , **h.** torneira de 3 vias, **i.** transdutor de pressão, **j.** cuvetas com eletrodos de O_2 , **k.** analisadores de O_2 , **l,m,n.** sistema de aquisição de dados **o.** computador para aquisição de dados em tempo real, **p.** frasco para ajuste de fluxo, **q.** bomba para circulação de água, **r.** balde para manter a mesma água circulando **s.** controlador de temperatura, **t.** entrada por borbulhamento de quantidades de N_2 ou O_2 comprimido. (Adaptado de Massari et al., 1998).

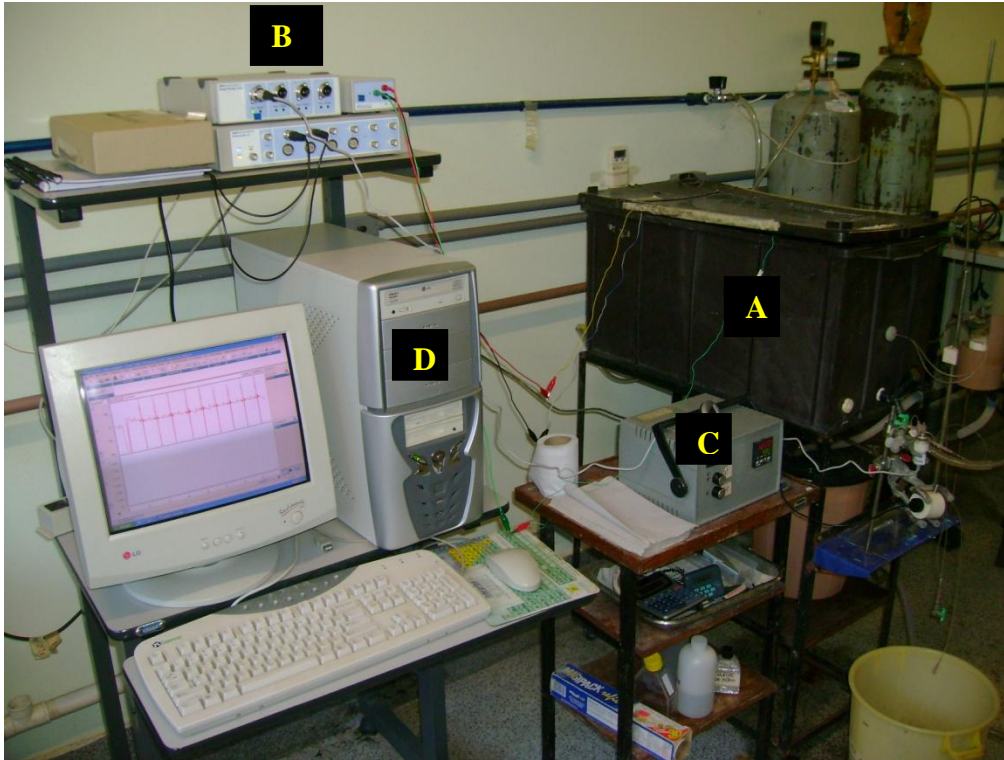


Figura 14. Set experimental, demonstrando sistema de respirometria de fluxo constante. A- tanque experimental, B- Sistema de aquisição de dados Power-Lab (ADInstruments) C- Analisador de O₂, D- Computador.

3.3.2. Frequência respiratória - f_R

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 - Quad Bridge Amp (ADInstruments modelo: ML224) contando-se os picos de pressão positiva durante o ciclo respiratório. A f_R foi expressa em resp.min⁻¹.

3.3.3. Ventilação branquial - \dot{V}_G

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

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

onde: $P_{insp}O_2 = PO_2$ (mmHg) da água inspirada (cânula bucal conectada ao eletrodo de O₂ do analisador de O₂ acima mencionado) e $P_{exp}O_2 = PO_2$ (mmHg) da água expirada (cânula opercular conectada ao eletrodo de O₂ do analisador de O₂ acima mencionado). Os valores de \dot{V}_G foram expressos em mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹.

3.3.4. Volume ventilatório - V_T

O Volume ventilatório – V_T foi calculado dividindo-se a \dot{V}_G pela f_R e foi expresso por mLH₂O.kg⁻¹.resp⁻¹.

3.3.5. Extração de O₂ pela corrente ventilatória – EO_2

A extração de O₂ da corrente ventilatória (EO_2) pelas brânquias foi calculada através da seguinte equação:

$$EO_2 = 100.(P_{\text{insp}}O_2 - P_{\text{exp}}O_2)/P_{\text{insp}}O_2$$

Os dados de EO_2 foram expressos em %.

3.3.6. Frequência cardíaca – f_H

A frequência cardíaca (f_H) foi registrada conectando-se dois eletrodos de ECG implantados nos peixes a um bio-amplificador (Animal Bio Amp – ADInstruments) que enviou sinal para o computador através de um sistema de aquisição de dados (Power lab -ADInstruments). Os valores de f_H foram obtidos pela contagem dos complexos QRS do ECG e expressos em bpm (batimentos por minuto).

3.3.7. Medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios nos peixes operados do grupo hipóxia:

Para se testar o efeito da remoção dos primeiro par de arcos branquiais, o grupo de animais operados do “grupo hipóxia”, decorrido os 4 dias de recuperação, foram submetidos à implantação de cânulas e eletrodos de ECG (como no grupo controle) e colocados no interior do respirômetro no tanque experimental. Após aproximadamente 12h (recuperação da cirurgia) foram submetidos aos mesmos experimentos e tensões de O₂ envolvendo medidas da $\dot{V}O_2$, f_R , \dot{V}_G , V_T , EO_2 e f_H aos quais foram submetidos os animais do grupo controle.

3.4. Medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios após injeções de NaCN:

Para verificar a orientação dos quimiorreceptores, ambos os grupos, controle e operado, do “grupo cianeto” foram colocados individualmente em uma caixa experimental com as faces frontal e distal perfuradas na qual foi mantido um fluxo de água constante e aerado. Os peixes foram mantidos nessas condições por 24 h para a

recuperação da cirurgia e somente após esse período foram realizados os protocolos experimentais. Durante o período de recuperação e de experimento a caixa experimental permaneceu coberta com um plástico preto para evitar interferências externas (Figura 15).

Para o grupo operado foi respeitado o mesmo período (4 dias) de recuperação da cirurgia de remoção do primeiro arco branquial para que fosse feita a cirurgia com as canulações e implantação dos eletrodos de ECG. Após essa cirurgia, assim como no grupo controle, os peixes foram colocados nas caixas experimentais onde permaneceram por um período de 24 h antes da realização dos protocolos experimentais.

3.4.1. Frequência respiratória – (f_R)

A frequência respiratória foi medida do mesmo modo que do grupo submetido à hipóxia (ver 3.3.2) por meio de registros da variação da pressão intra-bucal. A f_R foi expressa em resp.min⁻¹.

3.4.2. Amplitude ventilatória – (V_{amp})

A amplitude ventilatória foi medida por meio da diferença entre o pico e o vale de cada onda de respiração, em cada intervalo de tempo pós-injeção. A V_{amp} foi expressa em mmHg.

3.4.3. Frequência cardíaca – f_H

A frequência cardíaca foi registrada do mesmo modo do grupo submetido à hipóxia (ver 3.3.6.). Os valores de f_H foram obtidos pela contagem dos complexos QRS do ECG e expressos em bpm (batimentos por minuto).



Figura 15. “Set” experimental para identificar a orientação dos quimiorreceptores em *Oreochromis niloticus*.

3.5. Protocolos Experimentais

3.5.1. Respostas cardiorrespiratórias à hipóxia:

Tanto o grupo controle após recuperação (aproximadamente 12h) da cirurgia de implantação de cânulas quanto o grupo de peixes operados foram submetidos às seguintes P_eO_2 : 140 (normóxia), 100, 70, 50, 30 e 20 mmHg, por 40 min cada tensão. A f_R e a f_H foram monitoradas continuamente e as demais variáveis ($\dot{V}O_2$, \dot{V}_G , V_T e EO_2) foram calculadas com base nas medidas (P_eO_2 , P_sO_2 , $P_{insp}O_2$, $P_{exp}O_2$ e f_R) obtidas nos últimos 3 min de cada tensão. As diferentes P_eO_2 foram obtidas por borbulhamento controlado de N_2 na água do tanque experimental.

3.5.2. Respostas cardiorrespiratórias ao NaCN:

Após o período de recuperação (24 h) dos procedimentos cirúrgicos, as cânulas bucal e os eletrodos de ECG foram conectados ao sistema de aquisição de dados para o registro dos parâmetros cardiorrespiratórios. As variáveis f_R , V_{amp} e f_H foram

monitoradas continuamente. Após a conexão das cânulas foi esperado cerca de 30 min para o restabelecimento dos parâmetros a um nível basal.

Após esse período, as injeções de NaCN foram iniciadas na seguinte sequência: a. 0,5 mL intravenoso de salina (0,9%); b. 0,5 mL intravenoso de NaCN ($750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NaCN em salina); c. 1,0 mL intrabucal de água e d. 1,0 mL intrabucal de NaCN ($750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NaCN em água). Após as injeções de NaCN as cânulas foram lavadas com salina (0,3 mL internamente) e 1 mL de água (externamente) para garantir a completa administração da droga. A concentração de NaCN utilizada nas injeções foi obtida por meio de curva dose-resposta previamente determinada (TANAJURA, 2008). O controle das injeções internas foi feito com salina (0,9%) e das injeções externas com água retirada da caixa experimental.

3.6. Análise dos dados

As variáveis ventilatórias do grupo exposto à hipóxia foram medidas nos últimos 3 min de cada tensão. Os parâmetros cardiorrespiratórios do grupo submetido às injeções de NaCN foi registrado continuamente e a análise foi feita 30 s antes de cada injeção para determinar os valores basais (pré-injeção) e em intervalos de 10 em 10 s no primeiro min e nos últimos 30 s do 2º, 3º, 4º e 5º min após cada injeção.

Os dados de ambos os grupos foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Após a análise exploratória (gráfico *Box-plot*) os dados foram analisados por meio de modelo misto sob o enfoque de medidas repetidas (FREITAS et al., 2005).

No grupo exposto à hipóxia foi utilizado o teste de comparação múltipla de Dunnet. Este teste mostrou se havia diferença significativa no mesmo parâmetro cardiorrespiratório comparando os valores de normóxia com os valores nas diferentes tensões de O_2 , dentro do mesmo grupo experimental. Para verificar se havia diferença significativa entre os grupos controle e operado foi utilizado o teste de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Neste teste comparou-se cada variável cardiorrespiratória de cada grupo em cada tensão de O_2 .

No grupo submetido às injeções de NaCN os dados também foram analisados por meio de modelo misto sob o enfoque de medidas repetidas. Foi utilizado o teste de Dunnet para a comparação dos valores basais (tempo zero) com os valores pós-injeção (demais intervalos de tempo) dentro de cada injeção e grupo. O teste de Tukey foi utilizado para verificar se havia diferença entre os dois grupos experimentais,

comparando os valores de cada intervalo de tempo e cada variável. O nível de significância adotado foi de $P \leq 0,05$. Para a análise dos dados foi usado o software R.

4. Resultados e Discussão

4.1. Parâmetros ventilatórios de *Oreochromis niloticus* à hipóxia gradual nos grupos controle e operado.

4.1.1. Consumo de O₂ - $\dot{V}O_2$

Os valores médios da tomada de O₂ ($\dot{V}O_2$ - mL O₂.kg⁻¹.h⁻¹) frente à hipóxia gradual podem ser vistos na tabela 1 e estão graficamente representados na figura 16. Analisando estes resultados observamos que o grupo controle apresentou uma $\dot{V}O_2$ relativamente constante (~ 58 mL O₂.kg⁻¹.h⁻¹) frente à diminuição da PO_2 da água inspirada. Valores semelhantes foram encontrados por Fernandes & Rantin (1989), porém menores do que os demonstrados por Martins et al. (2011) e Thomaz et al. (2009).

O grupo operado apresentou o mesmo padrão de resposta que o grupo controle, com uma $\dot{V}O_2$ constante e considerada significativamente menor em relação à normóxia apenas nas últimas $P_{insp}O_2$ ($25,7 \pm 0,7$ e $17,0 \pm 0,5$ mmHg - tabela 1). Porém, ao compararmos os dois grupos (controle e operado) observamos que o grupo operado apresentou uma $\dot{V}O_2$ menor (~ 13% em normóxia), mas considerada significativamente diferente somente na $P_{insp}O_2$ de $17,0 \pm 0,5$ mmHg na qual mostrou uma redução de 21% comparada aos valores do grupo controle nessa tensão mais hipóxica.

Os peixes, quando não conseguem fugir dessa situação de hipóxia ambiental através de uma resposta comportamental à procura de ambientes com maior disponibilidade de O₂, acionam ajustes cardiorrespiratórios. Essas estratégias incluem um aumento da taxa ventilatória (hiperventilação) e redução da frequência cardíaca (bradicardia) (FERNANDES & RANTIN, 1987; MILSOM 1996; TAYLOR, 1985). Com essas respostas o peixe consegue regular a quantidade de água que passa por suas brânquias assim como aumentar a perfusão sanguínea desse órgão (REID et al., 2006). Essas compensações cardiorrespiratórias visam a manutenção de uma tomada adequada de O₂ para suprir as demandas desse gás nos tecidos.

Segundo Hughes (1973), os peixes teleósteos mostram dois diferentes padrões de resposta da $\dot{V}O_2$ frente à hipóxia e, de acordo com essas respostas, são classificados como “conformistas” ou “reguladores”. Os peixes considerados conformistas diminuem o consumo de O₂ na mesma proporção das reduções da PO_2 da água inspirada. Por outro lado, os reguladores conseguem manter estável ou mesmo aumentar a $\dot{V}O_2$ em

resposta a hipóxia gradual, até atingir uma tensão crítica de O_2 (P_cO_2). A P_cO_2 representa a tensão de O_2 abaixo da qual o animal não consegue mais ajustar seus parâmetros cardiorrespiratórios, tornando-se dependente da quantidade de O_2 na água (FERNANDES & RANTIN, 1987). Como na maioria dos peixes teleósteos já estudados, a tilápia-do-Nilo é considerada uma espécie reguladora que, a partir da tensão de O_2 de 20 mmHg, mostra uma queda significativa da $\dot{V}O_2$, observada em ambos os grupos.

Ao compararmos os dois grupos constata-se a diminuição da $\dot{V}O_2$ no grupo operado, o que pode ser associado com a Lei de Fick. Esta lei descreve a taxa de difusão de um gás através das brânquias:

$$J = \frac{D \cdot A \cdot \Delta p}{x}$$

Esta equação relaciona a taxa de difusão (J - mols. seg^{-1}), com a constante de difusão (D - $cm^2 \cdot seg^{-1}$) do respectivo gás, a área (A - cm^2) na qual ocorre a difusão, a diferença entre a PO_2 do sangue e da água (Δp - mmHg) e a distância (x -cm) através da qual a difusão ocorre (BRAUNER & VAL, 2006; WITHERS, 1992).

Segundo a Lei de Fick, a taxa de difusão é proporcional a área de troca gasosa. A ablação do primeiro par de arcos branquiais diminui a superfície respiratória em aproximadamente 30% (DUTHIE & HUGHES, 1987). Dessa maneira, ocorre uma diminuição da taxa de difusão, (mesmo que desproporcional em termos percentuais) devido à redução do número de lamelas secundárias, e conseqüentemente uma diminuição do consumo de O_2 .

O efeito da redução da área branquial na taxa metabólica foi estudado em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e observou-se diminuição na $\dot{V}O_2$ apenas quando o animal foi submetido à natação e mostrou uma $\dot{V}O_{2 \text{ máx}}$ (consumo de oxigênio máximo consumido na maior velocidade suportada pelo animal) reduzida quando comparada com animais intactos (DUTHIE & HUGHES, 1987). Uma redução na $\dot{V}O_2$ no grupo de trutas com o primeiro arco removido não foi constatada, exceto durante exercício, indicando que a área total da superfície branquial não é utilizada em condições de repouso (HUGHES, 1984). Esse trabalho enfatiza a importância da adequada perfusão sanguínea durante exercício e a necessidade de toda a superfície branquial no recrutamento de áreas lamelares não utilizadas, indispensáveis durante essa atividade (DUTHIE & HUGHES, 1987).

No presente trabalho, nota-se a mesma tendência de resposta nos animais operados. Apesar de observarmos uma redução da $\dot{V}O_2$, este parâmetro só foi considerado significativamente diferente do controle na tensão mais hipóxica. Isto demonstra a capacidade que *Oreochromis niloticus* possui para adequar a perfusão sanguínea nas lamelas secundárias conjuntamente com a ventilação branquial fazendo com que haja uma relevante diminuição da $\dot{V}O_2$ somente na tensão mais hipóxica. Essa resposta ressalta a importância e imprescindível presença do primeiro arco branquial em situações mais extremas.

Além disso, de acordo com estudos morfométricos relacionados à função branquial nota-se que este órgão não é estruturalmente homogêneo. Por exemplo, o tamanho individual da lamela secundária varia, bem como o seu número por filamento e por arco branquial. De modo semelhante, a circulação branquial é um sistema instável que pode ser influenciado por fatores nervosos e hormonais (HUGHES et al., 1978). Conseqüentemente, a área de troca de gases em cada porção branquial torna-se diferente.

Algumas relações podem ser feitas entre a área de troca gasosa e o volume ventilatório em cada arco branquial. Paling, (1968) utilizando um parasita como marcador, em truta-marrom (*Salmo trutta*) observou que o 2º e o 3º arcos branquiais recebiam um maior volume ventilatório que os demais arcos. Segundo o autor, esse resultado foi esperado já que o 1º e 4º arcos branquiais são cobertos com apenas uma camada de superfície lamelar.

Um estudo relacionando a distribuição de sangue nos arcos branquiais foi feito em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os animais foram submetidos à hipóxia, com PO_2 variando entre 23 e 35 mmHg durante 30 min, e notou-se um fluxo de células sanguíneas menor no 1º par de arcos branquiais e maior fluxo nos demais. Com esse resultado especulou-se que o primeiro arco seria responsável pela regulação da captação de O_2 (BOOTH, 1979).

No presente trabalho torna-se um pouco difícil concluir se há uma maior quantidade de lamelas secundárias nos 2º, 3º e 4º arcos branquiais do que havia no 1º ou se o volume de água e a perfusão sanguínea foi maior em algum ou em todos os arcos, pois essas variáveis não foram medidas. Porém, diante das medidas da $\dot{V}O_2$ supõe-se que houve um aumento no recrutamento lamelar nesses arcos branquiais bem como uma modificação da relação ventilação/perfusão sanguínea tanto em normóxia quanto em

hipóxia. Isso pode ser verificado pela $\dot{V}O_2$ que foi mantida praticamente constante e suficiente para atender as demandas metabólicas e promover o acionamento dos mecanismos compensatórios de ventilação em hipóxia mesmo com a ablação do 1º par de arcos branquiais.

Tabela 1. Valores médios do consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$ mL O_2 .kg $^{-1}$.h $^{-1}$) frente às reduções das tensões de O_2 da água inspirada ($P_{insp}O_2$) nos grupos controle e operado

$\dot{V}O_2$ (mL O_2 .kg $^{-1}$.h $^{-1}$)			
$P_{insp}O_2$ (mmHg)	Controle	$P_{insp}O_2$ (mmHg)	Operado
133,5 ± 1,0	58,3 ± 3,7	132,1 ± 0,5	50,2 ± 3,7
93,0 ± 0,9	58,8 ± 3,4	92,7 ± 0,6	52,4 ± 4,3
63,8 ± 1,4	58,8 ± 3,4	63,1 ± 0,8	53,1 ± 3,4
44,2 ± 1,1	55,3 ± 3,5	41,4 ± 1,1	49,1 ± 3,7
25,0 ± 0,6	49,4 ± 3,7	25,7 ± 0,7	40,4 ± 3,4
15,8 ± 0,6	* 42,5 ± 3,7	17,0 ± 0,5	* 33,5 ± 3,2

Valores em negrito indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia.

(*) Diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios ± SEM.; n = 10 (P ≤ 0,05).

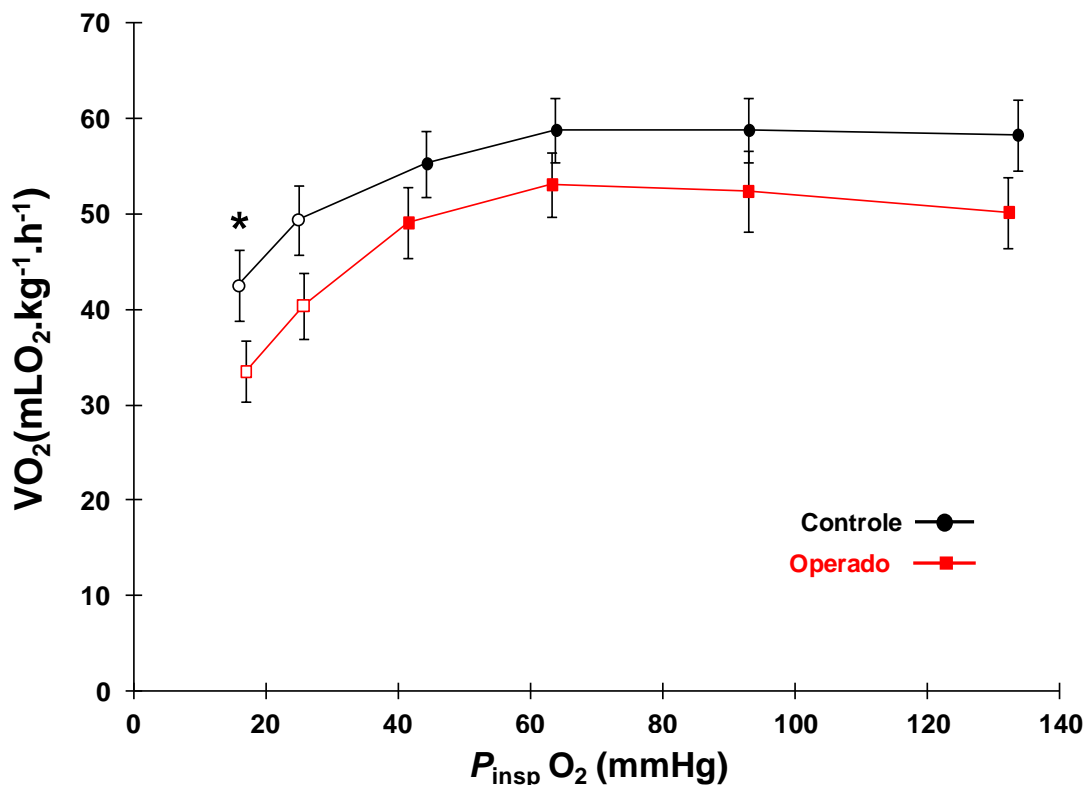


Figura 16. Efeito da redução gradual da PO_2 da água inspirada ($P_{insp}O_2$) sobre o consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$ - mL O_2 .kg $^{-1}$.h $^{-1}$) do grupo controle e operado. Símbolos vazios indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios ± SEM.; n = 10 (P ≤ 0,05).

4.1.2. Ventilação branquial (\dot{V}_G), frequência respiratória (f_R), volume ventilatório (V_T).

Os valores médios da ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹min⁻¹), frequência respiratória (f_R - resp.min⁻¹) e volume ventilatório (V_T - mLH₂O kg⁻¹ resp⁻¹) dos grupos controle e operado frente às reduções na $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ são apresentados na tabela 2 e graficamente na figura 17.

Durante a hipóxia gradual a \dot{V}_G aumentou tanto no grupo controle (~ 696% na $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $15,8 \pm 0,6$ mmHg) quanto no grupo operado (~ 455% na $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $17,0 \pm 0,5$ mmHg). Ambos os grupos apresentaram esse aumento significativo na \dot{V}_G dentro do próprio grupo (comparando-se com os valores normóxicos) a partir da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $44,2 \pm 1,1$ mmHg para o grupo controle e $41,4 \pm 1,1$ mmHg para o grupo operado.

Comparando-se os dois grupos nota-se que o grupo operado apresentou um maior aumento na \dot{V}_G em normóxia do que o grupo controle, alcançando uma diferença de 23% na $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $63,1 \pm 0,8$. Porém, nas $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $25,7 \pm 0,7$ e $17,05 \pm 0,5$ mmHg, o grupo operado não conseguiu elevar tanto a \dot{V}_G quanto o grupo controle, sendo considerada significativamente diferente desse grupo apenas na última $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ citada.

Em hipóxia, a \dot{V}_G aumentou por um maior incremento no V_T do que na f_R , em ambos os grupos. O V_T foi atenuado com a extirpação do 1º arco branquial, com diferença significativa nas últimas duas $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $25,7 \pm 0,7$ e $17,05 \pm 0,5$ mmHg. Porém, em hipóxia esse parâmetro foi elevado cerca de 367% (na tensão mais hipóxica) no grupo operado comparado com seus valores normóxicos.

A f_R manteve-se praticamente constante em ambos os grupos, aumentando apenas nas tensões mais hipóxicas. Ao compararmos os dois grupos nota-se que no grupo operado houve um aumento nos valores de repouso nesse parâmetro, mantendo-se mais elevado (entre 25 e 35%) e diferente significativamente em todas as $P_{\text{insp}}\text{O}_2$, exceto na tensão mais hipóxica ($P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $17,05 \pm 0,5$ mmHg) comparada com o grupo controle.

O fluxo de água através das cavidades bucal e opercular está diretamente relacionado às necessidades metabólicas do peixe, mas em termos mecânicos a \dot{V}_G é determinada pela resistência ao fluxo de água e pelo gradiente de pressão através das cavidades bucal (bomba de pressão), operculares (bomba de sucção) e das próprias brânquias. A resistência branquial é muito maior do que a resistência imposta pelo

aparato bucal e opercular devido à grande área de superfície lamelar e seus estreitos espaços interlamelares. Dessa maneira, a \dot{V}_G é primariamente determinada pela resistência branquial (WITHERS, 1992).

Ao observarmos o grupo operado nota-se que este apresentou uma \dot{V}_G mais elevada em normóxia (embora não diferente em termos significativos), comparado ao grupo controle. Além de haver uma maior necessidade metabólica imposta pela ausência de parte de sua superfície respiratória há o fato de que os peixes sem o 1º arco branquial provavelmente possuem uma redução da resistência branquial, possibilitando que um maior volume de água passe pela câmara branquial, o que é refletido no aumento da \dot{V}_G .

A maioria das espécies de peixes já estudadas é capaz de manter uma $\dot{V}O_2$ constante em resposta à hipóxia gradual através da elevação da \dot{V}_G . Essa estratégia de aumento de volume de água em contato com a superfície respiratória por unidade de tempo aumenta a taxa ventilação-perfusão sanguínea, a qual está intimamente relacionada com a transferência de O_2 da água para os tecidos. Frente à hipóxia, a taxa de ventilação deve ser ajustada com a taxa de perfusão para assegurar que O_2 suficiente seja captado para atender as demandas metabólicas do animal (RANDALL et al., 1997).

A resposta do aumento da \dot{V}_G , em hipóxia, é conseguida através de aumentos tanto da f_R quanto do V_T (RANDALL, 1982). Em algumas espécies essa compensação pode ser feita pelo aumento simultâneo desses dois parâmetros respiratórios como mostrado por *Anguilla vulgaris* (VAN DAM, 1938) ou por um aumento maior em um deles, como é o caso do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (KALININ et al., 2000; RANTIN et al., 1998), catfish, *Ictalurus Puntactus* (GERALD & CECH, 1970), bagre africano, *Clarias gariepinus* (BELÃO et al., 2011) jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (OLIVEIRA et al., 2004), traira, *Hoplias malabaricus* (RANTIN et al., 1992), trairão, *Hoplias lacerdae* (MICHELI-CAMPBELL et al., 2009) e dourado, *Salminus maxillosus* (SOUZA et al., 2001) que mostraram maior elevação do V_T do que na f_R (FERNANDES & RANTIN, 1987).

A mesma tendência foi encontrada para tilápia-do-Nilo (FERNANDES & RANTIN, 1987; FERNANDES & RANTIN, 1994; MARTINS et al., 2011; THOMAZ et al., 2009). Esse tipo de compensação parece ser o mais adequado no que se refere à economia de energia metabólica despendida com a musculatura ventilatória. Devido ao

alto custo energético da \dot{V}_G , um aumento no V_T maior que na f_R parece ser a forma mais eficaz de elevar a \dot{V}_G (JOHANSEN et al., 1967). Segundo Rantin et al. (1992) o aumento do V_T levaria a um baixo custo em relação a velocidade de contração muscular, ao contrário de um aumento na f_R que promoveria um número maior de contrações musculares contra uma alta viscosidade da água inspirada.

No presente estudo, os dois grupos experimentais apresentaram uma resposta que não difere do que já foi encontrado para tilápia-do-Nilo frente à diminuição da PO_2 na água, ou seja, mostraram uma elevação da \dot{V}_G mantida através de um maior aumento no V_T do que na f_R . O grupo controle aumentou o V_T cerca de 421% contra elevação de 35% na f_R na $P_{\text{insp}}O_2$ de $15,8 \pm 0,6$ mmHg comparado com os valores em normóxia. Nessa mesma $P_{\text{insp}}O_2$, o grupo operado elevou o V_T cerca de 367% e a f_R 21% comparado com esses parâmetros à normóxia.

Ao compararmos os dois grupos em hipóxia, constatou-se que em ambos o V_T aumentou. Isto difere do que foi observado por Perry & Reid (2002) em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) submetida ao mesmo procedimento de extirpação do 1º arco branquial e exposta à hipercarbia. Nesta espécie o aumento do V_T foi abolido. Segundo Jia & Burggren (1997) a ablação do 1º arco eliminou a \dot{V}_G em girino de rã touro, *Lithobates castebianus*.

Em estudo com pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a denervação do primeiro par de arcos branquiais atenua os parâmetros de V_T e f_R quando os peixes foram submetidos à hipóxia (LEITE et al., 2007). Tal resposta também foi observada em bowfin, *Amia calva*, porém com a denervação total das brânquias e ablação da pseudobrânquia (McKENZIE et al., 1991).

Diante dos trabalhos apresentados nota-se que não há padronização nas respostas e localizações dos quimiorreceptores relacionados aos parâmetros ventilatórios nas diferentes espécies de peixes citadas. No presente trabalho, com a extirpação do 1º arco branquial nenhum parâmetro ventilatório foi abolido. Porém, observando-se os parâmetros ventilatórios \dot{V}_G e V_T do grupo operado na tensão mais hipóxica nota-se que este grupo não conseguiu elevar tanto essas duas variáveis quanto o grupo controle nessa tensão (P_{insp} de $17,05 \pm 0,5$ mmHg). Além disso, a f_R também demonstrou uma queda nessa mesma tensão. Essa resposta possivelmente ocorre devido a uma menor $\dot{V}O_2$ evidenciada nessa $P_{\text{insp}}O_2$ e especialmente a uma redução de 33% nesse parâmetro

nessa tensão mais hipóxica. Dessa maneira, esses animais operados não teriam suprimento adequado de O_2 para atender o custo de uma alta ventilação mantendo, assim, a \dot{V}_G e o V_T em um nível um pouco mais baixo na $P_{\text{insp}}O_2$ de $17,05 \pm 0,54$ mmHg quando comparada à do grupo controle.

Ao analisarmos a f_R nota-se um aumento significativo em todas as tensões de O_2 , exceto na tensão mais hipóxica, nos peixes operados em relação aos intactos (Figura 17). Essa estratégia é provavelmente usada para compensar a diminuição da superfície respiratória e assegurar a quantidade de O_2 necessária para suprir as atividades metabólicas dos tecidos, como em um peixe intacto. Além disso, esta resposta indica que os quimiorreceptores de O_2 branquiais não estão confinados ao primeiro par de arcos, já que o animal consegue responder à hipóxia com ajustes ventilatórios, inclusive com aumento da \dot{V}_G e do V_T mediados pelos quimiorreceptores possivelmente encontrados nos outros três pares de arcos branquiais.

Tabela 2. Valores médios (\pm S.E.M.) da ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹min⁻¹), frequência respiratória (f_R - resp.min⁻¹) e volume ventilatório (V_T - mLH₂O kg⁻¹ resp⁻¹), dos grupos controle e operado frente à redução gradual da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$.

\dot{V}_G (mLH ₂ O.kg ⁻¹ min ⁻¹)			
$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	Controle	$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	Operado
133,5 \pm 1,0	206,1 \pm 100,3	132,1 \pm 0,5	240,5 \pm 88,5
93,0 \pm 0,9	349,8 \pm 92,4	92,7 \pm 0,6	421,6 \pm 118,9
63,8 \pm 1,4	501,8 \pm 92,1	63,1 \pm 0,8	620,2 \pm 91,6
44,2 \pm 1,1	713,7 \pm 96,1	41,4 \pm 1,1	794,8 \pm 99,8
25,0 \pm 0,6	1264,4 \pm 100,5	25,7 \pm 0,7	1084,5 \pm 91,5
15,8 \pm 0,6	*1641,7 \pm 100,2	17,0 \pm 0,5	*1334,8 \pm 85,5

f_R (resp.min ⁻¹)			
$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	Controle	$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	Operado
133,5 \pm 1,0	*56,8 \pm 4,3	132,1 \pm 0,5	*72,0 \pm 4,0
93,0 \pm 0,9	*55,0 \pm 4,2	92,7 \pm 0,6	*75,6 \pm 4,4
63,8 \pm 1,4	*59,0 \pm 4,2	63,1 \pm 0,8	*80,9 \pm 4,1
44,2 \pm 1,1	*64,3 \pm 4,3	41,4 \pm 1,1	*85,8 \pm 4,2
25,0 \pm 0,6	*75,4 \pm 4,3	25,7 \pm 0,7	*89,4 \pm 4,1
15,8 \pm 0,6	76,8 \pm 4,3	17,0 \pm 0,5	87,2 \pm 4,0

V_T (mLH ₂ O kg ⁻¹ resp ⁻¹)			
$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	Controle	$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	Operado
133,5 \pm 1,0	4,1 \pm 1,3	132,1 \pm 0,5	3,4 \pm 1,1
93,0 \pm 0,9	6,5 \pm 1,2	92,7 \pm 0,6	6,0 \pm 1,5
63,8 \pm 1,4	8,5 \pm 1,2	63,1 \pm 0,8	7,6 \pm 1,2
44,2 \pm 1,1	11,4 \pm 1,2	41,4 \pm 1,1	9,4 \pm 1,2
25,0 \pm 0,6	*16,7 \pm 1,3	25,7 \pm 0,7	*12,9 \pm 1,2
15,8 \pm 0,6	*21,4 \pm 1,3	17,0 \pm 0,5	*15,9 \pm 1,1

Valores em negrito indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia.

(*) Diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios \pm SEM.; n = 10 (P \leq 0,05).

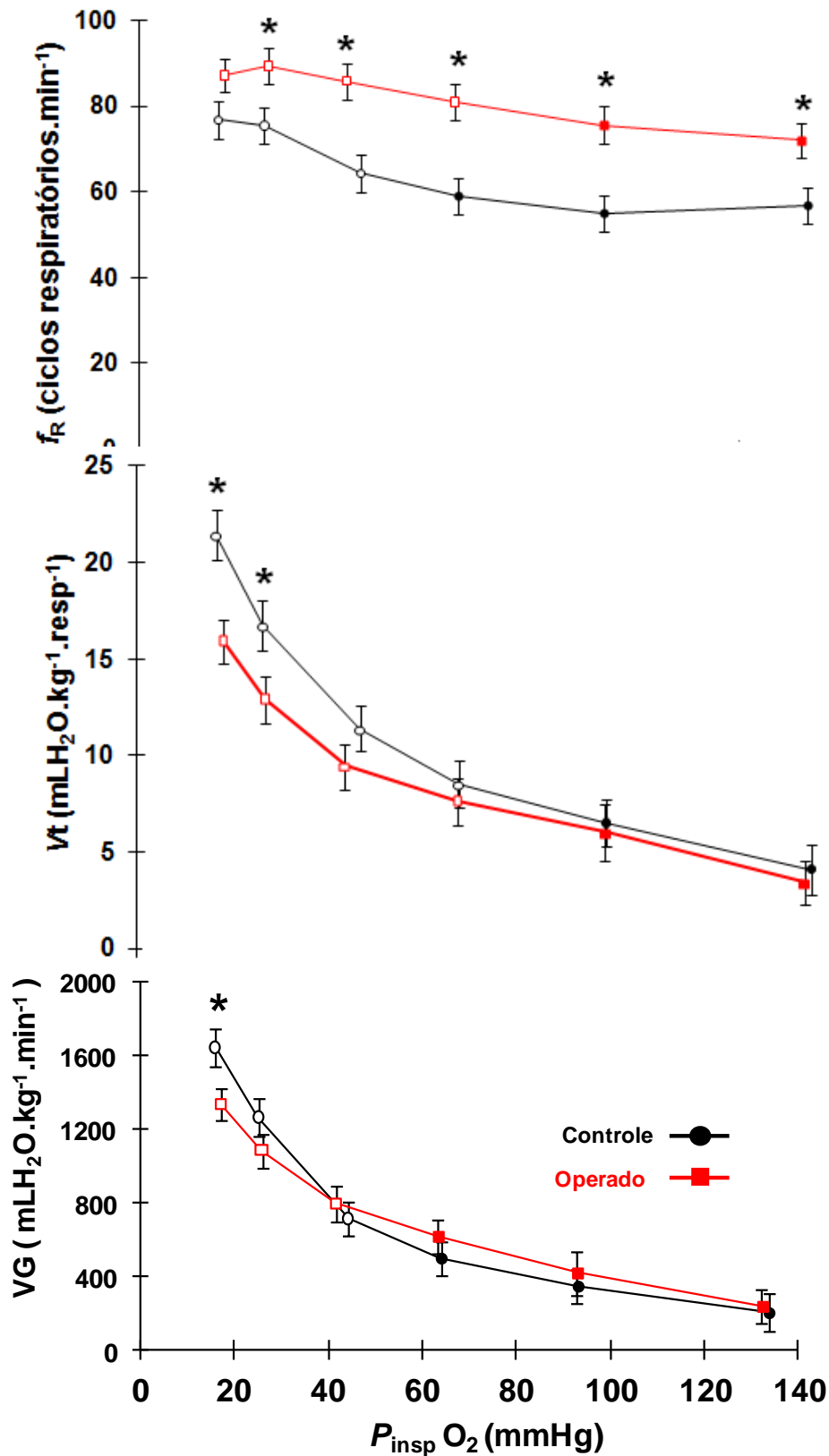


Figura 17. Relação entre os parâmetros: \dot{V}_G ($\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), f_R ($\text{resp} \cdot \text{min}^{-1}$) e V_T ($\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{resp}^{-1}$) frente à diminuição da tensão de O_2 inspirada ($P_{\text{insp}} \text{O}_2$). Símbolos vazios indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios \pm SEM.; $n = 10$ ($P \leq 0,05$).

4.1.3 Extração de O₂ (EO₂ - %)

Os valores médios da extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %) frente à hipóxia gradual são encontrados na tabela 3 e estão apresentados graficamente na figura 18.

O grupo controle manteve a EO₂ constante (em torno de 80%) em hipóxia gradual, até a P_{insp}O₂ de 44,2 ± 1,1 mmHg, a partir da qual mostrou um decréscimo significativo em relação aos valores normóxicos. Essa redução, atingiu o valor de 65,6 ± 4,7% na P_{insp}O₂ de 15,8 ± 0,6 mmHg. Já o grupo operado, conseguiu manter a EO₂ constante (cerca de 65%) como no grupo controle, mas não apresentou diminuição significativa neste parâmetro em nenhuma P_{insp}O₂ hipóxica (Figura 18).

Comparando-se os dois grupos experimentais, observou-se que o operado mostrou valores mais baixos de EO₂ em todas as tensões de O₂, porém diferiram significativamente apenas em normóxia e na tensão de 100 mmHg.

As espécies consideradas tolerantes à hipóxia apresentam uma alta EO₂ (acima de 70% em normóxia) como observado em carpa, *Cyprinus carpio* (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (AGUIAR et al., 2002), traíra, *Hoplias malabaricus* (RANTIN et al., 1992), jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (OLIVEIRA et al., 2004) entre outros.

Trabalhos anteriores já haviam mostrado que a tilápia-do-Nilo apresenta uma alta EO₂ tanto em normóxia quanto em hipóxia até próximo à P_cO₂. Isto pode ser analisado segundo a equação proposta por Dejours (1981):

$$\dot{V}O_2 = \dot{V}_G \cdot C_{in}O_2 \cdot EO_2$$

Onde: C_{in}O₂ = P_{insp}O₂ · αO₂ (coeficiente de solubilidade de O₂)

De acordo com essa equação, diante de uma diminuição na P_{insp}O₂ haverá um aumento na \dot{V}_G para que a $\dot{V}O_2$ e a EO₂ se mantenham constantes. Dessa maneira, mesmo em hipóxia, o suprimento de O₂ é assegurado para suprir as necessidades metabólicas do animal. Isto é válido para ambos os grupos experimentais, nos quais são mantidos constantes a $\dot{V}O_2$ e a EO₂ até próximo da P_cO₂.

Porém, a EO₂ pode sofrer uma queda durante a diminuição da P_{insp}O₂. Isso acontece principalmente próximo ou abaixo da P_cO₂, quando o peixe não consegue regular eficientemente as variáveis cardiorrespiratórias envolvidas nas respostas compensatórias frente à hipóxia. Nestas condições a EO₂ pode chegar à metade do valor encontrado em normóxia (FERNANDES & RANTIN, 1987). Essa grande redução da

EO_2 não foi observada no presente estudo em nenhum grupo experimental. Porém notamos uma queda de 20 e 10% nos grupos controle e operado, respectivamente, na tensão mais hipóxica.

Essa redução da EO_2 próximo ou na P_cO_2 é, geralmente, conseqüência de um aumento muito alto na \dot{V}_G , no sentido de se manter a $\dot{V}O_2$ constante (FERNANDES & RANTIN, 1989). Esse aumento da \dot{V}_G faz com que um maior volume de água passe mais rapidamente sobre as brânquias, reduzindo assim o tempo de difusão do O_2 da água para o sangue, justificando, dessa maneira, a diminuição da EO_2 frente à um grande aumento da \dot{V}_G (HUGHES & SAUNDERS, 1970).

No presente estudo, o grupo controle apresentou a mesma tendência de aumento na \dot{V}_G com uma pequena diminuição da EO_2 durante hipóxia gradual. A partir da $P_{insp}O_2$ de $44,2 \pm 1,1$ mmHg a \dot{V}_G foi significativamente diferente dos valores normóxicos. Nessa $P_{insp}O_2$, ($44,2 \pm 1,1$ mmHg), quando houve um aumento de 246% na \dot{V}_G (Figura 19), a EO_2 começou a diminuir ($82,1 \pm 4,4$ para $74,1 \pm 4,3\%$). Esse decréscimo chegou a 20% ($65,6 \pm 4,4\%$) em relação ao valor normóxico, quando a ventilação sofreu um aumento de 696% na tensão hipóxica mais severa. Apesar disso, esse decréscimo (20% $P_{insp}O_2$ $15,8 \pm 0,6$ mmHg) foi muito menor do que o encontrado por outros autores para *Oreochromis niloticus* na mesma tensão de O_2 . Thomaz et al. (2009) e Martins et al. (2011) observaram um decréscimo muito maior, de cerca de 38% e 52%, respectivamente, nas mesmas tensões experimentais do presente trabalho. Porém, Martins et al. (2011) registraram um aumento de 13 vezes na \dot{V}_G de tilápia-do-Nilo contra 7,9 vezes no presente trabalho, o que justifica essa grande diminuição na EO_2 encontrada por estes autores. Ao contrário, o presente trabalho corrobora os resultados do trabalho de Kalinin (1996), o qual demonstrou uma EO_2 mantida em torno de 80% até a $P_{insp}O_2$ de 22 mmHg.

Ao analisarmos o grupo operado, observa-se surpreendentemente que os valores de EO_2 estiveram por volta de 65% mesmo com a remoção de cerca de 30% da superfície respiratória (DUTHIE & HUGHES, 1987). Em estudo da morfometria branquial de tilápia-do-Nilo constatou-se uma grande frequência de lamelas secundárias por filamento branquial (FERNANDES & RANTIN, 1986b). Esta informação aliada ao fato que o número de lamelas secundárias perfundidas com sangue bem como o fluxo sanguíneo pelos arcos branquiais pode ser aumentado e/ou redirecionado através de

diferentes porções do sistema branquial (HUGHES, 1978) traz uma forte evidência que isto ocorreu no presente estudo. Diante da condição extrema da diminuição da superfície respiratória o animal provavelmente aumenta a perfusão sanguínea e o recrutamento lamelar nos demais arcos a fim de manter uma taxa de consumo e uma extração constante de O_2 com o objetivo de atender as demandas metabólicas e acionar os ajustes cardiorrespiratórios, como um peixe intacto.

Tabela 3. Valores médios \pm S.E.M. da extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %) dos grupos controle e operado frente à diminuição da $P_{insp}O_2$.

$(EO_2 - \%)$			
$P_{insp}O_2$ (mmHg)	Controle	$P_{insp}O_2$ (mmHg)	Operado
133,5 \pm 1,0	*82,1 \pm 4,4	132,1 \pm 0,5	*67,3 \pm 4,0
93,0 \pm 0,9	*79,1 \pm 4,2	92,7 \pm 0,6	*65,0 \pm 4,7
63,8 \pm 1,4	77,1 \pm 4,2	63,1 \pm 0,8	65,4 \pm 4,1
44,2 \pm 1,1	74,1 \pm 4,3	41,4 \pm 1,1	63,5 \pm 4,3
25,0 \pm 0,6	67,8 \pm 4,4	25,7 \pm 0,7	61,9 \pm 4,2
15,8 \pm 0,6	65,6 \pm 4,4	17,0 \pm 0,5	60,1 \pm 4,1

Números em negrito mostram a diferença significativa dentro do próprio grupo em relação à normóxia.

(*) Diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios \pm SEM.; n = 10 ($P \leq 0,05$).

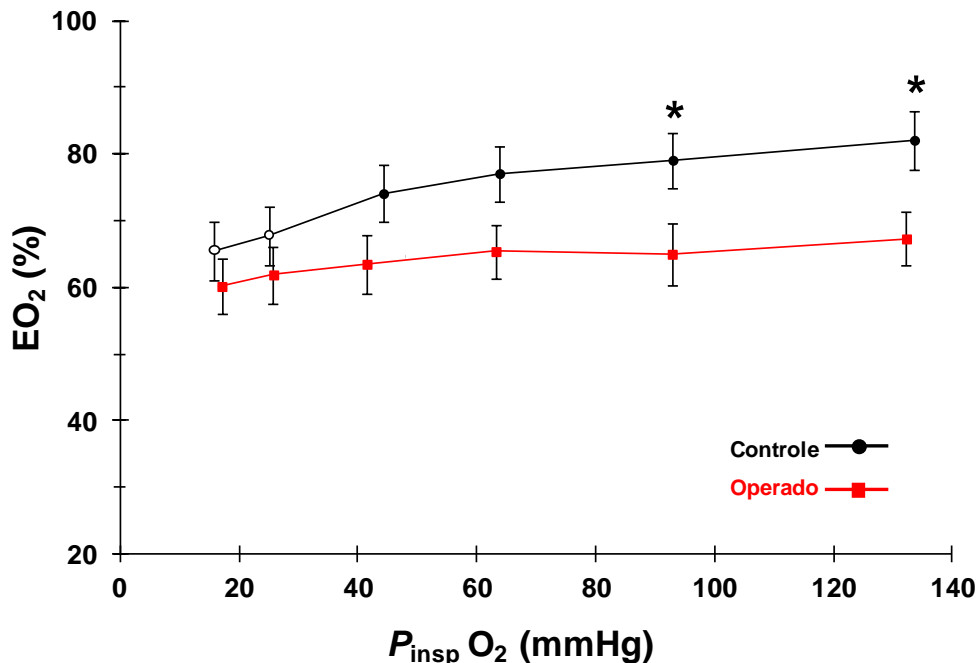


Figura 18. Efeito da redução da PO_2 na água inspirada ($P_{insp}O_2$) na extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %). Símbolos vazios apontam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) mostram diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios \pm SEM.; n = 10 ($P \leq 0,05$).

4.2. Parâmetros ventilatórios de *Oreochromis niloticus* em resposta ao NaCN.

4.2.1. Frequência respiratória (f_R) e Amplitude ventilatória (V_{amp})

Os valores médios da f_R em resposta às injeções internas (salina e NaCN) do grupo controle e operado estão representados graficamente na figura 19. A comparação da f_R dos dois grupos após a injeção interna de NaCN é mostrada na figura 20. A V_{amp} de ambos os grupos submetido às mesmas injeções internas são apresentadas na figura 21. A comparação da V_{amp} dos dois grupos após a injeção interna de NaCN é mostrada na figura 22.

As variáveis respiratórias, f_R e V_{amp} , em resposta às injeções externas (H_2O e NaCN), são mostradas nas figuras 23 e 25, respectivamente. As comparações dos dois grupos frente à injeção externa de NaCN de cada variável, f_R e V_{amp} , é apresentada na figura 24 e 26, respectivamente.

O grupo controle e operado mostraram o mesmo padrão de resposta em relação às injeções de NaCN: aumento da \dot{V}_G demonstrado por aumentos da f_R e da V_{amp} .

As respostas às injeções internas tiveram uma duração maior do que as injeções externas. A f_R do grupo controle atingiu um aumento de 54% 60s após a injeção interna de NaCN e este parâmetro retornou próximo ao basal cerca de 5 minutos após a injeção da droga (Figura 19A). A V_{amp} aumentou até 33% com a injeção interna, retornando aos seus valores basais a partir do 2º minuto (Figura 21A).

As injeções externas desencadearam uma resposta mais rápida do que as internas, no grupo controle. A f_R teve seu maior aumento (21%) 10 s após a injeção, retornando à seus valores de pré injeção antes do final do primeiro minuto (Figura 23A). A V_{amp} aumentou até 34% (10 s) e como na f_R retornou rapidamente aos seus valores basais (Figura 25A).

O grupo operado seguiu a mesma tendência de aumento dos parâmetros ventilatórios como o grupo controle, com respostas mais rápidas frente às injeções externas e mais prolongadas com as internas.

A ablação do primeiro par de arcos branquiais não aboliu a elevação de nenhuma variável ventilatória, porém as respostas foram atenuadas (Figuras 19B, 21B, 23B). A f_R e a V_{amp} aumentaram cerca de 19 e 18%, respectivamente, em resposta à estimulação interna de receptores, retornando aos seus valores basais no segundo minuto após a injeção. Em resposta à injeção de NaCN externa a f_R mostrou um aumento de até 13% enquanto a V_{amp} de 38% e seus valores iniciais voltaram ainda no primeiro minuto.

É bem documentado na literatura que na maioria das espécies de peixes a administração de NaCN promove alterações nos parâmetros ventilatórios (BURLESON & MILSOM 1995; BURLESON & SMATRESK, 1990; LEITE et al., 2007; MCKENZIE et al., 1995; MICHELI-CAMPBELL et al., 2009; MILSOM et al., 2002; SUNDIN et al., 1999). O NaCN atua como bloqueador da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, estimulando, dessa maneira, os quimiorreceptores (BURLESON et al., 1992). Segundo Burleson & Milsom (1995) o NaCN atua estimulando somente os quimiorreceptores de O_2 , pois as respostas observadas em truta-arco-íris submetida à diferentes substâncias indicam que o NaCN não é uma droga irritante, uma vez que não foi observada tosse ou apnéia, que seriam indicativos de estimulação de nociceptores ou receptores olfatórios.

Além disso, registros da atividade neural mostraram que os quimiorreceptores de O_2 foram estimulados por NaCN interna e externamente em arcos branquiais isolados de truta (BURLESON & MILSOM, 1993).

Diante disso, muitos trabalhos têm sido feitos em busca da identificação e da orientação dos receptores pela técnica de denervação branquial e administração dessa droga. Porém, assim como a identificação da localização dos quimiorreceptores, a orientação dos mesmos é de difícil compreensão, uma vez que também não há uma padronização em relação às espécies, mesmo em espécies muito próximas há divergência na orientação desses receptores.

A traíra (*Hoplias malabaricus*) apresenta quimiorreceptores que modulam a f_R presente nos 4 arcos branquiais e orientados externamente, enquanto a V_{amp} é acionada por receptores também localizados em todos os arcos, porém orientados internamente e externamente, além de possuir receptores extrabranquiais externos (SUNDIN et al., 1999). Já trairão (*Hoplias lacerdae*) apresenta receptores para a f_R somente no 1º par de arcos branquiais orientados internamente. A V_{amp} , pelo contrário, é acionada por receptores localizados nos 4 arcos branquiais orientados tanto interna quanto externamente (MICHELI-CAMPBELL et al., 2009). Do mesmo modo que em traíra, estudos feitos com tambaqui, (*Colossoma macropomum*) (MILSSON et al., 2002; SUNDIN. et al., 2000) jeju, (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (LOPES et al., 2010) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (LEITE et al., 2007) mostraram receptores extrabranquiais envolvidos nas alterações da V_{amp} que monitoram a PO_2 tanto da água quanto do sangue.

No presente trabalho, ao compararmos os dois grupos nota-se que houve uma atenuação das respostas após as injeções de NaCN, exceto na V_{amp} após injeção externa

(Figura 25). Essa mesma tendência foi encontrada após denervação do 1º arco branquial na V_{amp} em trairão e na f_R em resposta à injeção interna em pacu. Essas respostas mostram a existência de quimiorreceptores, mas não exclusivamente, no primeiro arco branquial.

Ao observarmos os dois grupos em relação às injeções, nota-se que houve maior aumento na V_{amp} do que na f_R com as injeções externas de NaCN, assim como observado em hipóxia. Enquanto que, as injeções internas provocaram no grupo controle um maior incremento na f_R e no grupo operado a elevação de ambos os parâmetros. Segundo Milsom (1996) nenhum dos estudos comprovou se a orientação dos quimiorreceptores é um aspecto comum de todos os peixes, ou se está associada às diferenças no habitat de cada espécie.

Há evidências de que as espécies que vivem em ambientes frequentemente hipóxicos necessitem de mais sítios de detecção da PO_2 para acionar mecanismos compensatórios rapidamente. Como exemplo, podemos citar a traíra que apresenta quimiorreceptores de O_2 ligados a f_R e a V_{amp} em todos os arcos branquiais, e ainda extrabranquiais ligados ao último parâmetro (SUNDIN et al., 1999), enquanto trairão, espécie pertencente ao mesmo gênero, porém recorrente de águas bem oxigenadas, apresenta receptores que modulam a f_R somente no 1º arco branquial orientados internamente. Segundo Micheli-Campbell et al. (2009) a disparidade na distribuição de quimiorreceptores O_2 entre estas duas espécies estreitamente relacionadas está associado aos respectivos ambientes em que elas habitam.

Nota-se que no presente trabalho, com a remoção do primeiro arco branquial, após a injeção externa de NaCN, a V_{amp} do grupo operado mostrou aumento (38%) maior comparada ao grupo intacto (34%), além do que em hipóxia o grupo operado apresentou de uma elevação de 367% nesse parâmetro.

A tilápia-do-Nilo, assim como a traíra, vive em ambientes frequentemente hipóxicos. Dessa maneira, precisaria essa espécie de mais sítios de detecção de PO_2 orientados externamente (monitorando continuamente a $P_{insp}O_2$) que modulem alterações na V_{amp} ? Uma vez que a elevação desse parâmetro é menos custosa energeticamente do que aumento da f_R .

Essa resposta é de difícil afirmação, uma vez que são necessários mais estudos com esta e com outras espécies, além de avaliação das evidências adaptativas e/ou evolutivas. Porém, ao compararmos trairão e traíra nota-se a influência do habitat onde vivem essas espécies de peixes com a padronização do local e orientação dos receptores.

Porém, essa hipótese não pode ser estendida para outras espécies, visto que são necessários mais estudos para confirmar qualquer hipótese.

Frente ao exposto, ressalta-se a presença dos quimiorreceptores que não estão confinados somente ao primeiro par de arcos branquiais em tilápia-do-Nilo e, além disso, que os receptores que controlam os parâmetros respiratórios estão envolvidos no monitoramento tanto interno (sangue arterial) quanto externo (água inspirada) da PO_2 .

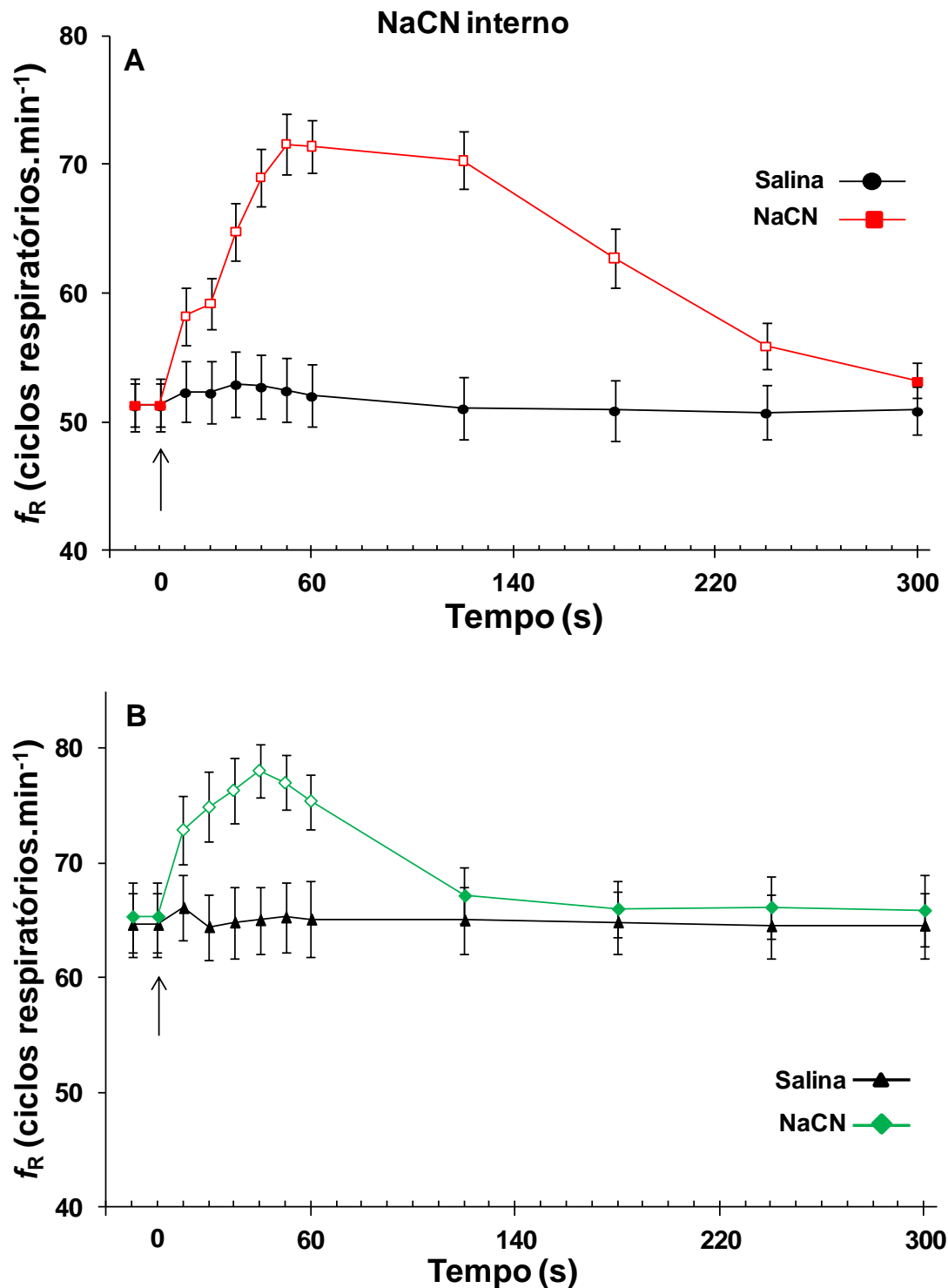


Figura 19. Frequência respiratória (f_R) de tilápia-do-Nilo após injeções internas de salina e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). A seta indica o momento da injeção e os símbolos vazios representam diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

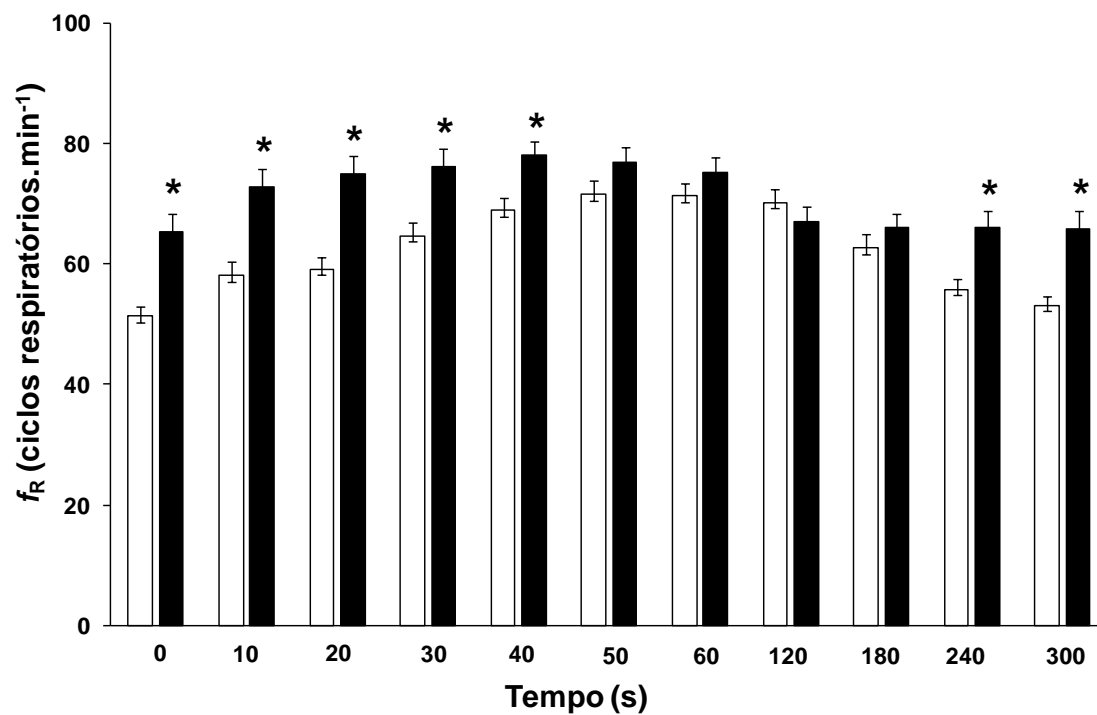


Figura 20. Comparação da frequência respiratória (f_R) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção interna de NaCN. Os asteriscos mostram diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

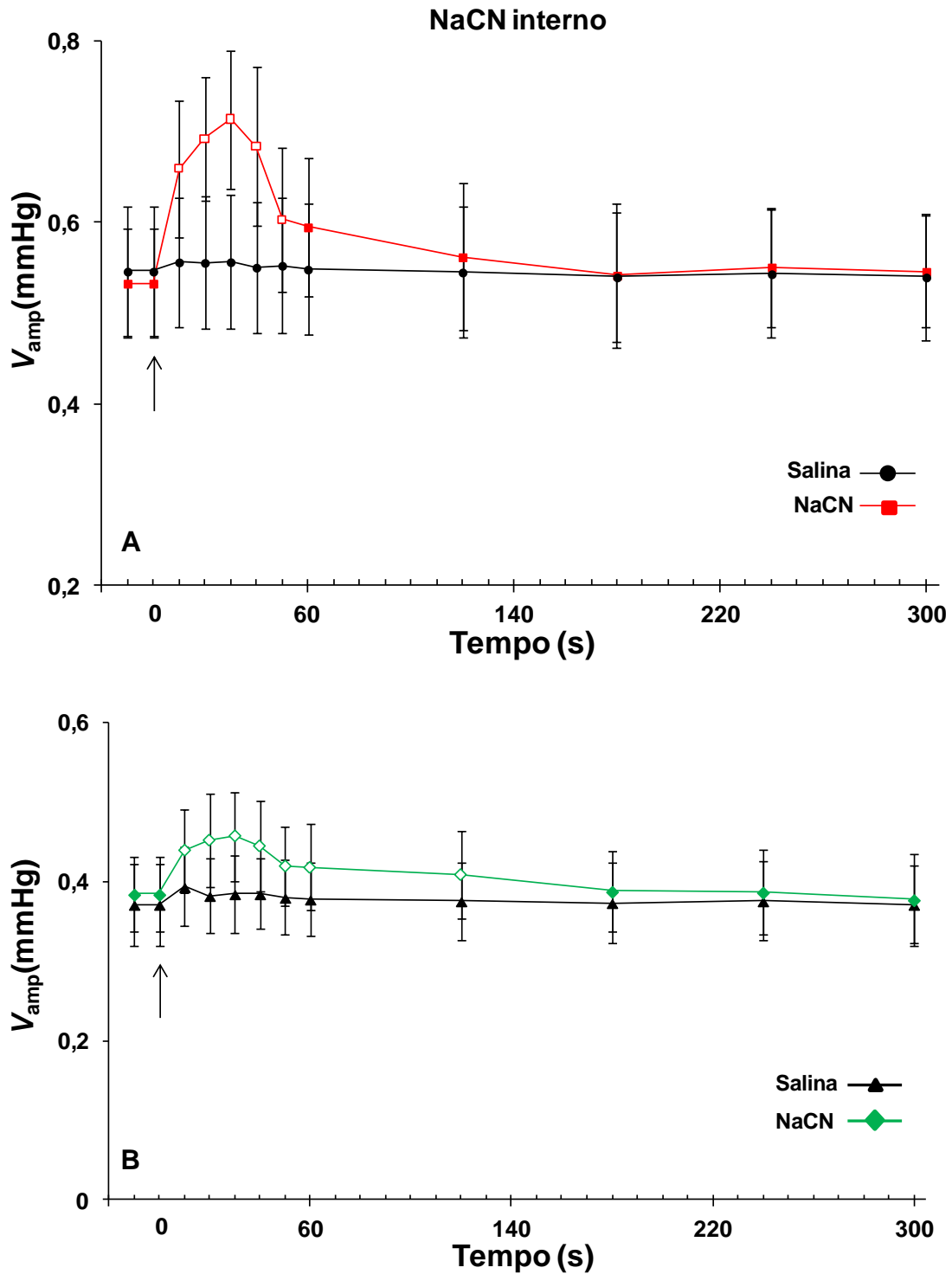


Figura 21. Amplitude ventilatória (V_{amp}) de *Oreochromis niloticus* após injeções internas de salina e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). Os símbolos vazios mostram diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

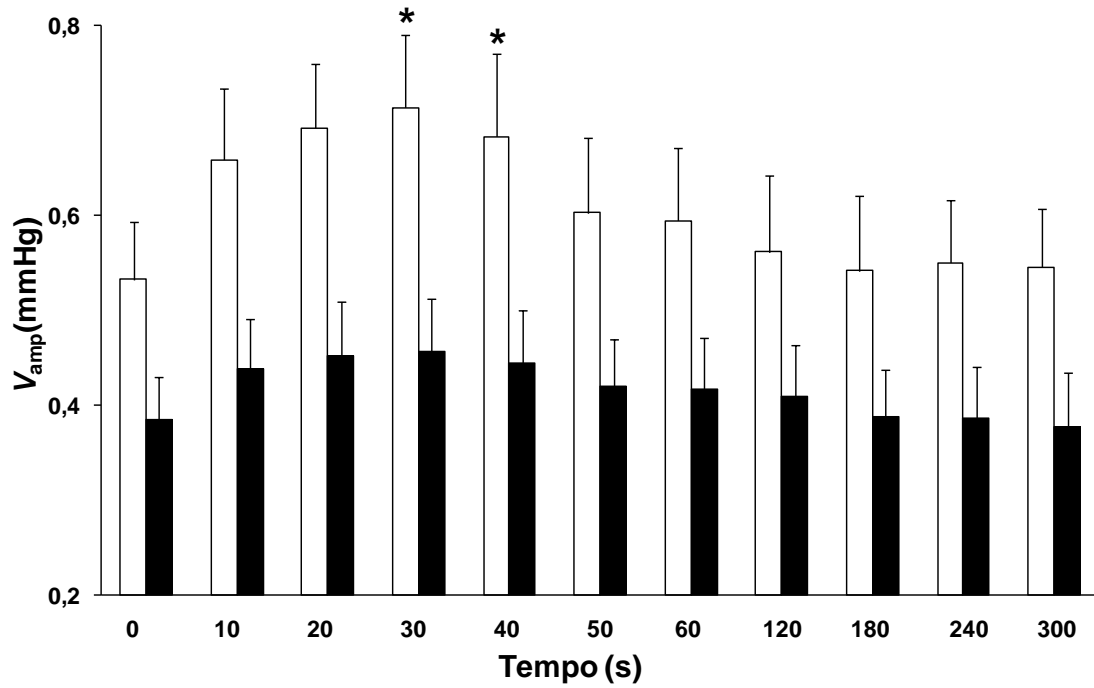


Figura 22. Comparação da amplitude ventilatória (V_{amp}) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção interna de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

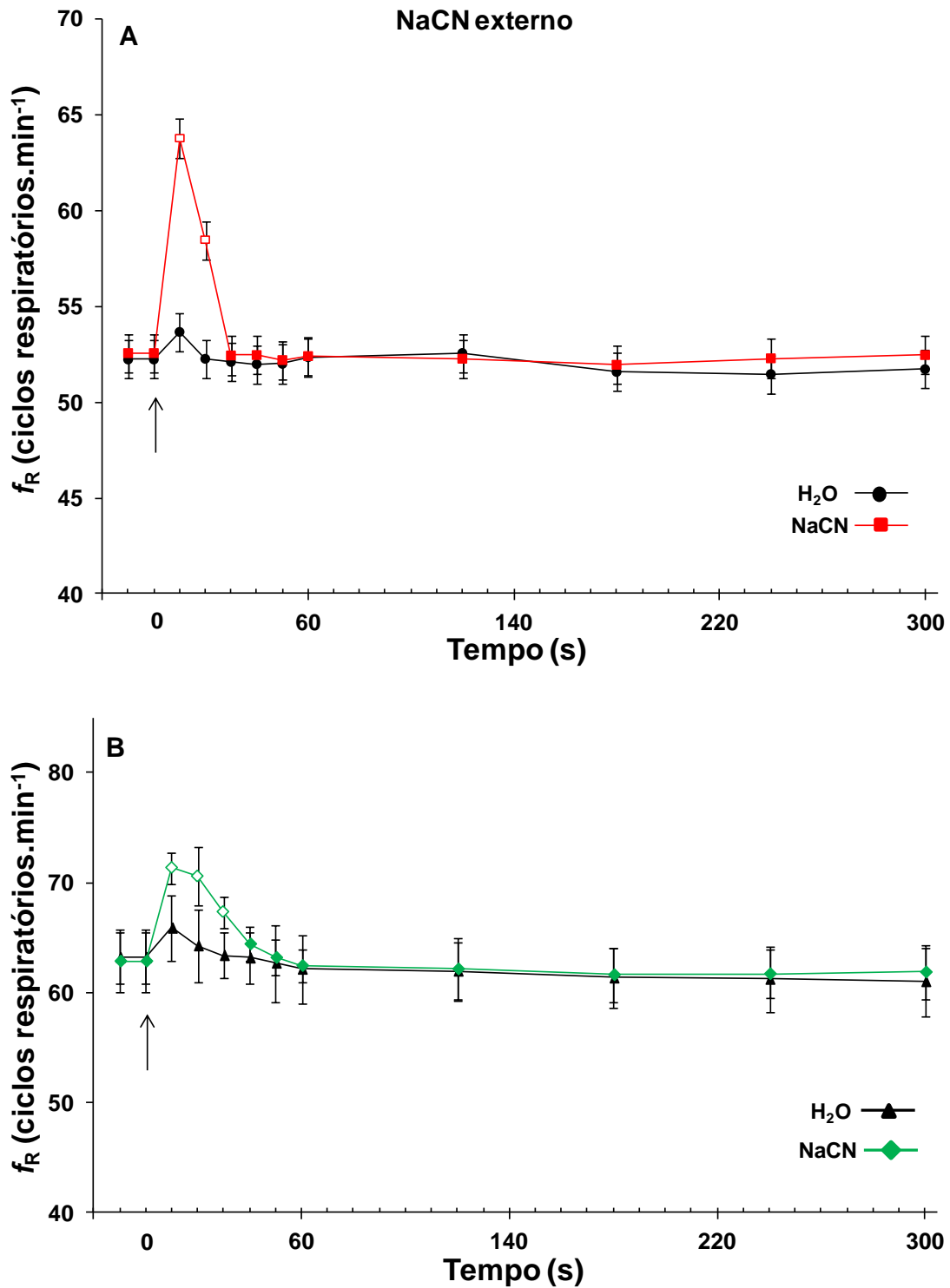


Figura 23. Frequência respiratória (f_R) de *Oreochromis niloticus* após injeções externas de H₂O e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). A seta indica o momento da injeção e os símbolos vazios mostram diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05).

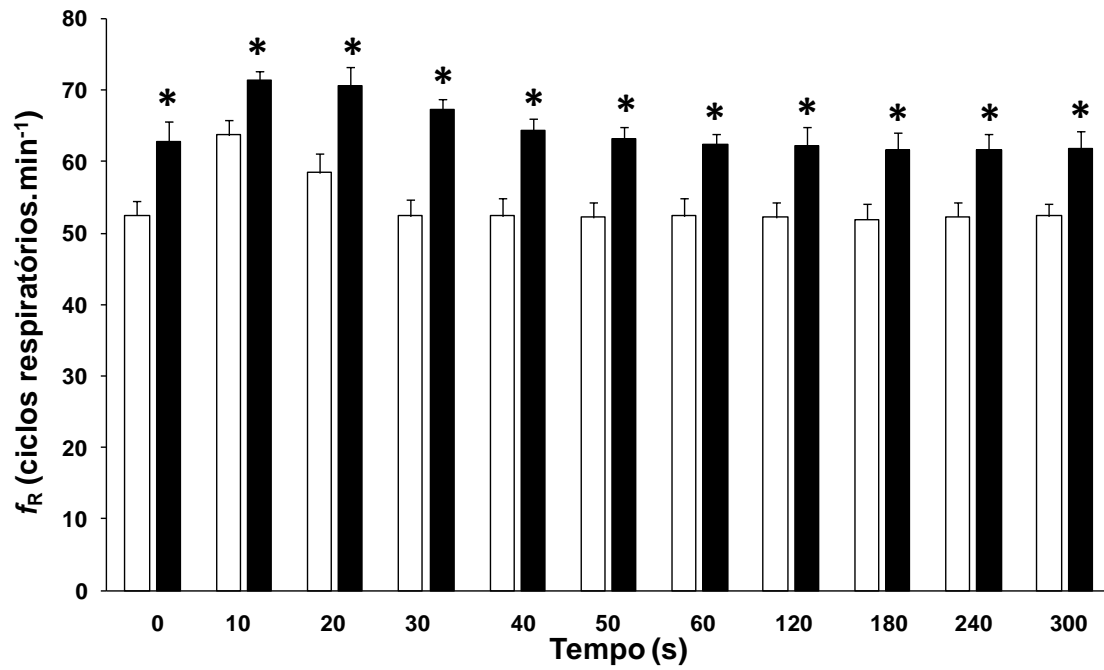


Figura 24. Comparação da frequência respiratória (f_R) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção externa de NaCN. Os asteriscos mostram diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

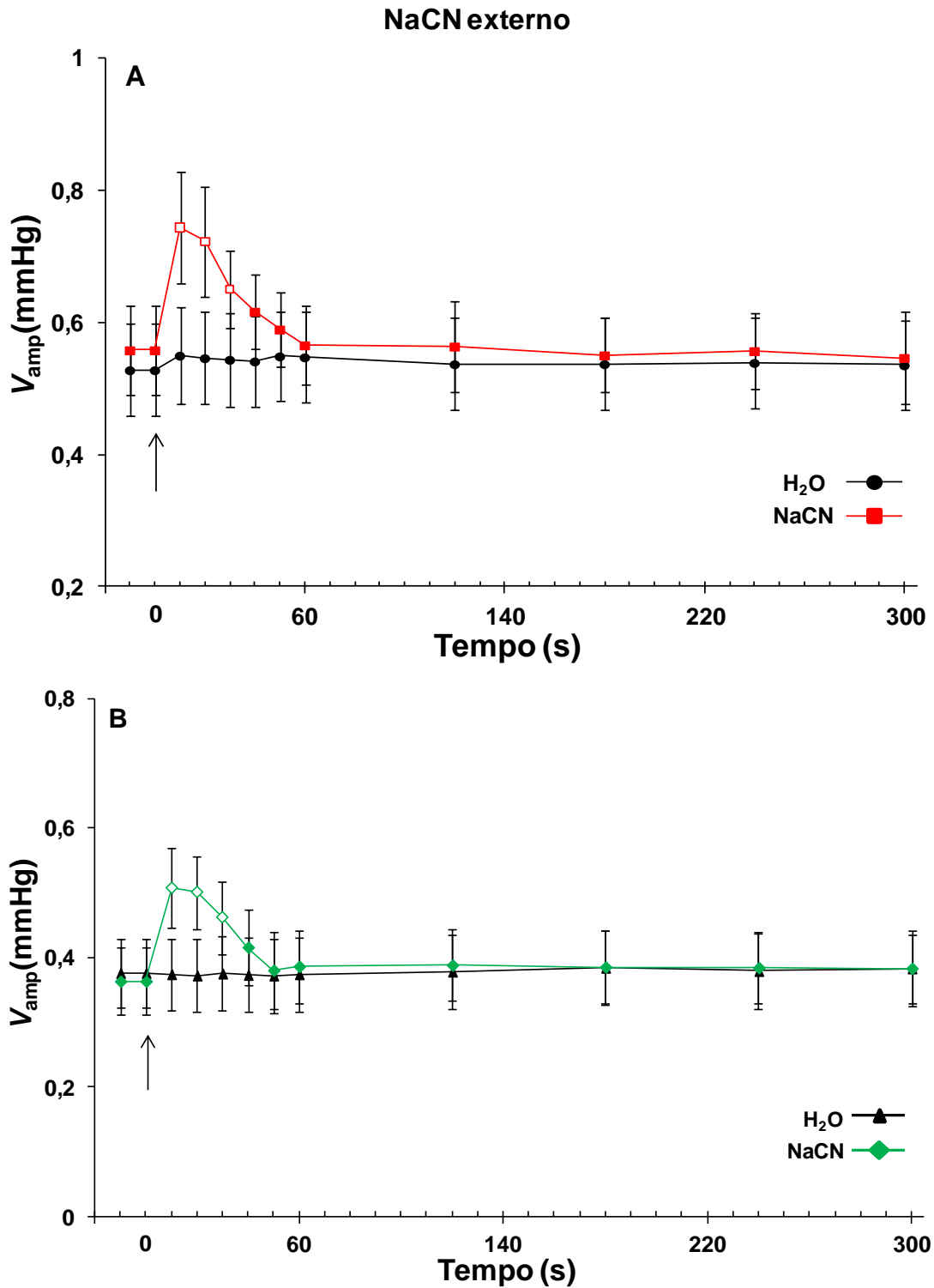


Figura 25. Amplitude ventilatória (V_{amp}) de *Oreochromis niloticus* após injeções externas de H₂O e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). Os símbolos vazios mostram diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, ($P \leq 0,05$).

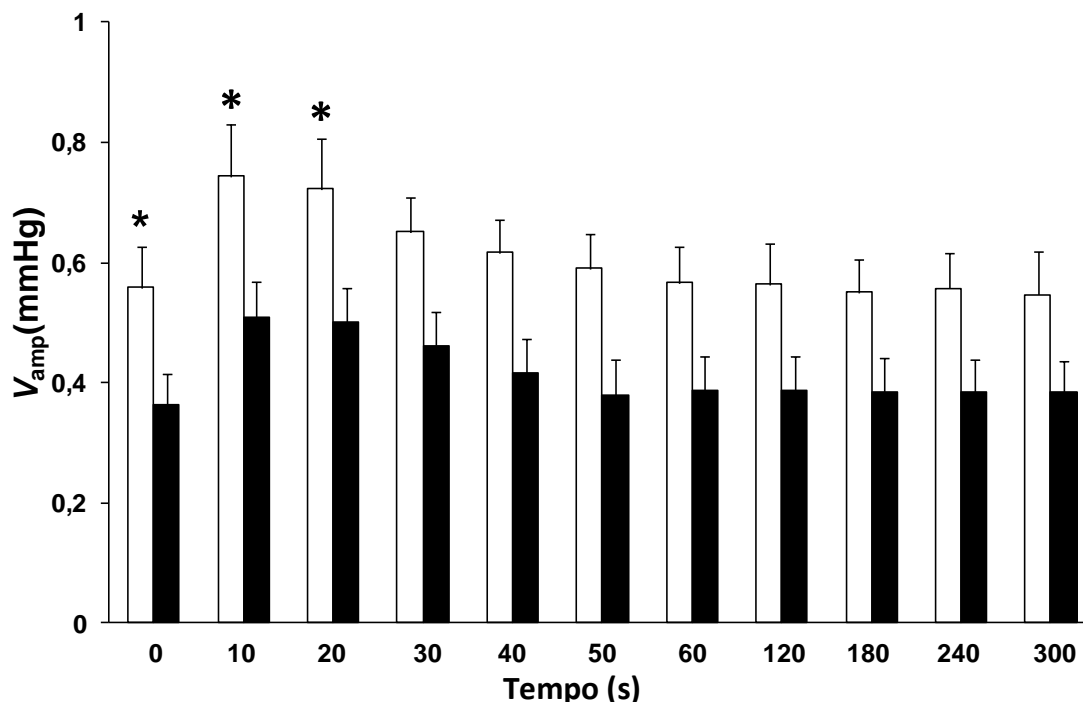


Figura 26. Comparação da amplitude ventilatória (V_{amp}) do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção externa de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

4.3. Parâmetro cardíaco de *Oreochromis niloticus* frente à redução gradual da PO_2 na água.

4.3.1. Frequência cardíaca (f_H)

Os valores médios da frequência cardíaca f_H (bpm) frente à diminuição da $P_{insp}O_2$ são mostrados na tabela 4 e apresentados graficamente na figura 27.

O grupo controle apresentou uma f_H constante em torno de 45 bpm, porém sem nenhuma alteração significativa desse parâmetro frente à hipóxia (tabela 4). Os valores médios da f_H diferiram um pouco dos encontrados em trabalhos anteriores com a mesma espécie, $f_H \sim 36$, Thomaz et al. (2009) e $f_H \sim 60$, Martins et al. (2011).

No grupo operado notou-se uma f_H praticamente constante (em torno de 55 bpm) até a $P_{insp}O_2$ de $41,4 \pm 1,1$ mmHg, abaixo da qual houve uma diminuição na f_H (bradicardia), atingindo uma redução de 26% na $P_{insp}O_2$ de $17,05 \pm 0,5$ mmHg.

Comparando-se os dois grupos, observou-se que o operado apresentou uma elevação da f_H de repouso, apresentando em normóxia um aumento de 31% quando comparado ao grupo controle, mantendo-se elevada em todas as $P_{insp}O_2$.

Relacionando os dois grupos notamos que a bradicardia foi constatada apenas no grupo operado ($P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $25,7 \pm 0,7$ e $17,05 \pm 0,5$ mmHg). O grupo controle nestas mesmas $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ mostrou uma tendência de diminuição da f_H , porém esses valores não foram considerados estatisticamente significativos (Figura 27).

Os valores médios da f_H encontrados no presente estudo diferiram dos trabalhos de Thomaz et al. (2008) e Martins et al. (2011) provavelmente por se tratar de grupos de peixes diferentes e também por influência da época do ano na qual foram realizados os experimentos.

Ao relacionarmos os dois grupos em normóxia, observa-se um aumento da f_H de repouso no grupo sem o 1º par de arcos branquiais. Essa mesma resposta foi encontrada em estudo com pacu (LEITE et al., 2007), trairão, (MICHELI-CAMPBELL et al., 2009) e traíra (SUNDIN et al., 1999) quando estas espécies foram submetidas à denervação do primeiro arco branquial, e essa resposta persistiu em correspondência ao maior grau de denervação das brânquias. Segundo Leite et al. (2007) essa resposta poderia estar ligada à diminuição da resistência vascular ou a ausência de informações sensoriais que estariam presentes no primeiro arco branquial e influenciariam na regulação da f_H , ou ainda a ambas as hipóteses.

Em tilápia-do-Nilo, torna-se difícil explicar a origem desse aumento dos valores de repouso da f_H . Não podendo ser descartada ainda a hipótese desse aumento nos valores de repouso da f_H estar relacionada ao estresse causado pelo procedimento cirúrgico de remoção do 1º arco e/ou aos protocolos experimentais.

A f_H permanece elevada no grupo operado em relação ao controle em todas as $P_{\text{insp}}\text{O}_2$, mesmo nas tensões mais hipóxicas. Uma outra hipótese para a elevação desse parâmetro seria o aumento do retorno venoso ao coração. A ausência do primeiro arco faria com que o sangue tivesse uma estrutura a menos para irrigar e ser armazenado, voltando assim mais rapidamente para o coração o que promoveria um aumento da f_H .

Uma das funções primárias do sistema cardiovascular é levar substâncias das células e para estas. Para isso, esse sistema deve ser regulado para combinar a circulação sanguínea com metabolismo, com o objetivo de distribuir os nutrientes, gases, hormônios, recolher resíduos celulares, etc (WITHERS, 1992). Assim, é de fundamental importância manter a regulação desse sistema para minimizar o gasto de energia e manter uma captação adequada de O_2 pelos órgãos respiratórios. Dessa maneira, frente à hipóxia, essa regulação otimiza as trocas gasosas e depende de

mudanças no fluxo e pressão sanguíneas através de alterações no ritmo cardíaco e ajustes sistêmicos na resistência branquial vascular (REID et al., 2006).

Uma resposta comum à hipóxia em peixes é uma diminuição na f_H , a chamada bradicardia hipóxica (BUTLER & TAYLOR, 1971; RANDALL, 1982; TAYLOR, 1992). Essa resposta se origina de um aumento na atividade parassimpática e estimulação subsequente de receptores muscarínicos (TAYLOR, 1992). Esta bradicardia é uma resposta reflexa (BURLESON & SMATRESK, 1990; FRITSCHÉ & NILSSON, 1989) e entre os seus benefícios está o aumento do tempo de residência de sangue nas lamelas secundárias, levando a um maior tempo de difusão de O_2 da água para o sangue, aumentando dessa maneira a capacidade de difusão das brânquias (GILMOUR & PERRY, 2007; SATCHELL, 1960).

Além disso, a bradicardia, por resultar em um aumento na pressão sistólica devido ao maior tempo de enchimento ventricular (Lei de Frank-Starling), proporciona um aumento do recrutamento das lamelas secundárias, que não estavam sendo utilizadas em normóxia, e uma maior extração de O_2 pelas brânquias (FARRELL et al., 1980). A bradicardia, associada à hiperventilação branquial, também proporciona um adequado sincronismo cardiorrespiratório (RANDALL, 1982).

O coração dos peixes tem uma alta capacidade de aumentar o volume sistólico (VS) o que permite que o débito cardíaco (DC) se mantenha constante durante a bradicardia hipóxica (FRITSCHÉ & NILSSON, 1989). Apesar de algumas espécies manterem o DC como encontrado em truta (*Onchorynchus mykiss*) (WOOD & SHELTON, 1980) outras demonstram queda nesse parâmetro como observado em atlantic cod (*Gadus morhua*) (FRITSCHÉ & NILSSON, 1989), durante a bradicardia hipóxica. O aumento do tempo em que o sangue fica nas lamelas secundárias associado à diminuição do DC aumenta a eficiência da troca gasosa (REID et al., 2006).

Conjuntamente a isso, essa resposta cardíaca frente a hipóxia poderia beneficiar diretamente o coração, pois devido ao aumento do VS este órgão sofreria um estiramento das câmaras cardíacas, reduzindo dessa maneira a distância de difusão para o O_2 , melhorando a função do miocárdio (FARRELL, 2007).

Por outro lado, Glass et al. (1991) questionam se a bradicardia hipóxica é mesmo um ajuste cardiovascular frente à hipóxia ou seria a resposta de uma disfunção do miocárdio. Segundo Rantin et al. (1998) a bradicardia observada quando o peixe é submetido à tensões muito baixas de O_2 , abaixo da P_cO_2 , coincide com alterações dos sinais eletrocardiográficos do coração indicativos de isquemia cardíaca. Pacu (LEITE et

al., 2007), tambaqui (SUNDIN et al., 2000) e traíra (SUNDIN et al., 1999) apresentaram bradicardia em tensões de O₂ muito baixas, mesmo após denervação total das branquias. Tambaqui (SUNDIN et al., 2000) e traíra (SUNDIN et al., 1999) submetidos ao mesmo protocolo de denervação total e atropinizados continuaram apresentando bradicardia, demonstrando esse efeito localizado da hipóxia no músculo cardíaco, corroborando o que foi proposto por Glass et al. (1991) e Rantin et al. (1998).

Outros trabalhos vêm questionando se a bradicardia hipóxica melhora a transferência de O₂ para as brânquias. Em estudo com bacalhau do atlântico, *Gadus morhua*, após a denervação do nervo vago não foi observada alteração na $\dot{V}O_2$ e na P_cO₂ em hipóxia (MCKENZIE et al., 2009). A mesma tendência foi encontrada para a enguia (*Anguilla anguilla*) e truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que após a administração de atropina não foi constatada alteração na P_cO₂, indicando que a bradicardia não contribuiu para a manutenção da $\dot{V}O_2$ (IVERSEN et al., 2010; PERRY & DESFORGES, 2006)

Enquanto que em dogfish (*Scyliorhinus canicula*) foram encontradas respostas conflitantes, Short et al. (1979) mostraram que após a denervação do vago, a ausência da bradicardia frente à hipóxia não alterou a captação de O₂ branquial. Por outro lado, Taylor & Barret (1985) constataram que nesta mesma espécie, após o bloqueio farmacológico da bradicardia, houve uma diminuição na difusão de O₂ branquial em hipóxia.

Estes trabalhos enfatizam que a bradicardia teria a função de proteger o desempenho cardíaco e beneficiar o suprimento de O₂ para o coração. A bradicardia hipóxica protegeria a extração de oxigênio pelo miocárdio por aumentar o tempo diastólico final, e, assim, o tempo de residência do sangue dentro do lúmen do coração. Além disso, o aumento do volume diastólico final, que está associado com a redução da taxa cardíaca, pode alongar o coração, aumentar a área de superfície exposta ao sangue venoso e reduzir a distância de difusão de oxigênio (FARREL, 2007).

Também tem sido sugerido que o maior benefício da bradicardia pode ser a redução do trabalho cardíaco, enquanto melhora a contratilidade através de um efeito de força-frequência negativa (FARREL, 2007; TAYLOR et al., 1977). Segundo Perry & Desforges (2006), a hiperventilação observada em peixes teleósteos e elasmobrânquios pode ser um dos principais contribuintes para o aumento da transferência de oxigênio branquial durante exposição à hipóxia.

Diante disso, notamos que a bradicardia hipóxica tem sido bem documentada, porém, nota-se que seu significado fisiológico não é completamente compreendido (OLIVEIRA et al., 2004).

No presente trabalho não foi observada bradicardia hipóxica consistente no grupo controle apesar da tendência de diminuição da f_H . Apenas no grupo operado notou-se essa resposta a partir da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de $25,7 \pm 0,7$ mmHg (tensão de 30 mmHg). Em outra espécie tolerante a hipóxia, a traíra, *Hoplias malabaricus*, observou-se bradicardia abaixo da tensão de 20 mmHg. Outros peixes considerados menos tolerantes à hipóxia apresentam bradicardia em tensões mais altas de O_2 , como é o caso de trairão (*Hoplias lacerdae*) que mostra bradicardia em 35 mmHg (RANTIN et al., 1993), ou mesmo o dourado (*Salminus maxillosus*) considerada uma espécie pouco tolerante à hipóxia, mostra bradicardia na tensão de O_2 de 70 mmHg (SOUZA et al., 2001). A $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ na qual ocorre bradicardia corresponde à PO_2 na qual a taxa metabólica do peixe também começa a cair, ou seja, abaixo da $P_c\text{O}_2$. Assim, a diferença na sensibilidade do músculo cardíaco diante da hipóxia parece diferir de acordo com a espécie, habitats e estilo de vida (RANTIN et al., 1993; SOUZA et al., 2001).

Após a remoção do 1º arco branquial em tilápia-do-Nilo a bradicardia não foi abolida. Tendência diferente foi encontrada em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, que mostrou, após a remoção do primeiro par de arcos branquiais, uma diminuição da f_H em relação ao grupo intacto em normóxia, mas não apresentou bradicardia quando submetida à hipercarbia (aumento na PCO_2 na água) (PERRY & REID, 2002). A bradicardia foi abolida em traíra, *Hoplias malabaricus*, quando submetida à hipóxia após a denervação do nervo glossofaríngeo (IX) e do primeiro ramo do vago (X) que inervam o primeiro par de arcos branquiais (SUNDIN et al., 1999). Essas respostas indicam a presença de quimiorreceptores responsáveis por mediar a bradicardia confinados no 1º par de arcos braquiais nessas espécies. Por outro lado, em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (LEITE et al., 2007), trairão, *Hoplias lacerdae* (MICHELI-CAMBELL et al., 2009) e tambaqui, *Colossoma macropomum*, (SUNDIN et al., 2000) a denervação do 1º par de arcos branquiais não aboliu a bradicardia hipóxica, indicando a presença de quimiorreceptores envolvidos no controle da f_H nos demais arcos branquiais. No presente estudo, no qual a ablação bilateral do primeiro par de arcos branquiais e, conseqüentemente, a eliminação total de seus quimiorreceptores e respectivos ramos dos nervos cranianos IX e X, observou-se bradicardia hipóxica no grupo operado (Figura 28). Esta é uma evidência de que, em tilápia-do-Nilo, os

quimiorreceptores de O_2 branquiais envolvidos na mediação da bradicardia hipóxica não estão confinados no primeiro par de arcos branquiais.

Tabela 4. Valores médios \pm S.E.M. da frequência cardíaca (f_H - bpm) no grupo controle e operado frente às reduções da PO_2 da água.

f_H (bpm)			
$P_{\text{insp}}O_2$ (mmHg)	Controle	$P_{\text{insp}}O_2$ (mmHg)	Operado
133,5 \pm 1,0	*44,8 \pm 3,2	132,19 \pm 0,5	*58,9 \pm 3,0
93,0 \pm 0,9	*46,7 \pm 3,1	92,79 \pm 0,6	*57,1 \pm 3,4
63,8 \pm 1,4	*46,8 \pm 3,1	63,15 \pm 0,8	*57,1 \pm 3,0
44,2 \pm 1,1	*46,9 \pm 3,2	41,45 \pm 1,1	*56,6 \pm 3,2
25,0 \pm 0,6	44,1 \pm 3,2	25,75 \pm 0,7	48,6 \pm 3,0
15,8 \pm 0,6	42,1 \pm 3,2	17,05 \pm 0,5	43,0 \pm 2,9

Números em negrito mostram a diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. (*) apontam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios \pm SEM.; n = 10 ($P \leq 0,05$).

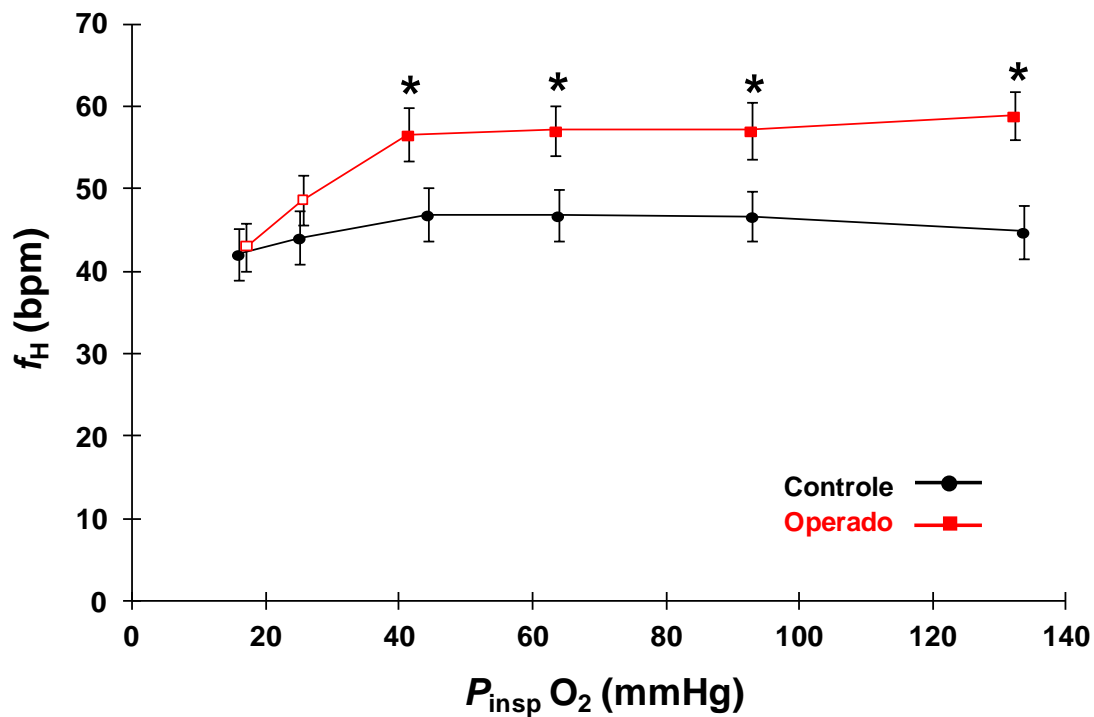


Figura 27. Efeito da hipóxia gradual na frequência cardíaca (f_H - bpm) do grupo controle e operado. Símbolos vazios apontam diferença significativa dentro do mesmo grupo em relação à normóxia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. Valores médios \pm SEM.; n = 10 ($P \leq 0,05$).

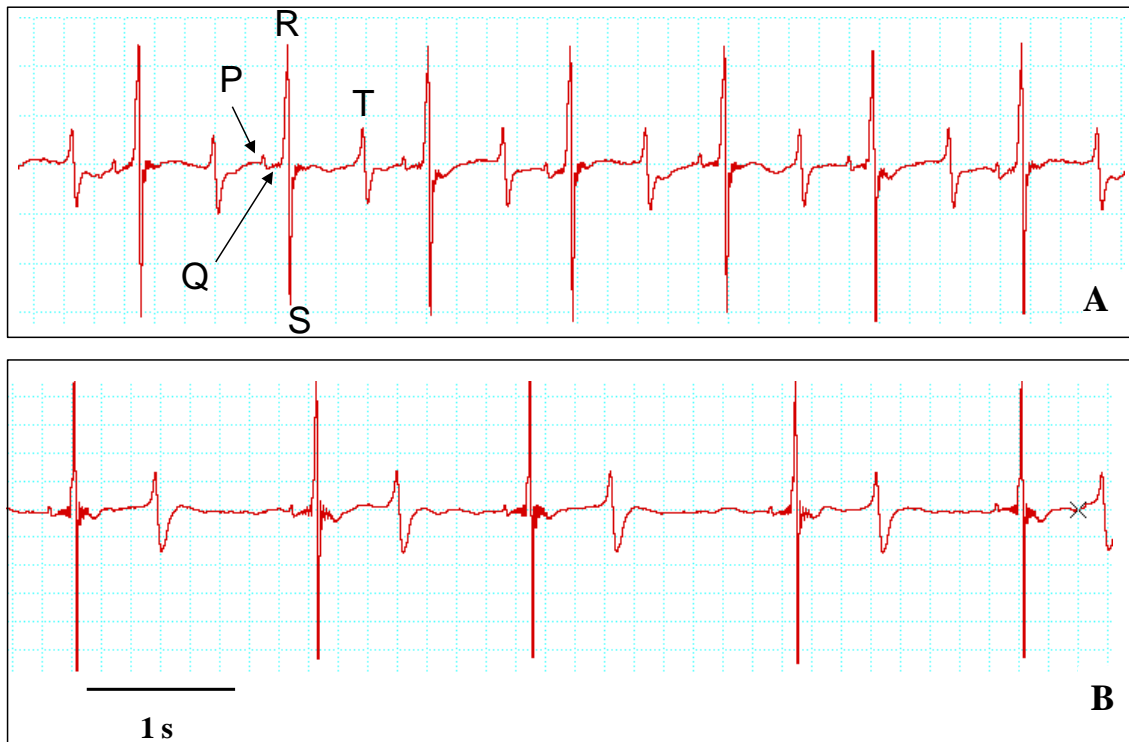


Figura 28. Registro dos complexos QRS em *Oreochromis niloticus* do grupo operado, na tensão de 140 mmHg (A) e 20 mmHg (B), para contagem e obtenção da frequência cardíaca (f_H - bpm). Detalhe para bradicardia evidenciada na tensão de 20 mmHg.

4.4. Parâmetro cardíaco de *Oreochromis niloticus* em resposta ao NaCN.

4.4.1. Frequência cardíaca (f_H)

Os valores médios da f_H em resposta às injeções internas de NaCN no grupo controle e operado estão graficamente apresentadas na figura 29, enquanto que as respostas às injeções externas de ambos os grupos são mostradas na figura 31.

As comparações da f_H dos dois grupos em resposta às injeções interna e externa de NaCN são mostradas nas figuras 30 e 32.

Da mesma maneira que os parâmetros ventilatórios, as injeções internas e externas de NaCN provocaram alteração na f_H (Figura 33). As respostas incluíram diminuição dos batimentos cardíacos (bradicardia) com rápido retorno aos valores basais em ambos os grupos.

Após a injeção interna de NaCN, o grupo controle apresentou uma diminuição dos seus valores pré injeção de até 56% (60s), seguido de taquicardia nos minutos seguintes, retornando aos seus parâmetros basais somente após 5 minutos (Figura 29A). O grupo operado apresentou uma redução de até 46% (40s) na f_H , porém não apresentou

taquicardia como no grupo controle, provavelmente por não demonstrar uma bradicardia tão acentuada (Figura 29B).

Em resposta à injeção externa de NaCN, o grupo controle novamente mostrou bradicardia porém mais breve e acentuada, de até 80% (10s), elevando seus batimentos ainda no primeiro minuto (Figura 31A). Igualmente à injeção interna, o grupo controle mostrou taquicardia durante os minutos seguintes e o retorno aos valores basais ficou próximo dos 5 minutos. O grupo operado, como observado na injeção interna, demonstrou uma atenuação da resposta com bradicardia atingindo o aumento máximo de 57% (10s) elevando seus valores ainda no primeiro minuto (Figura 31B). A taquicardia apresentada no grupo operado foi bem menor do que a observada no grupo controle.

Como dito anteriormente, o NaCN atua em uma das etapas da respiração celular: a cadeia respiratória ou fosforilação oxidativa. A fosforilação oxidativa envolve a redução de O_2 a H_2O , sendo os elétrons doados pelo NADH e $FADH_2$ e a energia liberada é usada para a formação de ATP (a partir de $ADP + P_i$).

Existem três tipos de transportadores de elétrons na cadeia respiratória: ubiquinona, citocromo e proteínas Fe-S (ferro - enxofre). O cianeto se liga ao Fe^{3+} do citocromo c, bloqueando a citocromo aa3 (enzima que medeia a transferência de elétrons para o oxigênio molecular) (Figura 34).

Dessa maneira, em presença de NaCN não há consumo de O_2 , levando a anóxia histotóxica (ONG, 1989) e também a síntese de ATP deixa de acontecer.

Assim, como o O_2 não consegue ser liberado aos tecidos é necessário que o animal acione algum ajuste cardiorrespiratório para manter a homeostase do organismo. Da mesma forma que em hipóxia, após as injeções de NaCN observa-se a bradicardia na maioria das espécies de peixes estudadas, juntamente com aumento da ventilação.

Como discutido para os parâmetros ventilatórios, os quimiorreceptores de O_2 envolvidos nas respostas cardíacas também não apresentam um padrão na localização e orientação.

Segundo Burleson et al. (1992) a maioria dos teleósteos de respiração exclusivamente aquática apresentam receptores que medeiam a f_H localizados no primeiro arco branquial e orientados externamente como encontrado no bacalhau do atlântico, (*Gadus morhua*) (FRITSCHÉ & NILSSON, 1989). Sea raven (*Hemitripterus americanus*) (SAUNDERS & SUTERLIN, 1971) e o esturjão (*Aspenser naccarii*)

(MCKENZIE et al., 1995) também apresentam receptores voltados para o meio externo envolvidos na resposta da bradicardia.

Porém, com o aumento do número de espécies estudadas nota-se que os receptores envolvidos na modulação da f_H não estão somente orientados externamente. Como exemplo temos a traíra que apresenta quimiorreceptores localizados no 1º arco branquial e orientados internamente, modulando a f_H (SUNDIN et al., 1999). Já o elasmobrânquio “dogfish” apresenta receptores monitorando a PO_2 da água e distribuídos na cavidade orobranquial (BARRET & TAYLOR, 1984). Enquanto que, jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, (LOPES et al., 2010), trairão, *Hoplias lacerdae*, (MICHELI-CAMPBELL et al., 2009), pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (LEITE et al., 2007) e tambaqui, *Colossoma macropomum*, (SUNDIN. et al., 2000) apresentam receptores em todos os arcos branquiais e orientados tanto interna quanto externamente, modulando a f_H .

No presente trabalho, nota-se a mesma tendência de distribuição dos quimiorreceptores em todos os arcos branquiais monitorando a PO_2 tanto do sangue quanto a água.

Porém, ao compararmos os dois grupos observa-se uma bradicardia menos acentuada no grupo operado (Figuras 30 e 32). A mesma resposta de atenuação da resposta foi observada em catfish, *Ictalurus punctatus*, (BURLESON & SMATRESK, 1990) e após as injeções externas de NaCN com pacus com o primeiro par de arcos branquiais denervados (LEITE et al., 2007).

Essas constatações demonstram que em tilápia-do-Nilo existem receptores localizados no 1º arco branquial que modulam a f_H , mas não exclusivamente neste local. Os quimiorreceptores são orientados internamente e externamente e provavelmente são distribuídos por todos os arcos branquiais.

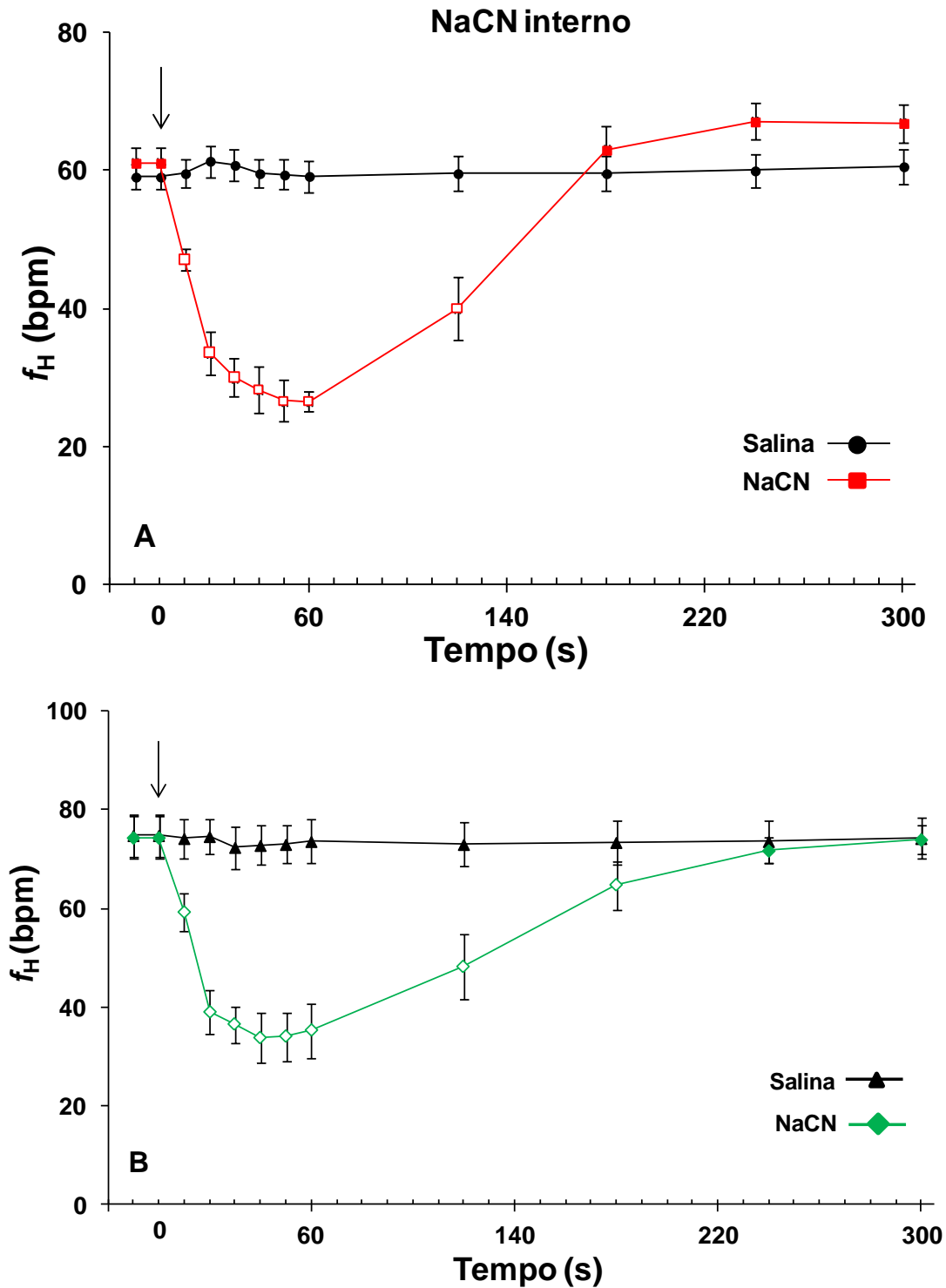


Figura 29. Respostas cardíacas (f_H) de *Oreochromis niloticus* após injeções internas de salina e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). A seta indica o momento da injeção. Os símbolos vazios indicam diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

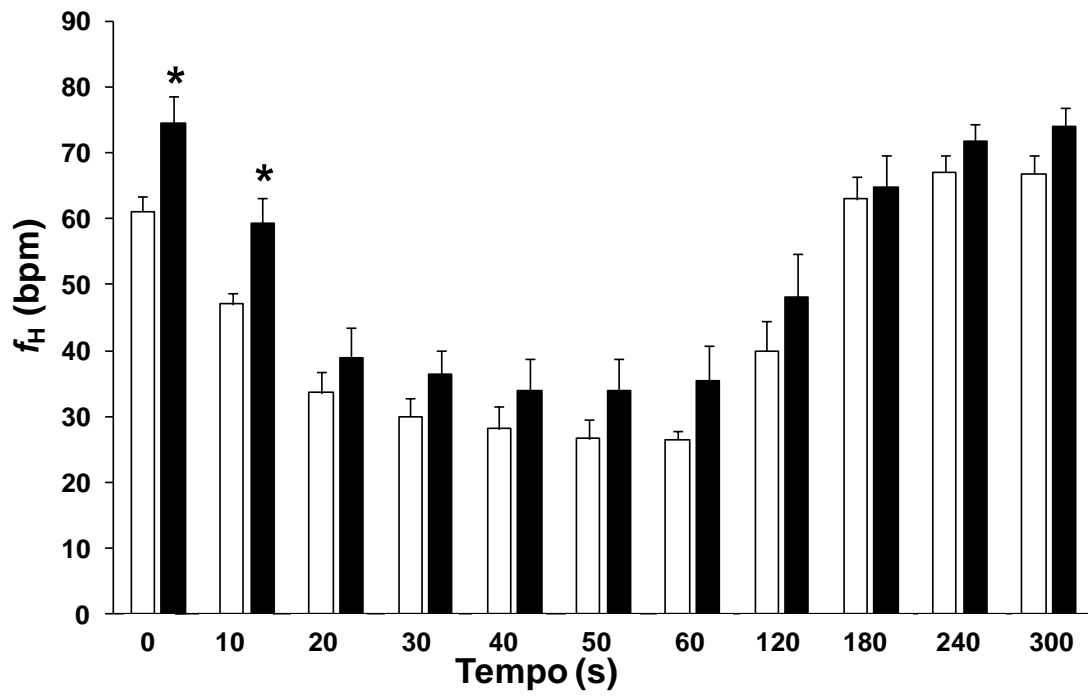


Figura 30. Comparação da frequência cardíaca (f_H) de *Oreochormis niloticus*, do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção interna de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; n = 10, (P \leq 0,05).

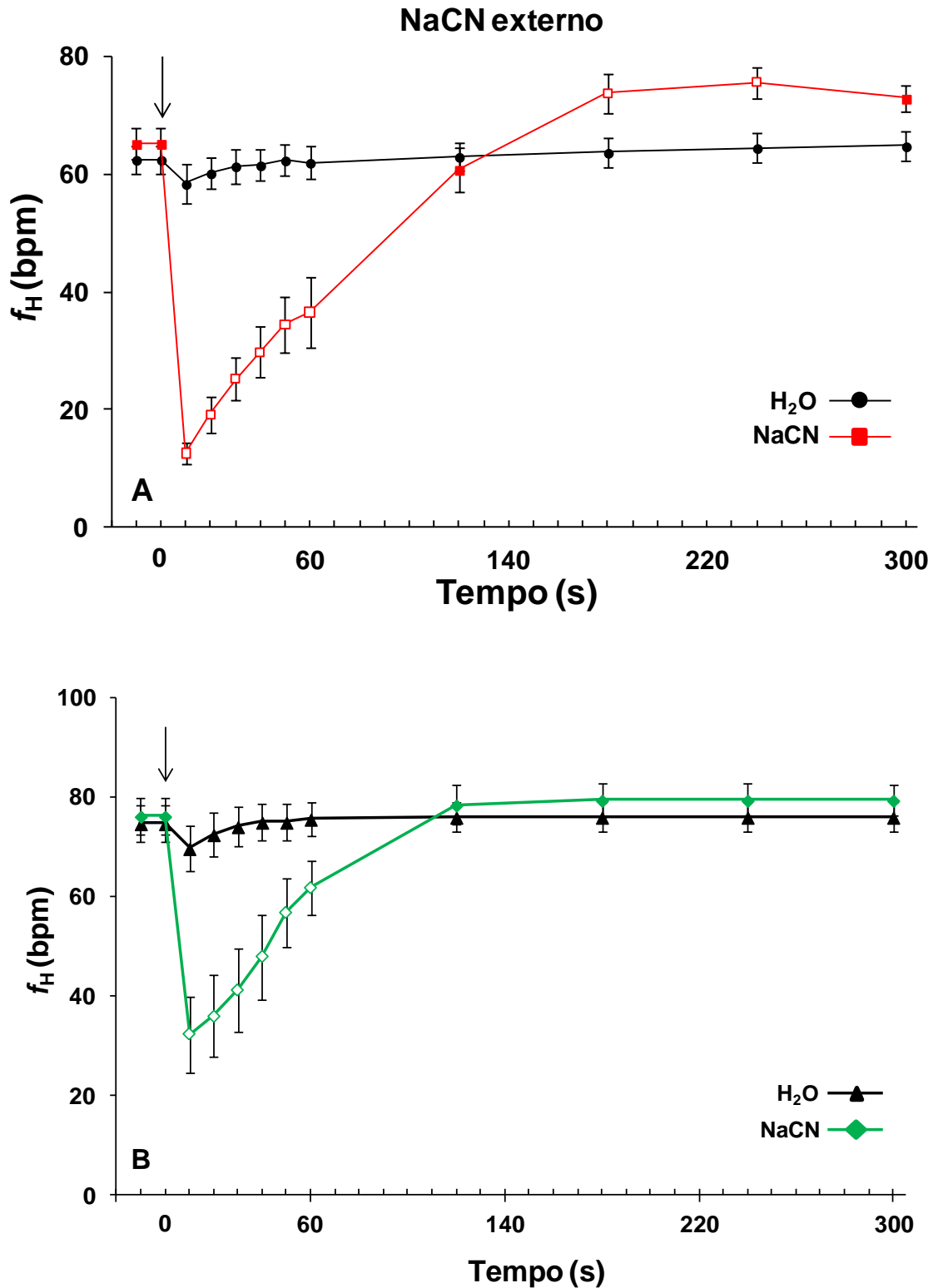


Figura 31. Frequência cardíaca (f_H) de *Oreochromis niloticus* após injeções externas de H₂O e NaCN no grupo controle (A) e operado (B). Os símbolos vazios demonstram diferença significativa dentro do grupo em relação aos respectivos valores basais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

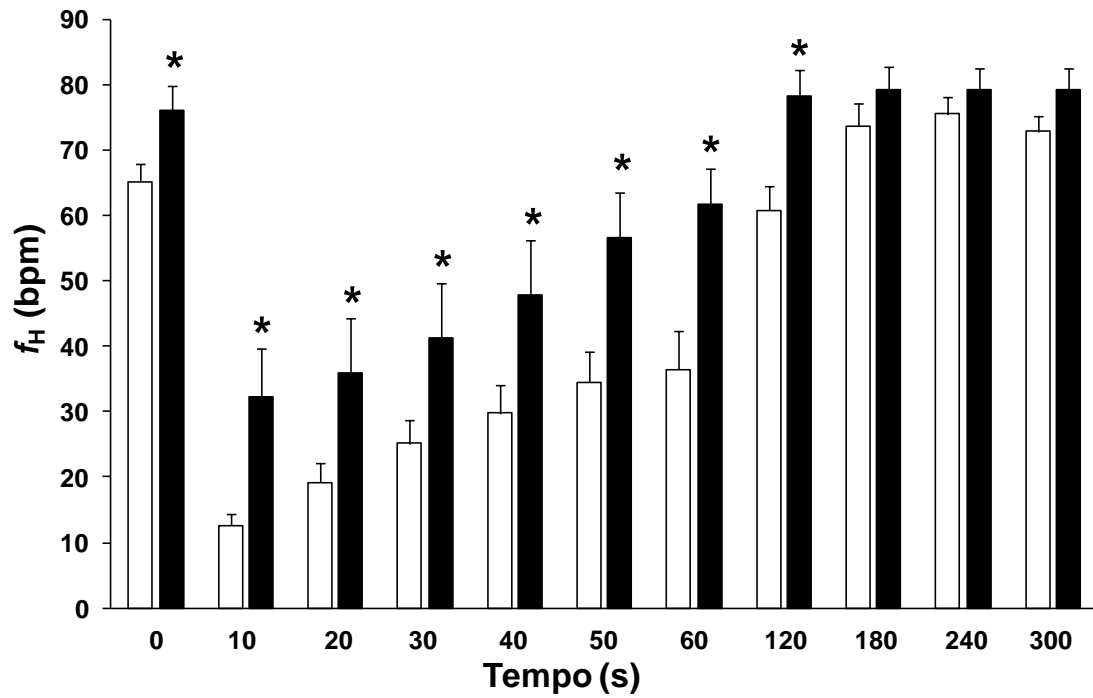


Figura 32. Comparação da frequência cardíaca (f_H) de *Oreochormis niloticus*, do grupo controle (barras brancas) e operado (barras pretas) após injeção externa de NaCN. Os asteriscos representam diferença significativa entre os dois grupos. Os pontos são médias \pm SEM.; $n = 10$, ($P \leq 0,05$).

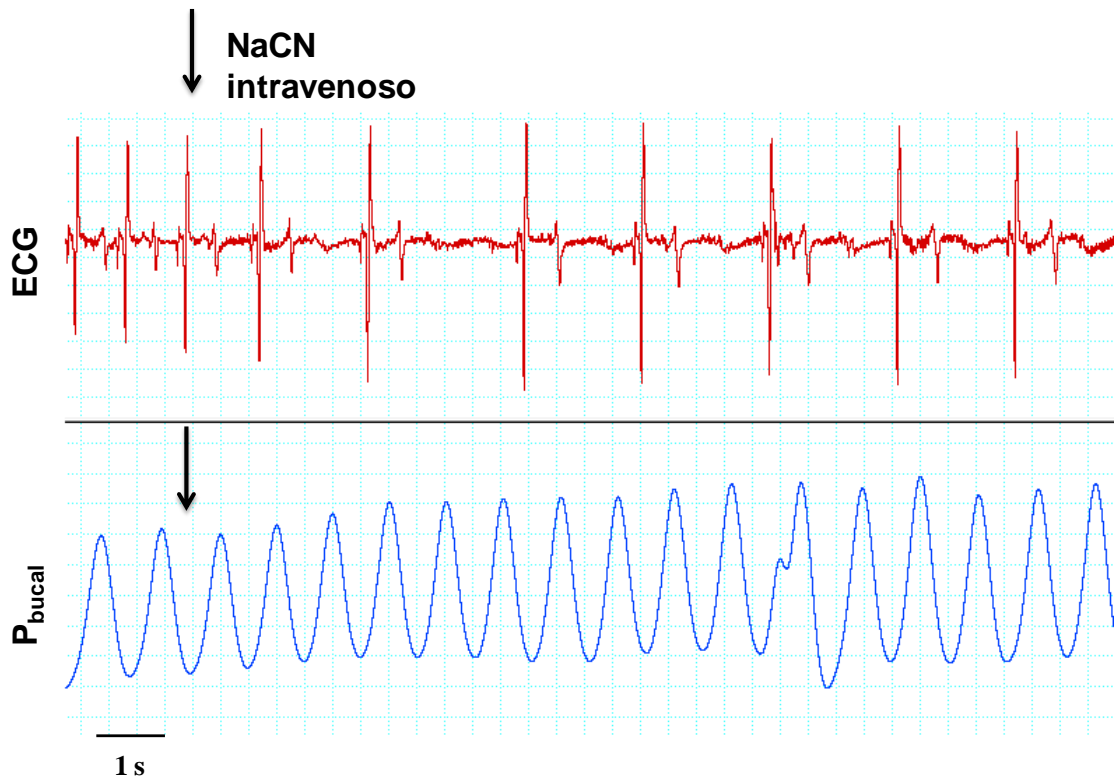


Figura 33. Traçados representativos dos registros dos complexos QRS e da pressão intrabucal (P_{bucal}) em *Oreochromis niloticus*, evidenciando as alterações cardiorrespiratórias apresentadas após administração intravenosa de NaCN.

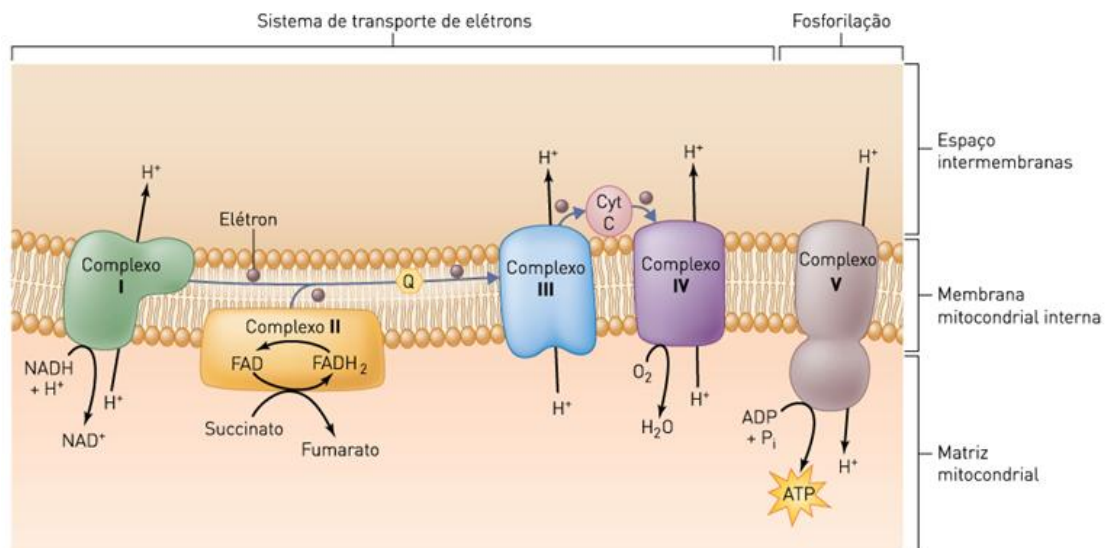


Figura 34. Esquema da fosforilação oxidativa mitocondrial, evidenciando o local de atuação do NaCN (Modificado de MOYES & SCHULTE, 2010).

5. Conclusão

Pelos resultados obtidos pode-se concluir:

- a. A extirpação do primeiro par de arcos branquiais não provocou uma drástica redução da $\dot{V}O_2$, considerando-se que aproximadamente $\frac{1}{4}$ da superfície funcional respiratória foi eliminada com a cirurgia.
- b. A remoção do primeiro par de arcos branquiais não aboliu nenhuma das respostas ventilatórias (f_R , V_T e, conseqüentemente, a \dot{V}_G) de *Oreochromis niloticus* frente à hipóxia gradual. Isto é uma forte indicação de que os quimiorreceptores de O_2 branquiais envolvidos na mediação da hiperventilação branquial em resposta à hipóxia não estão restritos ao primeiro par de arcos branquiais.
- c. A remoção do primeiro par de arcos branquiais não promoveu uma grande diminuição na EO_2 em tilápia-do-Nilo. Pode-se concluir, portanto, que os mecanismos homeostáticos cardiorrespiratórios acionados por esta espécie foram eficientes na maioria das tensões hipóxicas, compensando a extirpação de parte de sua área branquial de troca gasosa.
- d. A ablação bilateral do primeiro par de arcos branquiais também não aboliu a bradicardia hipóxica. Isto também é uma forte evidência de que os quimiorreceptores de O_2 branquiais envolvidos na mediação da bradicardia hipóxica não estão restritos ao primeiro par de arcos branquiais.
- e. Após a administração intravenosa e intrabucal de NaCN nos peixes sem o primeiro par de arcos branquiais notou-se apenas atenuação dos ajustes cardiorrespiratórios, indicando a presença de quimiorreceptores monitorando tanto a PO_2 do sangue arterial quanto a PO_2 da água inspirada em tilápia-do-Nilo.

6. Referências Bibliográficas

AGUIAR, L.H.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of temperature on the cardio-respiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 299-308, 2002.

BAILLY, Y.; DUNEL-ERB, S.; LAURENT, P. The neuroepithelial cells of the fish gill filament: Indolamine-immunocytochemistry and innervation. **Anat Rec.**, v. 233, p. 143-161, 1992.

BARRET, D.J.; TAYLOR, E.W. Changes in heart rate during progressive hypoxia in the dogfish, *Scyliorhinus canicula* L.: evidence for a venous oxygen receptor. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 78, p. 697-703, 1984.

BELÃO, T.C.; LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ A. L.; RANTIN, F. T. Cardiorespiratory responses to hypoxia in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), an air-breathing fish. **J. Comp. Physiol. B**, v.7, p. 905-916, 2011.

BRAUNER, C.J.; VAL, A.L. Oxygen transfer. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.; Randall, D.J. (eds). **The physiology of tropical fishes**. Fish physiology. v. 21. Academic press Inc., 2006. p. 277-306.

BOOTH, J.H. The effects of oxygen supply, epinephrine, and acetylcholine on the distribution of blood flow in trout gills. **J. exp. Biol.**, v. 83, p. 31-39, 1979.

BURLESON, M.L.; SMATRESK, N.J. Evidence for two oxygen-sensitive chemoreceptor loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Physiol. Zool.**, v. 63, p. 208-221, 1990.

BURLESON, M.L.; SMATRESK, N.J.; MILSOM, W.K. Afferent inputs associated with cardioventilatory control in fish. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Farrel, A.P. (Eds). **Fish Physiology**, vol. XII B. San Diego: Academic press Inc., 1992. p. 389-426.

- BURLESON, M.L.; MILSOM, W.K. Sensory receptors in the 1st gill arch of rainbow-trout. **Resp. Physiol.**, v. 93, p. 97-110, 1993.
- BURLESON, M.L.; MILSOM, W.K. Cardio-ventilatory control in rainbow trout: I. Pharmacology of branchial, oxygen-sensitive chemoreceptors. **Resp. Physiol.**, v. 100, p. 231-238, 1995.
- BURLESON, M.L.; MERCER S.E; WILK-BLASZCZAK M.A. Isolation and characterization of putative O₂ chemoreceptor cells from the gills of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Brain Res.**, v. 1092, p. 100-107, 2006.
- BURLESON, M.L. Sensory innervations of the Gills: O₂- sensitive chemoreceptors and mechanoreceptors. **Acta Histochemica**, v. 111, p. 196-206, 2009.
- BUTLER, P. J.; TAYLOR, E. W. Response of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) to slowly induced and rapidly induced hypoxia. **Comp. Biochem Physiol. A**, v. 39, p. 307-323, 1971.
- BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W.; SHORT, S. The effect of sectioning cranial nerves V, VII, IX and X on the cardiac response of the dogfish *Scyliorhinus canicula* to environmental hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 69, p. 233-245, 1977.
- CAMPBELL, H.A.; EGGINTON, S. The vagus mediates cardiorespiratory coupling that changes with metabolic demand in a temperate nototheniid fish. **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 2472-2480, 2007.
- CHERVINSK J. Environmental physiology of tilapias. In: Pullin, R.S.V.; Lowe-McConnell, R.H. (Eds). **The Biology and Culture of Tilapias**:. ICLARM Conference Proceedings 7, International Center for Living Aquatic Resources Managements, Manila, Philippines, 1982. p. 432.
- COOLIDGE, E.H.; Ciuhandu, C.S.; Milsom, W.K. A comparative analysis of putative oxygen-sensing cells in the fish gill. **J. exp. Biol.**, v. 211, p. 1231-1242, 2008.

- DEJOURS, P. **Principles of Comparative Respiratory Physiology**. 2nd edn. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press, Amsterdam, 1981. p. 265.
- DONELLY, D.F. K⁺ currents of glomus cells and chemosensory functions of carotid body. **Respir. Physiol.**, v. 115, p. 151-160, 1999.
- DUNEL-ERB, S.; BAILLY, Y.; LAURENT, P. Neuroepithelial cells in fish gill primary lamellae. **J. Appl. Physiol.**, v. 53, p. 1342-1353, 1982.
- DUTHIE, G.G; HUGHES,G.M. The effects of reduced gill area and hyperoxia on the oxygen consumption and swimming speed of rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 127, p. 349-354, 1987.
- FARRELL, A. P.; SOBIN, S. S.; RANDALL, D. J.; CROSBY, S. Intralamellar blood flow patterns in fish gills. **Am. J. Physiol.**, v. 239, p. 428-436, 1980.
- 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. Gill morphometry of cichlid fish, *Oreochromis (Sarotherodon) niloticus* (PISCES, TELEOSTEI). **Ciência e Cult.** **38**, v. 1, p. 192-198, 1986b.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Lethal temperatures of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 46, p. 589-595, 1986a.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental reductions of dissolved oxygen. **Biol. Fisiol. Anim.**, v. 11, p. 51-60, 1987.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish Biol.**, v. 35, p. 509-519, 1989.

- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. **Aquaculture.**, v. 127, p. 339-346, 1994.
- FREITAS, A.R.; PRESOTTI, C.V.; TORAL, F.L.B. Alternativas de análises em dados de medidas de bovinos de corte. **Rev. Bras. de Zootec.**, v. 34, n.6, p. 2233-2244, 2005.
- FRITSCHÉ, R.; NILSSON, S. Cardiovascular responses to hypoxia in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Exp. Biol.**, v. 48, p. 153-160, 1989.
- GERALD, J.W.; CECH JR, J.J. Respiratory responses of juvenile catfish (*Ictalurus punctatus*) to hypoxic conditions. **Physiol. Zool.**, v. 43, p. 47-54, 1970.
- GILMOUR K.M.; PERRY, S.F. Branchial chemoreceptor regulation of cardiorespiratory function. In: Hara T.; Zielinski, B. (Eds). **Sensory systems neuroscience**, Fish Physiology v. 25. San Diego: Academic Press, 2007. p. 97-120.
- GLASS M.L.; RANTIN, F.T.; VERZOLA, R.M.M.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp, *Cyprinus carpio*. **J. Fish. Biol.**, v. 39, p. 142-149, 1991.
- GLASS, M.L. Ventilatory responses to hypoxia in ectothermic vertebrates. In: Wood, S. C.; Weber, R.E.; Hargens, A.R.; Mallard, R.W. (Eds). **Physiological adaptation in vertebrate respiration, circulation and metabolism**. New York: Marcel Dekker Inc., 1992. p. 97-118.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Regulação nervosa da circulação e o controle rápido da pressão arterial. **Tratado de Fisiologia médica**. Ed. Elsevier. 2006. p. 204-215.
- HUGHES, G.M.; SAUNDERS, R.L. Responses of respiratory pumps to hypoxia in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J. Exp. Biol.**, v. 53, p. 529-545, 1970.

- HUGHES, G.M. Respiratory responses to hypoxia in fish. **Amer. Zool.**, v. 13, p. 475-489, 1973.
- HUGHES, G.M.; TUURALA, H.; SOIVIO A. Regional distribution of blood in the gills of rainbow trout in normóxia and hypoxia: a morphometric study with two fixatives. **Ann Zoo Feninci**, v. 15, p. 226-234, 1978.
- HUGHES, G.M. Scaling of respiratory areas in relation to oxygen consumption of vertebrates. **Experientia**, v. 40, p. 519-524, 1984.
- IVERSEN, N.K.; MCKENZIE, D. J.; MALTE, H.; WANG, T. Reflex bradycardia does not influence oxygen consumption during hypoxia in the European eel (*Anguilla anguilla*) **J. Comp. Physiol. B**, v.180, p. 495-502, 2010.
- JIA, X.X.; BURGGREN, W.W. Developmental changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrogs (*Rana Catesbeiana*). **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 2237-2248, 1997.
- JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; GRIGG, G.C. Respiratory control in lungfish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 20, p. 835-854, 1967.
- KALININ, A.L. **Função respiratória de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de O₂ ambiental: tomada de O₂ branquial e cutânea, medidas diretas e determinações indiretas dos parâmetros ventilatórios.** 1996. 101 f. Tese (Doutorado em Ecologia) -Programa de pós-graduação em ecologia e recursos naturais. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP.
- KALININ, A.L.; SEVERI, W.; GUERRA, C.D.R.; COSTA, M.J.; RANTIN, F.T. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus* during normoxia and exposed to graded hypoxia. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 60, n. 2, p. 249-254, 2000.

- KONDO, H.; IWANAGA, T.; NAKAJIMA, T. Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. **Cell Tissue Res.**, v. 227, p. 291-295, 1982.
- LEITE, C.A.C.; FLORINDO L.H.; KALININ A.L.; MILSOM, W.K.; RANTIN F.T. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Comp. Physiol. A**, v. 193, p. 1001-1011, 2007.
- LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp – How it affects O₂ uptake, ventilation and O₂ extraction from water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38-49, 1979.
- LOPES, J.M.; BOIJINK, C.H.; FLORINDO, L.H.; LEITE, C.A.C; KALININ, A.L.; MILSOM, W.K; RANTIN, F.T. Hypoxic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): role of branchial O₂ chemoreceptors. **J. Comp. Physiol. B**, v. 180, p. 797-811, 2010.
- LOPEZ-BARNEO, J.; LOPEZ-LOPEZ, J.R.; URENA, J.; GONZALEZ, C. Chemotransduction in the carotid body: K current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. **Science**, v. 241, p. 580-582, 1988.
- MARTINS, N.D.; COLVARA, W. A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.K. Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 84, p. 154-159, 2011.
- MASSARI, M.M.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ECG-waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J. Therm. Biol.**, v. 23, p. 283-290, 1998.
- MCKENZIE, D.J.; BURLESON, M.L.; RANDALL, D.J. The effects of branchial denervation and pseudobranch ablation on cardio-ventilatory control on an air-breathing fish. **J. Exp. Biol.**, v. 161, p. 347-365, 1991.

- MCKENZIE, D.J.; TAYLOR, E.W.; BRONZI P.; BOLIS, C.L. Aspects of cardioventilatory control in the adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). **Resp. Physiol.**, v. 100, p- 45-53, 1995.
- MCKENZIE, D.J.; SKOV, P.T.; TAYLOR, E.W.; WANG T.; STEFFENSEN J.F. Abolition of reflex bradycardia by cardiac vagotomy has no effect on the regulation of oxygen uptake by Atlantic cod in progressive hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 153, p. 332-338, 2009.
- MICHELI-CAMPBELL, M.A.; CAMPBELL H.A.; KALININ A.L.; RANTIN F.T. The relationship between O₂ chemoreceptors, cardio-respiratory reflex and hypoxia tolerance in the neotropical fish *Hoplias lacerdae*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 154, p. 224-232, 2009.
- MILSOM, W.K.; BRILL, R.W. Oxygen sensitive afferent information arising from the first gill arch of yellowfin tuna. **Respir. Physiol.**, v. 66, p. 193-203, 1986.
- MILSOM, W.K. Control of breathing in fish: Role of chemoreceptors. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds). **Physiology and Biochemistry of the Amazon. Manaus: INPA**, 1996. p. 359-377.
- MILSOM, W.K.; REID, S.G.; RANTIN, F.T.; SUNDIN, L. Extrabranhial chemoreceptors involved in respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 1765-1774, 2002.
- MILSOM, W.K.; BURLESON, M.L. Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. **Respir. Physiol. Neurob.**, v. 157, p. 4-11, 2007.
- MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. Sistemas Respiratórios. In: **Princípios de Fisiologia Animal** 2^aed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 412-467.
- NILSSON, S.; SUNDIN, L. Gill blood flow control. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 119, p. 137-147, 1998.

- NURSE, C.A. Carbonic anhydrase and neuronal enzymes in cultured cells glomus of the carotid body of the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 261, p. 65-71, 1990.
- 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. A**, v. 139, p. 479-485, 2004.
- ONG, H.K. Cyanogenic and goitrogenic factors in pig nutrition. **Pig news and information**, v. 10, p. 19-23, 1989.
- PALING, J.E. A method of estimating the relative volumes of water flowing over the different gills of a freshwater fish. **J. Exp. Biol.**, v. 48, p. 533-544, 1968.
- PERRY, S.F.; REID S.G. Cardiorespiratory adjustments during hypercarbia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are initiated by external CO₂ receptors on the first gill arch. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 3357-3365, 2002.
- PERRY, S.F.; DESFORGES, P.R. Does bradycardia or hypertension enhance gas transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 144, p. 163-172, 2006.
- PIIPER, J.; SCHEID, P. Gas exchange in vertebrates through lungs, gills, and skin. **News in Physiol. Sciences**, v. 7, p. 199-203, 1992.
- RANDALL, D.J. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 275-288, 1982.
- RANDALL, D.J.; BUEGGREN, W.; FRENCH, K. Gas exchange and acid-base balance. In: Randall, D.J.; Bueggren, W.; French, K. (Eds). **Animal Physiology – Mechanisms and Adaptations**. New York: W.H. Freeman and Co, 1997. p. 517-570.

- RANTIN, F.T.; JOHANSEN, K. Responses of the teleost, *Hoplias malabaricus* to hypoxia. **Env. Biol. Fish.**, v. 3, p. 221-228, 1984.
- RANTIN, F.R.; 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.; VERZOLA, R.M.M.; FERNANDES, M.N. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Env. Biol. Fish.**, v. 36, p. 93-97, 1993.
- RANTIN, F.T.; GUERRA, C.D.R.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 119, p. 991-997, 1998.
- REID, S.G.; PERRY, S.F. Peripheral O₂ chemoreceptors mediate humoral catecholamine secretion from fish chromaffin cells. **Am. J. Physiol.**, v. 284, p. 990-999, 2003.
- REID, S.G.; SUNDIN L.; MILSOM, W.K. The Cardiorespiratory System in Tropical Fishes: Structure, Function, and Control. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.; Randall, D.J. (eds). **The physiology of tropical fishes**. Fish physiology. v. 21. San Diego: Academic press Inc, 2006. p. 225-265.
- ROMER, A.S. **The vertebrate body**. Philadelphia: Saunders; 1962.
- SATCHELL, G.H. The reflex co-ordination of the heart beat with respiration in the dogfish. **J. Exp. Biol.**, v. 37, p. 719-731, 1960.
- SAUNDERS, R.L.; SUTTERLIN, A.M. Cardiac and respiratory responses to hypoxia in the sea raven, *Hemitripterus americanus*, and an investigation of possible control mechanisms. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, v. 28, p. 491-503, 1971.

- SCHMIDT-NIELSEN, K. Respiração. In: Schmidt-Nielsen, K. (Ed.). **Fisiologia animal, Adaptação e meio ambiente**. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda., 2002. p. 5-61.
- SHORT, S.; TAYLOR, E.W.; BUTLER P.J. The effectiveness of oxygen transfer during normoxia and hypoxia in the dogfish (*Scyliorhinus canicula L.*) before and after cardiac vagotomy. **J Comp Physiol Biol.**, v. 132, p. 289-295, 1979.
- SMATRESK, N.L.; BURLESON, M.L.; AZIZI, S.Q. Chemoreflexive responses to hypoxia and NaCN in longnose gar: evidence for two chemoreceptive loci. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. 116-125, 1986.
- 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. B**, v. 171, p. 483-489, 2001.
- STEFFENSEN, J.F.; LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Gill ventilation and O₂ extraction during graded hypoxia in two ecologically distinct species of flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Env. Biol. Fish.**, v. 7, p. 157-163, 1982.
- SUNDIN, L.; REID, S.G.; KALININ A.L.; RANTIN, F.T.; MILSOM, W.K. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*) O₂ chemoresponses. **Resp. Physiol.**, v. 116, p. 181-199, 1999.
- SUNDIN, L.; REID, S.G.; RANTIN, F.T.; MILSOM, W.K. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **J. Exp. Biol.**, v. 203, p. 1225–1239, 2000.
- SUNDIN L.; NILSSON, S. Branchial Innervation. **J. Exp. Zool.**, v. 293, p. 232-248, 2002.

- TANAJURA, V.S. **Determinação da orientação dos quimiorreceptores branquiais de oxigênio em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 26 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- TAYLOR, E.W.; SHORT, S.; BUTLER P.J. The role of the cardiac vagus in the response of the dogfish *Scyliorhinus canicula* to hypoxia. **J Exp Biol.**, v. 70, p. 57-75, 1977.
- TAYLOR, E.W.; BARRETT, D.J. Evidence of a respiratory role for the hypoxic bradycardia in the dogfish *Scyliorhinus canicula* L. **Comp Biochem Physiol A**, v. 80, p. 99-102, 1985.
- TAYLOR, E.W. Nervous control of the heart and cardiorespiratory interactions. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and A. P. Farrell (Eds) **Fish Physiology** vol. 12B, San Diego: Academic Press, 1992. p. 343-387.
- TAYLOR, E.W.; JORDAN, D.; COOTE, J.H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol. Revs.**, v. 79, p. 855-916, 1999.
- THOMAZ, J.M.; MARTINS, N.D.; MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON). **Ecotoxicol. Env. Saf.**, v. 72, p. 1413-1424, 2009.
- VAN DAM, L. **On the utilization of oxygen and regulation of breathing in some aquatic animals**. Tese de doutorado, Universidade de Groningen. 1938.
- WITHERS, P.C. Aquatic respiration. **Comparative Animal Physiology**. Toronto: Saunders College Publishing, 1992. p. 565-607.

ZACCONE, G.; FASULO, S.; AINIS, L. Neuroendocrine epithelial cell system in respiratory organs of air-breathing and teleost fishes. **Int. Rev. Cytol.**, v. 157, p. 277-314, 1995.

ZHANG, M.; NURSE, C.A. Does endogenous 5-HT mediate spontaneous rhythmic activity in chemoreceptor clusters of rat carotid body? **Brain Res.**, v. 872, p. 199-203, 2000.