

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

**Efeitos da abolição da bradicardia reflexa nas respostas
cardiorrespiratórias de tambaqui, *Colossoma macropomum*
(Cuvier, 1818), em hipóxia severa: Vagotomia *versus* inibição
farmacológica**

Daniele Martinez De Sunti

São Carlos - SP

2013

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

**Efeitos da abolição da bradicardia reflexa nas respostas
cardiorrespiratórias de tambaqui, *Colossoma macropomum*
(Cuvier, 1818), em hipóxia severa: Vagotomia *versus* inibição
farmacológica**

Daniele Martinez De Sunti

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

***Orientação: Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin
Coorientação: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo***

São Carlos - SP

2013

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

S958ea

Sunti, Daniele Martinez De.

Efeitos da abolição da bradicardia reflexa nas respostas cardiorrespiratórias de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), em hipóxia severa : vagotomia versus inibição farmacológica / Daniele Martinez De Sunti. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia comparada. 2. Tambaqui (Peixe). 3. Hipóxia. 4. Bradicardia hipóxica. 5. Vagotomia. 6. Atropina. 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 Daniele Martinez De Sunti

Dia 14/06/2013

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


Prof. Dr. Cleo Alcântara Costa Leite.....


Prof^a. Dr^a. Kênia Cardoso Bicego.....


*Aos meus pais, que sempre me apoiaram
e me incentivaram neste caminho,
dedico este trabalho.*

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o melhor adaptado às mudanças”.

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pela oportunidade, confiança e exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo pela oportunidade, incentivo, paciência, confiança, por todo conhecimento teórico e prático ensinado, pelas discussões e em especial pela amizade.

À Prof. Dr. Ana Lucia Kalinin pela convivência, incentivo e amizade.

Aos integrantes da banca examinadora por terem aceitado o convite, pela análise do trabalho e pelas valiosas considerações.

Aos professores do Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF), em especial àqueles com que tive oportunidade de conviver durante as disciplinas.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e do PIPGCF por todo auxílio prestado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À minha família pelo apoio, incentivo, confiança, compreensão e paciência.

Ao Pedro, grande companheiro, por todo amor, carinho, paciência e incentivo de sempre.

Aos amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (UFSCar): Vivian, Thiago, Rafael “Z”, Diana, Nathan, Felipe, Elinton, Lucas, Talita e do Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados (UNESP-Rio Preto): Ariela, Carlos, Flávio, Henrique (Pelicano), Ivã, Leonardo, Lucas, Maria Laura, Mariana, Nágila, Victor, Victória e Vinícius (Puto) pelos ensinamentos, discussões, conselhos, apoio e agradável convivência.

À Maíra e às meninas da rep. Zóio de Gata: Luciane, Yasmim e Amanda que me receberam em Araraquara e em São Carlos de forma tão amiga e carinhosa.

Aos eternos amigos da Turma 51 por todo apoio, incentivo, companhia e exemplos de força e perseverança.

A todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram para a execução deste trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal nestes dois anos.

RESUMO

A bradicardia hipóxica é uma resposta reflexa à hipóxia presente na maioria dos teleósteos. Este reflexo é induzido por um aumento no tônus vagal inibitório e iniciado pela estimulação de quimiorreceptores de oxigênio (O_2). Apesar de muito descrita e bem caracterizada, a hipótese de que esta redução na frequência cardíaca (f_H) melhore a transferência de O_2 pelas brânquias ainda não foi comprovada. A utilização de diferentes métodos para inibir a bradicardia hipóxica (vagotomia e atropinização) pode ter contribuído para gerar respostas cardiorrespiratórias diversas e tornar esta questão ainda mais controversa. Neste trabalho foram avaliadas as variáveis cardiorrespiratórias (f_H ; taxa metabólica – $\dot{V}O_2$; extração de O_2 da corrente ventilatória – EO_2 ; ventilação branquial – \dot{V}_G ; frequência respiratória – f_R ; volume ventilatório – V_T e necessidade ventilatória – $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$) do tambaqui, *Colossoma macropomum*, em normóxia, após 40 min de hipóxia severa (20 mmHg) e durante 3 h de recuperação subsequente. Cada animal foi submetido a este protocolo antes (Ctr), após administração de atropina (A) e após vagotomia (V). Em hipóxia os animais Ctr apresentaram a característica bradicardia hipóxica (redução de 56% na f_H) com aumentos na f_R (~96 %) e V_T (~275 %) elevando muito a \dot{V}_G (~650 %). Esta alta \dot{V}_G , provavelmente foi responsável pela queda significativa na EO_2 (65%), consequentemente reduzindo a $\dot{V}O_2$ (62 %) e aumentando muito a $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ (1800 %) em hipóxia. O início do período de recuperação do grupo Ctr foi caracterizado por elevada $\dot{V}O_2$ (~200 % acima dos valores de normóxia), acompanhada de taquicardia (50,6 bpm) e recuperação gradual da EO_2 , f_R , V_T e \dot{V}_G . A atropina e a vagotomia elevaram a f_H em normóxia (de $32,0 \pm 1,7$ para $77,8 \pm 4,1$ e $80,6 \pm 5,8$ bpm) indicando um alto tônus vagal de repouso, sendo que nestes dois grupos a f_H permaneceu constante em todos os tempos experimentais evidenciando que a taquicardia pós-hipóxia foi, provavelmente, consequência de uma redução no tônus colinérgico. Na EO_2 , $\dot{V}O_2$ e demais parâmetros respiratórios analisados não houve diferenças entre os grupos Ctr, A e V, em nenhum momento do protocolo. Estes resultados demonstram que a bradicardia hipóxica, possivelmente, não melhora a transferência de O_2 pelas brânquias de tambaqui independente do método de abolição do reflexo bradicárdico. Portanto, outras hipóteses sobre a função da bradicardia hipóxica, como na proteção do miocárdio, devem ser investigadas nesta espécie.

Palavras-chave: Tambaqui; Hipóxia; Bradicardia Hipóxica; Vagotomia; Atropina.

ABSTRACT

Hypoxic bradycardia is a reflex response to hypoxia observed in most fish species studied so far. This reflex is initiated by the stimulation of O₂ chemoreceptors and induced by an increase in the inhibitory vagal tonus. Despite of being well described and characterized, the hypothesis that hypoxic bradycardia improves the O₂ transference from the ventilatory water to the gills still remain to be proved. The utilization of different methods to inhibit hypoxic bradycardia (vagotomy and atropinization) may have contributed to generate different cardiorespiratory responses, making this issue even more controversial. In this study the cardiorespiratory variables (heart frequency – f_H , metabolic rate - $\dot{V}O_2$, O₂ extraction from the ventilatory current – EO_2 , gill ventilation - \dot{V}_G , breathing frequency – f_R , and ventilatory requirement - $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$) were measured in the tambaqui, *Colossoma macropomum*, under normoxia and after 40 min of exposure to severe hypoxia (20 mmHg) and the 3 subsequent hours of recovery. Each fish was subjected to this protocol before (Control group), after atropine administration (A group) and after vagotomy (V group). Under hypoxia the fish of control group displayed the characteristic hypoxic bradycardia (reduction of 56% in f_H) with hyperventilation (increases of 96% in f_R and 650% in \dot{V}_G). This hyperventilation was probably responsible by the decrease in EO_2 (65%) and, consequently, in the $\dot{V}O_2$ (62%), resulting in an increase of 1800% in the $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$. The beginning of the recovery period was characterized by an elevated $\dot{V}O_2$ (~200% above the normoxic values) accompanied by tachycardia (50.6 bpm) and gradual recovery of EO_2 , f_R , V_T and \dot{V}_G . Atropine and vagotomy elevated the f_H in normoxia (from 32.0 ± 1.7 to 77.8 ± 4.1 and 80.6 ± 5.8 bpm), indicating a high basal vagal tone. In these two groups the f_H remained constant during the experimental time course. This evidenced that the post-hypoxia tachycardia probably occurred as a consequence of a reduction in the cholinergic tonus. The groups control, atropinized and vagotomized did not show significant differences in EO_2 , $\dot{V}O_2$ and the other respiratory variables analyzed in any protocol. This results point out that hypoxic bradycardia does not improve the O₂ transference to the gills, independently of the method employed to abolish the bradycardic reflex. Therefore, other hypotheses on the hypoxic bradycardia must be investigated in this species.

Key words: Tambaqui; Hypoxia; Hypoxic Bradycardia; Vagotomy; Atropine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Esquema representativo do reflexo bradicárdico. À esquerda são apresentadas as etapas da aferência do reflexo: o estímulo (queda na $P_{\text{insp}}\text{O}_2$); a ativação dos quimiorreceptores de O_2 , com localização principalmente branquial, e a aferência do reflexo no Sistema Nervoso Central (SNC) por meio dos nervos branquiais. À direita são apresentadas a eferência do reflexo por meio do ramo cardíaco do nervo Vago; a liberação de Acetilcolina (Ach) pelas terminações do vago no coração e a queda na frequência cardíaca (f_H) ativada pela ligação da Ach nos receptores muscarínicos desencadeando a hiperpolarização das células marca-passo.....17
- Figura 2 -** Representação de um exemplar de *Colossoma macropomum*. Fonte: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/pesca_esportiva_em_agua_doce/tamb_aqui_colossoma_macropomum.html.....19
- Figura 3 -** Representação esquemática dos nervos cranianos do tambaqui, *Colossoma macropomum*. (A) Localização dos nervos em relação à anatomia externa do peixe. (B) Ampliação evidenciando a origem dos nervos cranianos. (C) inervação dos quatro arcos branquiais e posição do ramo cardíaco do X nervo –Vago (Modificado de Milsom 2002).....20
- Figura 4 -** Foto do tambaqui, *C. macropomum*, instrumentado. Detalhe para cânulas de polietileno opercular, bucal e intraperitoneal e eletrodo de ECG esquerdo.....24
- Figura 5 -** Foto do tambaqui, *C. macropomum*, após instrumentação. Detalhe para a posição dos eletrodos de ECG e cânulas operculares.25
- Figura 6 -** Foto dos nervos branquiais (Glossofaríngeo - IX e os ramos do Vago - X) e o ramo cardíaco do X seccionado do tambaqui, *C. macropomum*, dissecados em autópsia *pós mortem*.....26
- Figura 7 -** Registro do eletrocardiograma (ECG) de tambaqui, *C. macropomum*, em normóxia.....27
- Figura 8 -** Esquema representativo do respirômetro de fluxo constante. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro (Adaptado de Olle 2007).....28

- Figura 9 -** Sistema de respirometria de fluxo constante e respostas cardíacas. a. respirômetro; b, c. cânulas de polietileno para tomada da água que entra (P_eO_2) e que sai do respirômetro (P_sO_2); d, e. cânulas para tomada da água inspirada ($P_{insp}O_2$) e da água expirada ($P_{exp}O_2$); f. eletrodos de ECG; g. torneiras de três vias; h. transdutor de pressão; i. eletrodos de O_2 ; j. analisadores de O_2 ; k. sistema de aquisição de dados com amplificador de pressão; l. computador com softwares de análise de dados; m. frasco de ajuste de água através de respirômetro; n. bomba para circulação de água; o. balde; p. termostato; q. entrada de quantidades controladas de N_2 (adaptado de Massari 1993).....**29**
- Figura 10 -** Esquema representativo do protocolo de hipóxia. A linha pontilhada vermelha indica a P_eO_2 e o tempo em que o peixe foi exposto a cada P_eO_2 . A região cinza representa o tempo de exposição à hipóxia (20 mmHg) e os círculos azuis mostram o momento em que foram mensuradas as variáveis cardiorrespiratórias.....**30**
- Figura 11 -** Frequência cardíaca (f_H - bpm) dos animais que receberam atropina nas doses de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Linha preta), $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Linha azul) e $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Linha vermelha), 1 h após a administração, em normóxia (Nor), hipóxia (Hip) e subsequente período de recuperação (Rec).....**33**
- Figura 12 -** Frequência cardíaca (f_H - bpm) dos animais atropinizados com $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Linha azul) e $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Linha vermelha), antes e após injeção de cianeto (2 mg.kg^{-1}) intrabucal. A linha tracejada indica o momento da injeção.....**34**
- Figura 13 -** Frequência cardíaca (f_H - bpm) de tambaqui, *C. macropomum*, às injeções intrabuciais de água e NaCN antes (A) e após (B) a vagotomia. A linha tracejada indica o momento das injeções. (*) indicam diferença significativa em relação aos valores de f_H pré-injeção. Os pontos são médias \pm E.P.M.; N = 9, ($P \leq 0,05$).....**35**
- Figura 14 -** Frequência cardíaca (f_H - bpm) de tambaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (Linha Azul), Atropina (Linha Vermelha) e Vagotomizados (Linha Verde) ao longo do tempo. (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia e símbolos abertos indicam diferença com os grupos Atropina e Vagotomizados na mesma PO_2 . Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**39**
- Figura 15 -** Taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ - $\text{mLO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de tambaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (colunas pretas), Atropina (colunas brancas) e Vagotomizado (colunas cinza) em cada tempo experimental. (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia ($P \leq 0,05$). Valores apresentados como média \pm E.P.M.....**46**

- Figura 16 -** Extração de oxigênio da corrente ventilatória (EO_2 - %) de tambaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (colunas pretas), Atropina (colunas brancas) e Vagotomizado (colunas cinza) em cada tempo experimental. (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia ($P \leq 0,05$). Valores apresentados como média \pm E.P.M.....**47**
- Figura 17 -** Ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹), frequência respiratória (f_R - ciclo.min⁻¹), volume ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo⁻¹) e necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ - mLH₂O.mLO₂⁻¹) de tambaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (colunas pretas), Atropina (colunas brancas) e Vagotomizado (colunas cinza) em cada tempo experimental. (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia ($P \leq 0,05$). Valores apresentados como média \pm E.P.M.....**50**
- Figura 18 -** Esquema representativo do coração de um teleósteo. Detalhe para o Miocárdio Compacto e Esponjoso (Adaptado de Farrell e Jones 1992).....**54**
- Figura 19 -** Ilustração esquemática das principais características que distinguem os quatro tipos de ventrículo de peixes. O Tipo I apresenta apenas a camada esponjosa sem capilares sanguíneos no músculo cardíaco. O Tipo II é caracterizado por duas camadas (esponjosa e compacta) com circulação coronária apenas na camada compacta. O Tipo III é semelhante ao II, mas apresenta coronárias nas duas camadas. O Tipo IV apresenta uma espessa camada compacta com mais capilares coronários. A circulação coronária, independente do tipo, é derivada da circulação cranial e da circulação peitoral em algumas espécies (Adaptado de Davie e Farrell 1991).....**55**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Frequência cardíaca (f_H - bpm) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Valores em negrito indicam diferença significativa com o controle na mesma PO_2 e asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**39**
- Tabela 2** - Frequência cardíaca (f_H - bpm), Taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ -mLO₂.kg⁻¹.h⁻¹) e Extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %) dos grupos Controle, Salina, falso-operados, Atropina e Vagotomizado em normóxia e hipóxia. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação à normóxia e asteriscos indicam diferença com o controle na mesma PO_2 . Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**42**
- Tabela 3** - Taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ - mLO₂.kg⁻¹.h⁻¹) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**45**
- Tabela 4** - Extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂- %) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**46**
- Tabela 5** - Ventilação Branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**47**
- Tabela 6** - Frequência Respiratória (f_R - ciclos por minuto, cpm) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**48**
- Tabela 7** - Volume Ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo⁻¹) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**48**
- Tabela 8** - Necessidade Ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ -mLH₂O.mLO₂⁻¹) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).....**49**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Adaptações à hipóxia em peixes	13
1.2 Bradicardia hipóxica	15
1.3 O tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 Específico	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Procedimentos Cirúrgicos	22
3.2.1 Instrumentação	22
3.2.2 Vagotomia Cardíaca	24
3.3 Medidas dos Parâmetros Cardiorrespiratórios	25
3.3.1 Frequência Cardíaca - f_H	25
3.3.2 Respostas Respiratórias	26
3.4 Protocolos Experimentais	28
3.4.1 Respostas à hipóxia e recuperação subsequente (protocolo de hipóxia)	28
3.4.2 Efeitos da Atropina e Vagotomia	29
3.4.3 Confirmações pré e pós-Vagotomia	30
3.4.4 Adequação da dose de atropina	31
3.4.5 Análises Estatísticas	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Determinação da dose de atropina	33
4.2 Eficácia do método	34
4.3 Frequência Cardíaca	36
4.4 Relações da frequência cardíaca com a captação e consumo de O_2	40
4.5 Respostas respiratórias ao protocolo de hipóxia	43
4.6 Alternativas para a função da bradicardia hipóxica	51
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A – Representações gráficas das respostas cardiorrespiratórias dos peixes do grupo 2 à hipóxia e recuperação subsequente.	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Adaptações à hipóxia em peixes

As adaptações fisiológicas dos peixes influenciam o sucesso destes animais em colonizar o ambiente aquático (Fry 1971). A água possui 30 vezes menos oxigênio (O_2) dissolvido que o ar (Schmidt-Nielsen 2002). Isto, somado à elevada densidade e viscosidade da água, resulta em um alto custo energético da respiração aquática quando comparada à respiração aérea (Fritsche e Nilsson 1993). Nos peixes, contudo, a tomada de O_2 é otimizada pelo sistema de fluxo contracorrente, em que o fluxo contínuo de água pela superfície branquial de troca gasosa flui no sentido contrário ao do sangue no interior das lamelas (Randall et al. 1997). Este sistema permite a manutenção da diferença de pressão parcial de O_2 (PO_2) entre a água e o sangue por toda superfície branquial de trocas gasosas (Reid et al. 2006), o que aumenta a eficiência de extração de O_2 (EO_2) que pode chegar a 80% ou mais (Lomholt e Johansen 1979).

Muitos sistemas aquáticos apresentam ainda, ambientes frequentemente hipóxicos. Contudo, muitas espécies de peixes possuem adaptações que permitem a sobrevivência nestes ambientes (Richards et al. 2009). Isto é claramente observado em ambientes aquáticos tropicais, onde as temperaturas elevadas associadas à decomposição da matéria orgânica criam habitats extremamente hipóxicos, nos quais muitas espécies de peixes são capazes de ocupar (Almeida-Val et al. 1993).

Alguns peixes apresentam órgãos acessórios bem vascularizados utilizados para captação do O_2 diretamente do ar atmosférico e, portanto, não dependem exclusivamente da disponibilidade de O_2 na água (Graham 1997). No entanto, o sucesso ecológico de peixes com respiração exclusivamente aquática que habitam ambientes frequentemente hipóxicos, depende particularmente de suas habilidades em detectar as mudanças na PO_2 da água e utilizar estas informações sensoriais para efetuar ajustes rápidos e apropriados nas atividades cardiorrespiratórias (Fritsche e Nilsson 1993). Estes ajustes permitem a manutenção da tomada e transporte do O_2 até os tecidos onde é utilizado nos processos aeróbicos (Fernandes e Rantin 1989).

Os ajustes cardiorrespiratórios desenvolvidos por peixes em resposta à hipóxia resultam do processamento central de uma ampla variedade de “inputs” sensoriais originados nos diferentes grupos de quimiorreceptores (Milsom 1996). A identificação dos locais de origem das aferências dos quimiorreceptores de O_2 tem sido realizada por meio da secção dos

nervos cranianos e utilizando-se cianeto de sódio (NaCN). O NaCN é um sal que bloqueia a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias estimulando os quimiorreceptores de O_2 (Burlison et al. 1992) e desencadeando a bradicardia reflexa. Deste modo, foram obtidas evidências diretas de que os peixes detectam as PO_2 da água e do sangue por meio de receptores sensíveis ao O_2 localizados tanto interna (monitorando a PO_2 do sangue) quanto externamente (monitorando a PO_2 da água inspirada) nas brânquias e também em tecidos extrabranquiais (Laurent e Rouzeau 1972; Milsom e Brill 1986; Burlison e Milsom 1993; Sundin et al. 2000; Florindo et al. 2006). Portanto, quando estão em um ambiente hipóxico, “inputs” sensoriais originados dos quimiorreceptores de O_2 desencadeiam uma série de respostas reflexas que são dirigidas pela localização dos receptores estimulados e pela intensidade do estímulo.

A primeira resposta dos peixes à hipóxia é o aumento da ventilação branquial (\dot{V}_G) com elevações na frequência respiratória (f_R) e/ou no volume ventilatório total (V_T). Este ajuste gera um maior fluxo de água pelas brânquias, aumentando a disponibilidade de O_2 na superfície funcional respiratória (Smith e Jones 1978; Lomholt e Johansen 1979; Randall 1982). Por meio destas respostas ventilatórias muitas espécies de peixes conseguem manter o consumo de O_2 (VO_2) estável enquanto a PO_2 do meio é reduzida, sendo consideradas, assim, espécies oxirreguladoras (Hughes 1973). Estes animais mantêm o metabolismo constante até determinada tensão de O_2 , chamada de tensão crítica de O_2 ($P_{crit}O_2$), quando os ajustes respiratórios não são mais eficientes para manter o metabolismo aeróbico. E, assim, o peixe torna-se dependente da quantidade de O_2 dissolvido na água (Fernandes e Rantin 1987).

Outra resposta importante dos peixes à hipóxia, observada na maioria das espécies já estudadas, é uma considerável diminuição da frequência cardíaca (f_H), a chamada bradicardia hipóxica reflexa (Butler e Taylor 1971; Randall 1982; Taylor 1992). Segundo Satchell, a bradicardia hipóxica, associada ao aumento da \dot{V}_G , proporciona um adequado acoplamento cardiorrespiratório, em que a f_H tende a ocorrer em uma fase particular do ciclo respiratório. Este mecanismo pode, portanto, sincronizar o pulso do fluxo da água e o pulso do fluxo do sangue pelas brânquias (Satchell 1991), favorecendo potencialmente a EO_2 .

Segundo Satchell (1991), além do aumento na \dot{V}_G , da bradicardia e do adequado acoplamento cardiorrespiratório, a hipóxia também ativa de forma reflexa a constrição de vasos periféricos. Este ajuste aumenta a resistência sistêmica, favorecendo o retorno venoso ao coração. Deste modo, quando expostos à hipóxia, os peixes elevam a pressão sanguínea arterial que, associada ao maior tempo para enchimento do ventrículo, resulta em maiores

volumes sistólicos fazendo com que o sangue seja ejetado do coração com uma força maior a cada sístole (Randall 1982).

Outro ajuste fisiológico à hipóxia verificado em peixes, que possivelmente melhora a transferência de gases pelas brânquias, é o recrutamento de lamelas e espaços intralamelares não perfundidos em normóxia (Farrell et al. 1980; Sundin 1995). O aumento da superfície branquial funcional em hipóxia ocorre por mecanismos vasoativos de controle do fluxo sanguíneo branquial como, por exemplo, a constrição de esfíncteres nas arteríolas filamentosas eferentes (Sundin et al. 1995). Quando expostos a tempos mais prolongados de hipóxia os peixes apresentam ainda, alterações na expressão gênica que facilitam a reorganização dos processos fisiológicos de captação e distribuição de O_2 e dos processos bioquímicos do metabolismo energético celular. Estas adaptações incluem a remodelação branquial, aumento do hematócrito, ativação do metabolismo anaeróbico e supressão do consumo energético (Richards et al. 2009).

1.2 Bradicardia hipóxica

O coração dos teleósteos, assim como da maioria dos vertebrados, está sobre duplo controle autônômico a partir de fibras excitatórias adrenérgicas e inibitórias colinérgicas. As fibras adrenérgicas são distribuídas por todo o tecido cardíaco enquanto as fibras colinérgicas que chegam ao coração pelo ramo cardíaco do nervo Vago inervam, principalmente, o seio venoso e átrio onde se acredita que estão localizadas as células marca-passo. Catecolaminas que chegam ao coração também pela circulação (liberadas pelo tecido cromafim) se ligam à β -adrenorreceptores exercendo efeitos inotrópico e cronotrópico positivos no coração. Nas terminações vagais é liberada acetilcolina (Ach) que interage com receptores muscarínicos das células marca-passo, induzindo a hiperpolarização destas células e consequentemente, reduzindo a f_H . Portanto, a f_H de teleósteos, assim como a de mamíferos, está sob influência dos tónus autônômicos adrenérgico e colinérgico (Nilsson et al. 1983).

O reflexo bradicárdico nos peixes envolve a estimulação dos quimiorreceptores de O_2 com localização principalmente branquial, e transmissão da informação sensorial pelos nervos branquiais até o sistema nervoso central (SNC). Centros de integração bulbares processam esta informação e enviam sinais eferentes via ramo cardíaco do Vago induzindo um aumento no tónus colinérgico inibitório (Figura 1) (Taylor 1992; Gilmour e Perry 2007). Portanto, tanto a vagotomia (secção dos ramos cardíacos do vago) quanto a atropina (At - antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) inibem a bradicardia hipóxica (Taylor 1992).

Em teleósteos de águas temperadas a bradicardia hipóxica parece ser iniciada pela estimulação de receptores orientados externamente (Saunders e Sutterlin 1971; Smith e Jones 1978; Smatresk et al. 1986; Burtleson e Smatresk 1990; McKenzie et al. 1991; Burtleson e Milsom 1993), enquanto que em algumas espécies neotropicais tolerantes à hipóxia, como no tambaqui (Sundin et al. 2000; Florindo et al. 2006) e no pacu (Leite et al. 2007), esta bradicardia reflexa parece ser induzida pela estimulação de receptores orientados tanto externa quanto internamente. Estes resultados sugerem que espécies tolerantes à hipóxia são capazes de responder tanto à hipóxia quanto à hipoxemia, enquanto espécies menos tolerantes à hipóxia respondem diretamente a baixas concentrações de O_2 na água.

Apesar de a bradicardia hipóxia estar presente em muitas espécies de teleósteos, como descrito anteriormente, e até em elasmobrânquios como o “dogfish”, *Scyliorhinus canícula* (Barret e Taylor 1984), os potenciais benefícios deste ajuste permanecem incertos.

Acredita-se que, durante a hipóxia, a bradicardia concomitante ao aumento da \dot{V}_G melhore a transferência de O_2 da água para o sangue pelas brânquias. Segundo Satchell (1961) isto poderia ocorrer devido à maior permanência do sangue nas lamelas secundárias entre cada batida do coração, aumentando o tempo para difusão do O_2 . Além disto, o aumento da superfície branquial funcional durante a hipóxia (Sundin 1995) também é visto como uma resposta associada à bradicardia que possivelmente aumenta a captação de O_2 pelas brânquias. O recrutamento de lamelas e espaços intralamelares não perfundidos em normóxia, além de regulados por mecanismos vasoativos branquiais (Sundin 1995), podem ser induzidos pela elevação na pressão de bombeamento sanguíneo. Isto pode ocorrer devido ao aumento do volume sistólico associado à bradicardia (Randall 1982) e/ou à elevação da pressão sanguínea na aorta ventral consequente da maior resistência sistêmica (Reid et al. 2006).

Contudo, apesar dos vários estudos que investigaram as possíveis vantagens da bradicardia hipóxica em peixes (Short et al. 1979; Taylor e Barrett 1985; Perry e Desforges 2006; McKenzie et al. 2009; Iversen et al. 2010a), a hipótese de que esta queda na f_H em resposta à hipóxia melhore a transferência de O_2 pelas brânquias ainda não foi comprovada. Na truta, *Oncorhynchus mykiss*, a administração de At aumentou a pressão na aorta ventral tanto em normóxia quanto em hipóxia, o que pode ter aumentado a perfusão sanguínea branquial alterando a área de superfície respiratória e, conseqüentemente, a EO_2 (Perry e Desforges 2006). Este estudo mostra que a utilização da At para inibir a bradicardia hipóxica pode influenciar indiretamente a transferência de O_2 nas brânquias. Divergências de resultados, possivelmente creditados a diferentes métodos de abolição da bradicardia, foram

encontradas no “dogfish”. Enquanto Taylor e Barrett (1985), utilizando a At, verificaram que a bradicardia aumentou a eficiência de troca de gases pelas brânquias nesta espécie, Short et al. (1979) mostraram que a EO_2 pelas brânquias durante a hipóxia não diferiu entre animais intactos e vagotomizados.

A vagotomia bloqueia a bradicardia hipóxica por inibir a liberação de Ach pelas terminações dos ramos cardíacos do vago, enquanto que a At interage com os receptores muscarínicos cardíacos impedindo que a Ach liberada pelo vago estimule estes receptores, desencadeando a bradicardia. A At, no entanto, por ser um antagonista muscarínico não seletivo, pode interagir com receptores muscarínicos de outros tecidos e não apenas com os receptores cardíacos. Esta ação extra cardíaca da At pode induzir alterações cardiovasculares que interfiram indiretamente na EO_2 , como a hipertensão observada na truta (Perry e Desforges 2006). Apesar do pouco conhecimento sobre a presença de receptores muscarínicos fora do coração, na truta, a vasoconstrição na artéria branquial eferente estimulada pela Ach foi bloqueada pela administração de At (Sundin e Nilsson 1997).

Portanto, existe a necessidade de se comparar a influência dos métodos de abolição da bradicardia (At e vagotomia) na transferência de O_2 pelas brânquias e nas respostas ventilatórias durante a hipóxia. Além disso, pouca atenção tem sido dada aos efeitos da abolição da bradicardia na fisiologia cardíaca e respiratória de peixes após o retorno à normóxia, na fase de recuperação pós-hipóxica.

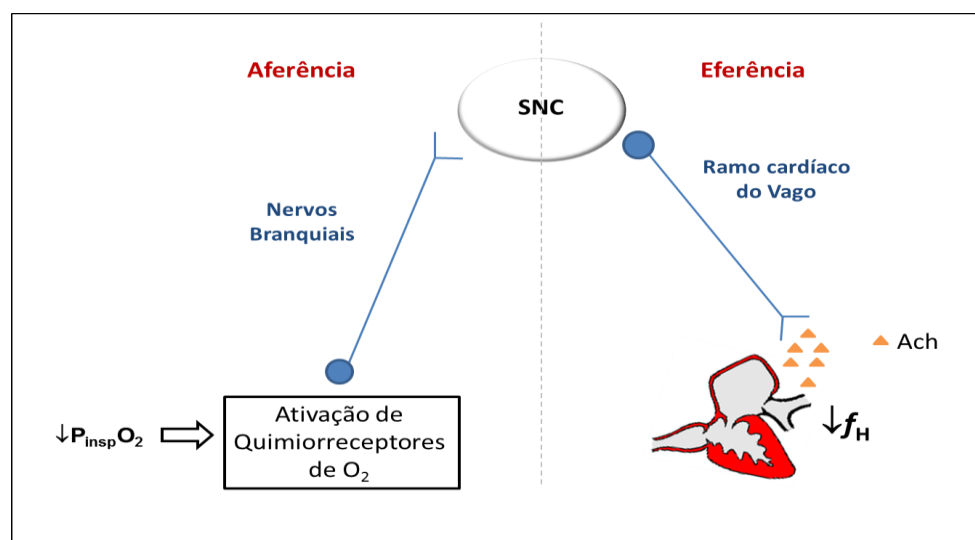


Figura 1. Esquema representativo do reflexo bradicárdico. À esquerda são apresentadas as etapas da aferência do reflexo: o estímulo (queda na $P_{\text{insp}}O_2$); a ativação dos quimiorreceptores de O_2 , com localização principalmente branquial, e a aferência do reflexo no Sistema Nervoso Central (SNC) por meio dos nervos branquiais. À direita são apresentadas a eferência do reflexo por meio do ramo cardíaco do nervo Vago; a liberação de Acetilcolina pelas terminações do vago no coração e a queda na frequência cardíaca (f_H) ativada pela ligação da Ach nos receptores muscarínicos desencadeando a hiperpolarização das células marca-passo.

1.3 O tambaqui, *Colossoma macropomum*

Os poucos trabalhos que investigaram o papel da bradicardia hipóxica na EO_2 pelas brânquias, utilizaram como modelo experimental o “dogfish” (Short et al. 1979; Taylor e Barrett 1985), a truta (Perry e Desforges 2006), o bacalhau-do-atlântico, *Gadus morhua* (McKenzie et al. 2009) e a enguia europeia, *Anguilla anguilla* (Iversen et al. 2010a). Estas espécies vivem em um ambiente estável (marinho) e, portanto, não são expostas com frequência a baixos níveis de O_2 . O tambaqui (Figura 2), ao contrário, é um teleósteo tolerante à hipóxia que habita a bacia amazônica, sendo encontrado em lagos de planícies aluviais que estão muitas vezes hipóxicos (Saint-Paul 1988). Nestes lagos tropicais as concentrações de O_2 mudam periodicamente com as flutuações sazonais nos níveis de água e diariamente com os ciclos de respiração e fotossíntese das plantas, sendo verificados, inclusive, longos períodos de hipóxia (Kramer et al. 1978).

O tambaqui emprega uma variedade de mecanismos comportamentais, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos para adaptar-se às amplas flutuações na concentração de O_2 de seu habitat (Val e Almeida-Val 1995; Rantin e Kalinin 1996), apresentando, inclusive, resistência à hipóxia prolongada (Rantin e Kalinin 1996; Affonso et al. 2002; Florindo et al. 2006). Nesta espécie foram verificadas migrações diárias e sazonais induzidas pela disponibilidade de O_2 (Saint-Paul e Soares 1987) e, quando não conseguem escapar destes ambientes hipóxicos, para atenuar seus efeitos nocivos eles realizam a respiração na superfície aquática (ASR). Este comportamento é facilitado pelo desenvolvimento dérmico do lábio inferior que aumenta a captação da água bem aerada da superfície (Saint-Paul 1988). Além destas adaptações, também foram verificados aumentos na concentração de hemoglobina e eritrócitos em tambaquis expostos à hipóxia por períodos prolongados (Saint-Paul 1984; Affonso et al. 2002) melhorando potencialmente o transporte de O_2 para os tecidos.

Como respostas reflexas à hipóxia, o tambaqui apresenta aumentos significativos na f_R acompanhados de uma pronunciada bradicardia (Corrêa 1996; Rantin e Kalinin 1996; Sundin et al. 2000; Milsom et al. 2002; Florindo et al. 2006). Nesta espécie, injeções de NaCN (internas, na aorta ventral, e externas, na cavidade bucal), possibilitaram verificar que a bradicardia hipóxica é ativada pela estimulação de quimiorreceptores de O_2 tanto branquiais (localizados interna e externamente) quanto extrabranquiais (Sundin et al. 2000). A localização dos nervos cranianos também já foi descrita no tambaqui (Milsom et al. 2002). Eles são apresentados na Figura 3 com destaque para a posição dos ramos branquiais e cardíaco do Vago.

Quando submetido à hipóxia gradual, o tambaqui apresentou aumentos significativos na \dot{V}_G a partir da PO_2 de 37 mmHg e manteve a $\dot{V}O_2$ constante até a PO_2 de 24 mmHg ($P_{crit}O_2$), abaixo da qual o metabolismo respiratório decresceu linearmente (Corrêa 1996). Neste trabalho Corrêa (1996) também observou uma bradicardia significativa apenas em tensões de O_2 abaixo de 19 mmHg atingindo valores mínimos de f_H (queda de 45%) na PO_2 de 6 mmHg. Já a exposição de tambaquis à tensão de 10 mmHg de forma aguda induziu aumentos de 2x na f_R acompanhados de queda de ~55% na f_H (Sundin et al. 2000) – valor semelhante ao encontrado por Corrêa (1996) nas tensões mais severas da hipóxia gradual.

Apesar das respostas à hipóxia estarem bem descritas no tambaqui, a relação entre bradicardia e EO_2 ainda não foi verificada nesta espécie. Por ser um animal de água doce com alta tolerância à hipóxia, a comparação entre as respostas de tambaquis submetidos à hipóxia severa e recuperação subsequente, vagotomizados e atropinizados se tornam uma excelente alternativa para elucidar as possíveis vantagens da bradicardia hipóxica no aporte de O_2 pelas brânquias.

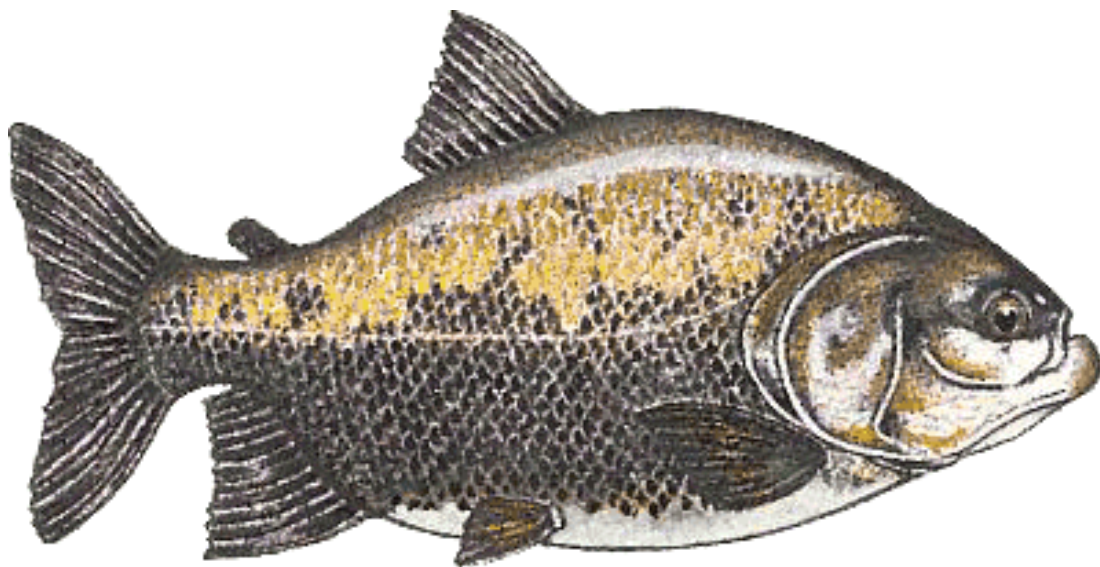


Figura 2. Representação de um exemplar de *Colossoma macropomum*.

Fonte: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/pesca_esportiva_em_agua_doce/tambaqui_colossoma_macropomum.html.

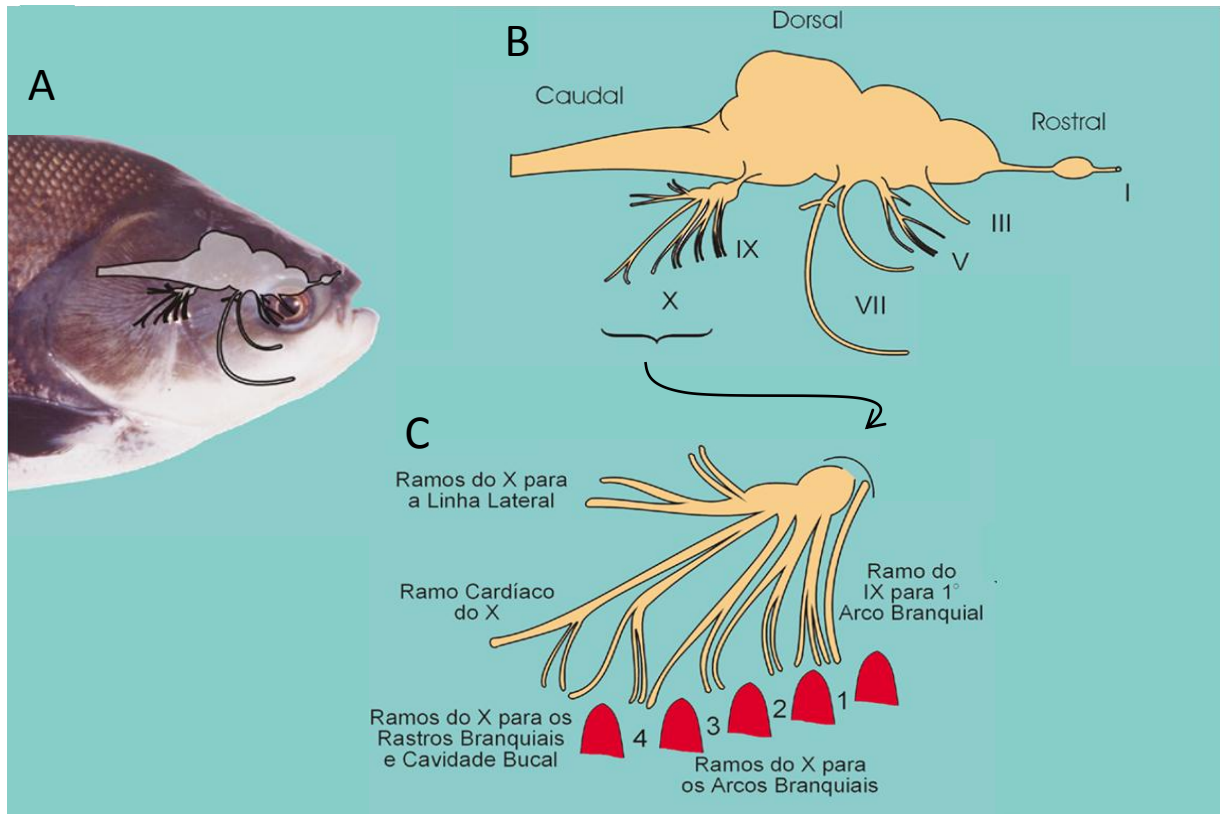


Figura 2. Representação esquemática dos nervos cranianos do tambaqui, *Colossoma macropomum*. (A) Localização dos nervos em relação à anatomia externa do peixe. (B) Ampliação evidenciando a origem dos nervos cranianos. (C) Inervação dos quatro arcos branquiais e posição do ramo cardíaco do X nervo –Vago (Modificado de Milsom et al. 2002).



2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar se a bradicardia hipóxica melhora a extração e consumo de O₂ de *C. macropomum*.

2.2 Específico

- Comparar a influência de cada método de abolição da bradicardia (atropinização *versus* vagotomia) sobre as respostas cardiorrespiratórias de *C. macropomum* à hipóxia severa e subsequente período de recuperação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 15 espécimes jovens de tambaqui, *C. macropomum* ($178,26 \pm 6,27$ g, E.P.M.), obtidos na estação de piscicultura do município de Cosmorama, SP, Brasil. Os peixes foram mantidos em tanques de 500 L no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, com aeração constante ($PO_2 \sim 140$ mmHg) e recirculação de água de clorada, a 25 ± 1 °C. Os animais receberam ração comercial *ad libitum* uma vez por dia. Antes de cada experimento foram privados de alimento por 48 h para evitar a eliminação de excretas na câmara experimental e evitar possíveis alterações metabólicas devido à digestão, durante o experimento. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFSCar (Parecer N° 020/2011).

Os peixes foram separados em dois grupos: grupo 1- Bloqueados ($n = 9$, $Wt = 183,22 \pm 6,22$ g) e grupo 2- Controles ($n = 6$, $Wt = 170,83 \pm 12,8$ g). Os animais do grupo 1 tiveram o tônus colinérgico cardíaco inibido por dois métodos em momentos distintos. Primeiro, por meio da administração do antagonista dos receptores muscarínicos (sulfato de atropina, SIGMA) e, em um segundo momento, por meio da secção do ramo cardíaco do nervo Vago. Como controle, os animais do grupo 2 foram expostos aos mesmos protocolos experimentais, mas receberam injeções de salina (veículo da At) e tiveram o ramo cardíaco do Vago apenas exposto, mas não seccionado.

3.2 Procedimentos Cirúrgicos

3.2.1 Instrumentação

Antes dos experimentos, os animais de ambos os grupos foram submetidos à implantação de dois eletrodos de eletrocardiograma (ECG) de aço inoxidável e cânulas de polietileno na cavidade bucal, nas bordas dos opérculos e na cavidade intraperitoneal (Figura 4). Para isto, eles foram primeiramente anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína ($0,1$ g.L⁻¹) até diminuírem os movimentos operculares, e em seguida, transferidos para uma mesa cirúrgica onde tiveram as brânquias continuamente irrigadas por uma segunda solução aerada de benzocaína ($0,05$ g.L⁻¹). Este procedimento teve duração aproximada de 20 min.

Inicialmente, o par de eletrodos de ECG foi implantado em ambos os lados do coração (como descrito por McKenzie et al. 2009). Eles foram posicionados entre a base das nadadeiras peitorais e o coração com 2 cm de distância entre eles e fixados com duas suturas cirúrgicas laterais (Figura 5). Estes dois eletrodos, mais um terceiro colocado na água da câmara experimental, foram utilizados para obtenção dos registros eletrocardiográficos, a partir dos quais foram determinados os valores da f_H .

Em seguida, uma cânula de polietileno foi inserida dentro da câmara bucal (PE 90) por meio de um orifício aberto no palato entre as narinas. Outras duas cânulas (PE 70) foram inseridas nas câmaras operculares, por meio de perfurações na região mais distal de ambos os opérculos (Figura 5). Os orifícios foram abertos com uma micro-retífica e uma broca. As cânulas foram fixas com uma flange (trava) e cola de secagem rápida (Super Bonder[®]). As cânulas operculares foram utilizadas para obter amostras de água que já passaram pelas brânquias e mensurar a PO_2 da água expirada ($P_{exp}O_2$). A cânula bucal foi conectada a um sistema de torneiras de três vias, permitindo mensurar a PO_2 da água inspirada ($P_{insp}O_2$), monitorar as alterações na pressão intrabucal (P_{IB}) e realizar injeções de NaCN.

Finalmente, para administração da At nos animais do grupo 1, e de salina (0,9 % NaCl) nos animais do grupo 2, outra cânula de polietileno (PE 50) preenchida com solução salina, foi implantada na cavidade intraperitoneal segundo metodologia descrita por Black (2000). Esta cânula foi fixada por meio de sutura única (Figura 4).

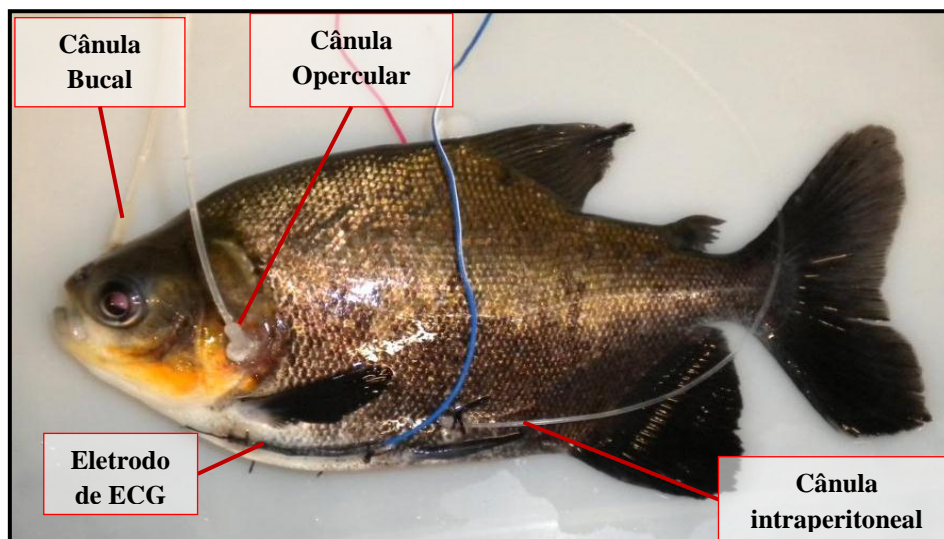


Figura 4. Foto do tambaqui, *C. macropomum*, instrumentado. Detalhe para cânulas de polietileno opercular, bucal e intraperitoneal e eletrodo de ECG esquerdo.

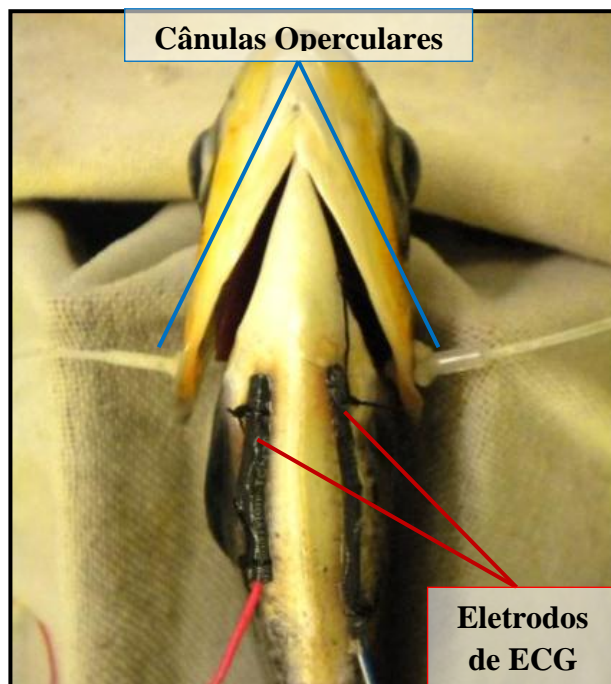


Figura 5. Foto do tambaqui, *C. macropomum*, após instrumentação. Detalhe para a posição dos eletrodos de ECG e cânulas operculares

3.2.2 Vagotomia Cardíaca

Os animais do grupo 1 tiveram o ramo cardíaco do nervo vago seccionado como segundo método de inibição da bradicardia hipóxica. Para este procedimento cirúrgico, os animais foram previamente anestesiados e transferidos para a mesa cirúrgica como descrito anteriormente. A desnervação ocorreu segundo o protocolo descrito por Taylor et al. (2009).

Os peixes foram posicionados levemente inclinados na mesa cirúrgica, tiveram o opérculo afastado e as brânquias rebatidas com uma haste de plástico com algodão nas extremidades (Cotonete[®]), expondo o epitélio dorsal do opérculo. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico cirúrgico (Opto SM 2001, Opto Eletrônica, São Carlos, SP), foi realizada uma pequena incisão (< 1 cm) no epitélio dorsal do opérculo, posterior ao quarto arco branquial. Esta incisão permitiu acessar o quarto ramo do vago onde o nervo cardíaco se separa do respiratório. Desta forma, o ramo cardíaco do nervo Vago foi cuidadosamente dissecado, livre de tecido conjuntivo, isolado com um gancho de íris e seccionado com uma tesoura oftalmológica. A secção do ramo cardíaco do Vago foi realizada bilateralmente, com o objetivo de se eliminar o tônus vagal no coração. Este procedimento teve duração de aproximadamente 40 minutos. As desnervações foram confirmadas *post mortem* por dissecação (Figura 6).

Para verificar os efeitos da cirurgia nas respostas estudadas, os animais do grupo 2 tiveram o ramo cardíaco do nervo Vago apenas dissecado e exposto, mas não seccionado

(falsa operação). A vagotomia foi confirmada por injeções intrabucais de NaCN aproximadamente 1 h após a cirurgia.

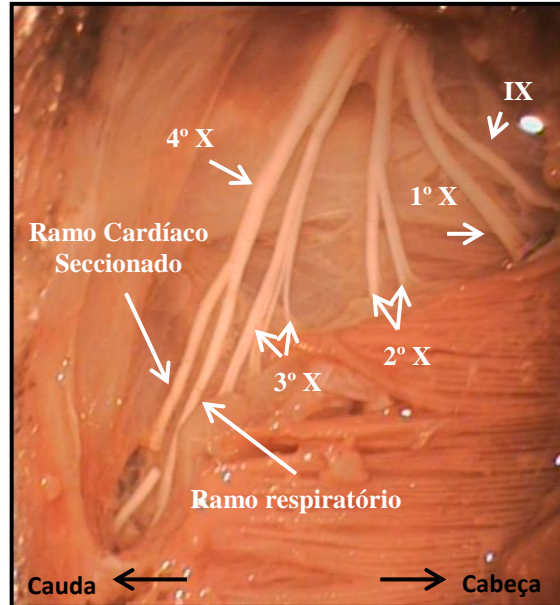


Figura 6. Foto dos nervos branquiais (Glossofaríngeo - IX e os ramos do Vago - X) e o ramo cardíaco do X seccionado do tambaqui, *C. macropomum*, após dissecação em autópsia pós morte.

3.3 Medidas dos Parâmetros Cardiorrespiratórios

Após ambas as cirurgias (instrumentação e vagotomia), os peixes foram introduzidos individualmente no interior de um respirômetro de fluxo constante (Figura 8) e posicionados dentro de uma câmara experimental (48L) (Figura 9). Eles foram mantidos com fluxo contínuo de água aerada (normóxia - 140 mmHg), mantida a 25 ± 1 °C (temperatura experimental), por pelo menos 12 h (“overnight”) para recuperação da anestesia.

3.3.1 Frequência Cardíaca - f_H

Os eletrodos de ECG foram conectados a um amplificador (Animal BioAmp – ADInstruments) de um sistema de aquisição de dados (Power Lab – ADInstruments) ligado a um computador contendo um software (LabChart 7), que permitiu o monitoramento do ECG durante todos os experimentos. Os valores da f_H (batimentos por minuto - bpm) foram obtidos pela contagem do número de complexos QRS por minuto em um intervalo de tempo de 5 min. A Figura 7 apresenta um trecho de ECG de tambaqui em normóxia.

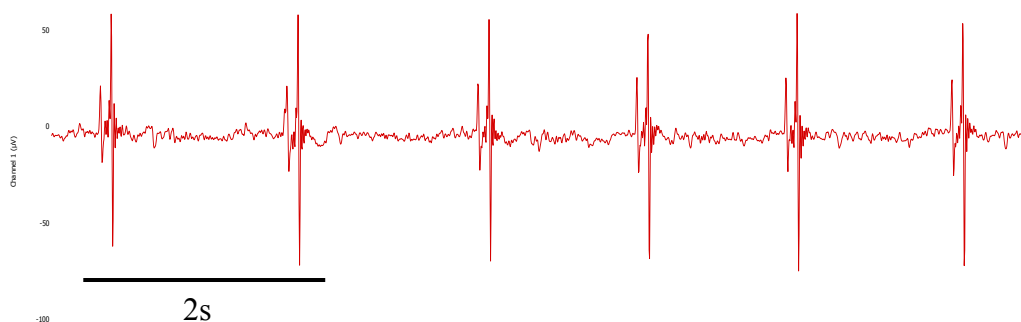


Figura 7. Registro do eletrocardiograma (ECG) de tambaqui, *C. macropomum*, em normóxia.

3.3.2 Respostas Respiratórias

Para verificar os parâmetros respiratórios foi utilizado o sistema de respirometria de fluxo constante (Figura 9) e a instrumentação dos animais segundo a metodologia utilizada por Fernandes e Rantin (1989). Este sistema permitiu mensurar as P_{O_2} da água de entrada (P_eO_2) e de saída (P_sO_2) do respirômetro, além da $P_{insp}O_2$ e da $P_{exp}O_2$. Estes valores foram obtidos por meio de amostras da água de entrada e saída do respirômetro, e das cânulas bucal e operculares. As cânulas foram conectadas a uma torneira de três vias ligada a um eletrodo de O_2 (OxyGuard[®] Mini Probe, Birkerød, Dinamarca) de um analisador de O_2 (desenvolvido no LZBC).

O fluxo de água através do respirômetro (Figura 8) foi ajustado por gravidade utilizando o frasco de ajuste de fluxo (Figura 9). Para estabelecer o fluxo adequado, foi considerado o tamanho do peixe e a manutenção de uma diferença de 15 - 20 % entre a P_eO_2 e a P_sO_2 . A manutenção deste fluxo é importante para evitar que a água do respirômetro fique muito hipóxica durante o experimento e que o peixe nade, alterando a taxa metabólica (Hughes e Saunders 1970). A taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ - $mLO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$) em cada tempo do protocolo experimental foi determinada por meio da equação proposta por Hughes et al. (1983):

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

onde: α = coeficiente de solubilidade do O_2 na temperatura experimental e pressão barométrica local; V_R = fluxo através do respirômetro e Wt = massa do animal.

A cânula intrabucal foi conectada a um transdutor de pressão (ADInstruments MLTO380/D) e este ligado ao mesmo sistema de aquisição de dados descrito anteriormente por um amplificador (Quad Bridge Amp - ADInstruments ML224). O transdutor de pressão foi calibrado antes de cada experimento por meio de uma coluna de água com um calibrador

de pressão (AVS Projetos, São Carlos, SP). Assim como o ECG, os registros da variação da P_{IB} foram gerados continuamente pelo LabChart 7, sendo interrompidos apenas para aferição da $P_{insp}O_2$. Os valores de f_R (ciclos por minuto) foram calculados com uma ferramenta do programa LabChart 7, a partir da seleção de um intervalo de 5 min do registro de P_{IB} , coincidente ao intervalo utilizado na análise da f_H . Para análise da f_R foram considerados os picos de pressão positiva durante o ciclo respiratório.

A ventilação branquial \dot{V}_G ($mLH_2O.kg^{-1}.min^{-1}$) foi calculada segundo a equação proposta por Hughes e Saunders (1970):

$$\dot{V}_G = V_R \cdot [(P_eO_2 - P_sO_2) / (P_{insp}O_2 - P_{exp}O_2)] / W_t$$

A necessidade ventilatória ($\dot{V}_G / \dot{V}O_2$), foi obtida pelo quociente entre a \dot{V}_G e o respectivo valor de $\dot{V}O_2$ e expressa em $mLH_2O.mLO_2^{-1}$. O volume ventilatório (V_T - $mLH_2O.kg^{-1}.resp^{-1}$) foi calculado pelo quociente entre a \dot{V}_G e a respectiva f_R (\dot{V}_G / f_R). A porcentagem de extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %) pelas brânquias foi calculada como:

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

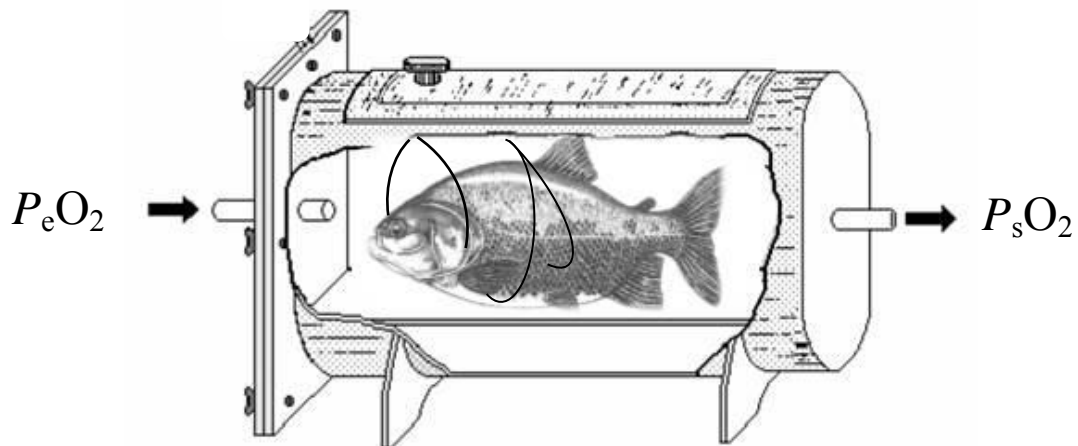


Figura 8. Esquema representativo do respirometro de fluxo constante. As setas indicam a direção do fluxo de água entrando, da qual era verificada a P_eO_2 , e saindo do respirometro, da qual era medida a P_sO_2 (Adaptado de Olle 2007).

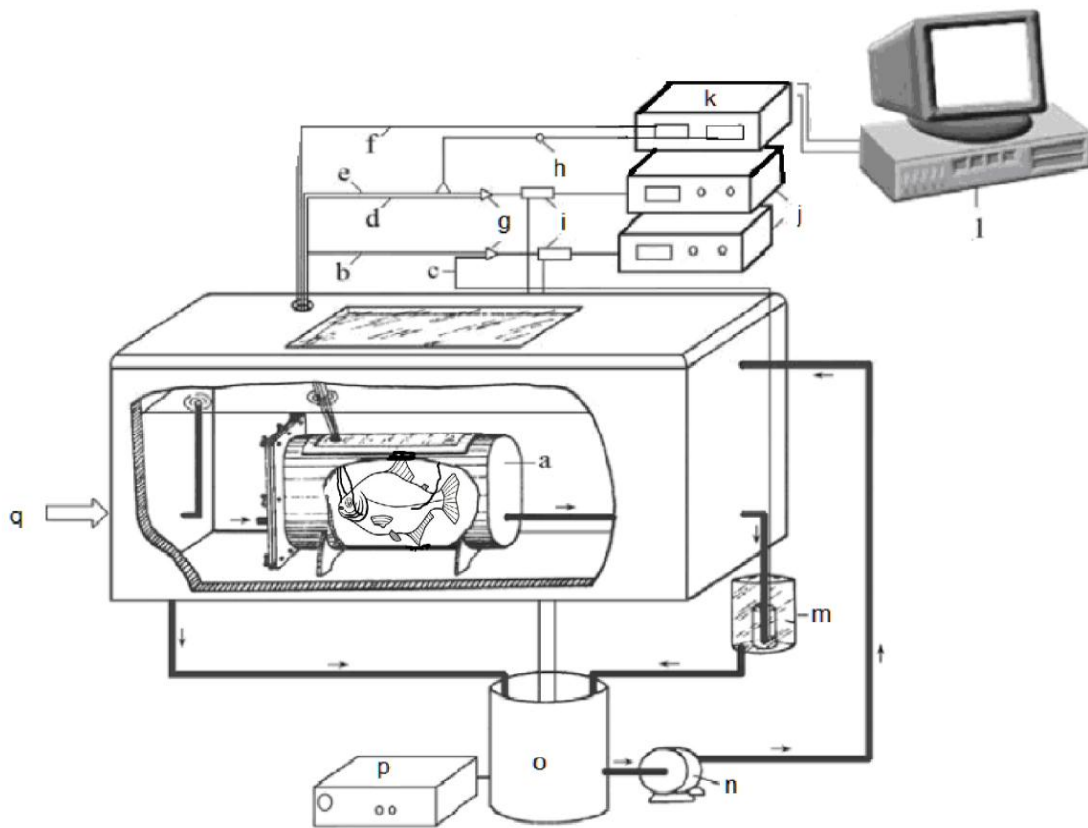


Figura 9. Sistema de respirometria de fluxo constante e respostas cardíacas. a. respirômetro; b,c cânulas de polietileno para tomada da água que entra (P_eO_2) e que sai do respirômetro (P_sO_2); d,e cânulas para tomada da água inspirada ($P_{insp}O_2$) e da água expirada ($P_{exp}O_2$); f. eletrodos de ECG; g. torneiras de três vias; h. transdutor de pressão; i. eletrodos de O_2 ; j. analisadores de O_2 ; k. sistema de aquisição de dados com amplificador de pressão; l. computador com softwares de análise de dados; m. frasco de ajuste de água através de respirômetro; n. bomba para circulação de água; o. balde; p. termostato; q. entrada de quantidades controladas de N_2 (adaptado de Maricondi-Massari 1998).

3.4 Protocolos Experimentais

3.4.1 Respostas à hipóxia e recuperação subsequente (protocolo de hipóxia)

Após o tempo de recuperação da cirurgia, conexão das cânulas e eletrodos, calibração dos equipamentos e ajuste do fluxo (como descrito anteriormente), os peixes foram mantidos em repouso por aproximadamente 1 h. No fim desta fase, eram mensuradas as variáveis cardiorrespiratórias de repouso em normóxia (Grupo Normóxia). Em seguida os animais foram submetidos à hipóxia severa ($P_eO_2 = 20$ mmHg), atingida em ~ 15 min pelo borbulhamento de nitrogênio (N_2) na câmara experimental. Durante a hipóxia a $P_{insp}O_2$ foi de, aproximadamente, 14 mmHg para todos os grupos. Eles foram mantidos nesta P_eO_2 por 40 min e os parâmetros medidos nos últimos 5 min (Grupo Hipóxia). Depois, desligava-se o N_2 e borbulhava-se ar comprimido na câmara experimental até a P_eO_2 atingir 140 mmHg. Os peixes eram então mantidos em normóxia por 3 h (tempo de recuperação) com medidas sendo

realizadas nos 10, 20, 30, 40, 80, 120 e 180 min deste período (Grupos Recuperação 10, 20, 30, 40, 80, 120 e 180, respectivamente). Experimentos prévios permitiram verificar que 3 h seriam suficientes para recuperação de todos os parâmetros analisados. O protocolo de hipóxia teve duração de aproximadamente 5 h (Figura 10). Quando submetido à hipóxia gradual, o tambaqui apresenta quedas significativas na f_H em $P_{\text{insp}}O_2$ próximas a 19 mmHg (Corrêa 1996). Além disso, esta espécie tolera exposição prolongada à P_eO_2 de 10 mmHg (Florindo et al. 2006). Assim, no presente trabalho, foi utilizada como hipóxia uma P_eO_2 severa (20 mmHg), obtida de forma rápida (~15 min), com a intenção de induzir uma resposta cardíaca reflexa (bradicardia) intensa tornando os efeitos da atropinização e da vagotomia mais evidentes.

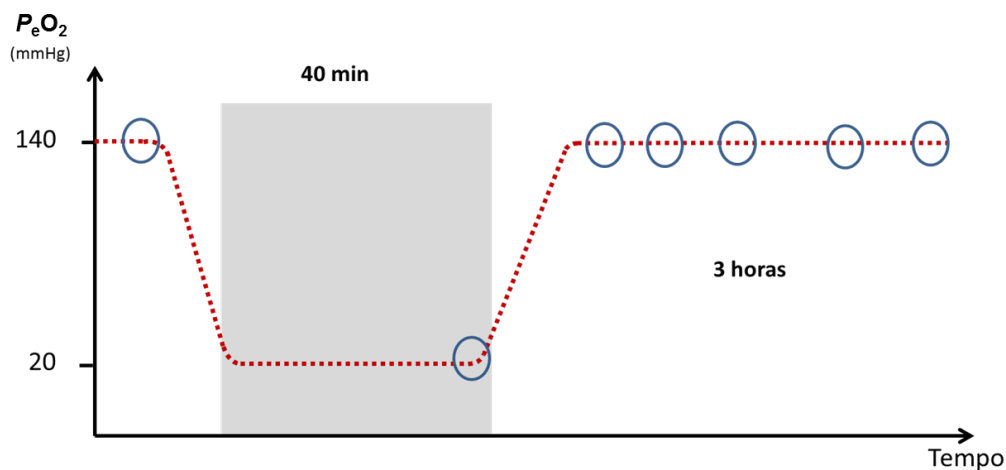


Figura 10. Esquema representativo do protocolo de hipóxia. A linha pontilhada vermelha indica a P_eO_2 e o tempo em que o peixe foi exposto a cada P_eO_2 . A região cinza representa o tempo de exposição à hipóxia ($PO_2 = 20$ mmHg) e os círculos azuis mostram o momento em que foram mensuradas as variáveis cardiorrespiratórias.

3.4.2 Efeitos da Atropina e Vagotomia

Para verificar os efeitos da abolição do tônus colinérgico cardíaco nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia, os peixes do grupo 1-Bloqueados foram submetidos ao protocolo de hipóxia em três momentos distintos. Primeiramente, com os animais intactos, após o período de recuperação da intervenção cirúrgica (grupo Controle). Depois da terceira hora de recuperação do grupo Controle (Ctr), os peixes recebiam uma injeção de At (1,5 mg.kg⁻¹ em 1 mL de solução salina 0,9 %) via cânula intraperitoneal. Após 1 h desta injeção, tempo para total absorção e ação do fármaco, cada peixe era submetido pela segunda vez ao protocolo de hipóxia (grupo Atropina - A). O tempo para ação da At foi verificado em

experimentos anteriores em que foi verificado que após, aproximadamente, 5 min da administração do fármaco a f_H começava a subir e estabilizava após cerca de 15 min. Seguida à injeção de At, a cânula intraperitoneal era “lavada” com 0,3 mL de salina para assegurar a completa administração do fármaco, que teve seu efeito confirmado em cada experimento pela ausência de bradicardia durante o período de hipóxia. Depois destes experimentos os peixes eram mantidos na câmara experimental para recuperação por aproximadamente 24 h.

Após este período, quando a At não estava mais ativa (confirmado por injeções de NaCN), os animais eram vagotomizados, colocados no respirômetro e retornados à câmara experimental onde permaneciam “overnight” para recuperação da anestesia. Em seguida eram submetidos ao protocolo de hipóxia pela terceira vez (grupo Vagotomizado - V), sendo posteriormente eutanasiados, por aprofundamento da anestesia, para dissecação e confirmação da vagotomia cardíaca. Assim, o tempo total de experimentação com cada animal foi de aproximadamente 66 h. O fluxo de água estabelecido para cada animal no primeiro momento (grupo Ctr Normóxia) foi mantido durante todos os protocolos experimentais, por meio de confirmação periódica e permitindo comparar os efeitos dos tratamentos (At e Vagotomia) nas respostas respiratórias.

Como controle os animais do grupo 2-Controles também foram submetidos ao protocolo de hipóxia em três momentos: primeiro apenas instrumentalizados (grupo Ctr2), após a administração de 1,3 mL de salina (mesmo volume injetado no grupo A) e por último, depois de serem falso-operados (grupos Salina e falso-operados). Para verificar os possíveis efeitos do estresse de manipulação e das múltiplas exposições do mesmo animal à hipóxia, foram comparadas as respostas cardiorrespiratórias ao protocolo de hipóxia entre os grupos Ctr2, Salina e falso-operados e entre estes e o grupo Controle 1.

3.4.3 Confirmações pré e pós-Vagotomia

Para comprovar que a At administrada no dia anterior não estava mais ativa, 1 h antes da vagotomia foi injetado (via cânula bucal), em cada peixe do grupo 1, 1,0 mL de solução aquosa de NaCN (2 mg/mL) e monitoradas as f_H . Injeções de NaCN também foram utilizadas para confirmar a correta desnervação do ramo cardíaco do Vago 1 h após a vagotomia. A presença de bradicardia reflexa em resposta ao NaCN antes da vagotomia indicaria que a At não estaria mais ativa e, após a vagotomia, que o nervo seccionado foi o ramo cardíaco do vago.

Injeções de água foram utilizadas como controle antes das injeções de NaCN. O ECG dos animais foi registrado continuamente. A análise da f_H foi feita 30 e 60 s antes de cada injeção, para determinar os valores basais (pré-injeção) deste parâmetro, e em intervalos de 10 em 10 s no primeiro min e de 30 em 30 s nos 2º e 3º min após cada injeção.

3.4.4 Adequação da dose de atropina

Com o objetivo de estabelecer a dose de At adequada ao presente delineamento experimental, foi realizada uma curva de adequação da dose de At. Para isto, foram testadas três doses deste fármaco (1,0; 1,5 e 2,0 mg.kg⁻¹), uma em cada animal, injetadas via cânula intraperitoneal. A eficácia em abolir a bradicardia hipóxica foi verificada submetendo o peixe, 1 h após a administração da At, ao protocolo de hipóxia descrito anteriormente (PO_2 de 20 mmHg por 40 min, seguido de 3 h de recuperação). As doses que apresentaram eficiência em abolir a bradicardia hipóxica, mantendo a f_H elevada durante as três horas de recuperação foi de 1,5 e 2,0 mg.kg⁻¹ (Figura 11).

Para poder comparar os efeitos dos dois métodos de abolição da bradicardia reflexa (atropinização e vagotomia) no mesmo animal, era necessário ainda, que a At não estivesse mais ativa durante os experimentos com o grupo V. Para isto, o efeito da At foi verificado também antes da desnervação (aproximadamente 28 h após a injeção deste fármaco) por comparação da f_H com valores controle (pré-At) e análise da f_H em resposta à injeções de NaCN intrabucais (Figura 12). Assim, foi verificado que, quando administrada na dose de 1,5 mg.kg⁻¹, a At não estava mais ativa antes da desnervação, indicando ser esta a dose adequada ao protocolo experimental proposto.

3.4.5 Análises Estatísticas

A influência do tratamento nas respostas ao protocolo de hipóxia foi analisada por meio de uma série de análises de variância de medidas repetidas com dois fatores (“two-way” ANOVA). O principal fator de repetição foi o tempo (Normóxia, Hipóxia e tempos da Recuperação) e o segundo fator o tratamento (Ctr, At e Vagotomia ou Ctr2, salina e falsa- operação). Estes mesmos dois fatores de repetição foram considerados em uma segunda série de análises de variância sem medidas repetidas, utilizada para testar a significância das diferenças entre o grupo Ctr e os grupos Ctr2, Salina e falso-operados. Estas análises também foram utilizadas para identificar diferenças significativas entre os tempos, independente do tratamento, e entre os tratamentos, independente do tempo. O teste de comparação múltipla de Holm-Sidak foi utilizado como “post-test” para identificar as diferenças significativas entre os

tratamentos dentro de cada tempo e as diferenças dos tempos contra os valores basais (normóxia) dentro de cada tratamento.

As alterações significativas na f_H ao longo do tempo e a interação das injeções (água ou NaCN) nesta resposta foram identificadas pela análise de variância de medidas repetidas com dois fatores (“two-way” ANOVA). Nesta análise o tempo (-30, -60, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 e 180 s) foi considerado o principal fator de repetição e as injeções intrabucais (água e NaCN) o segundo fator. A “two-way” ANOVA foi complementada pelo teste de comparação múltipla de Holm-Sidak, utilizado para testar as significâncias das diferenças entre as injeções em cada tempo. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. e foram consideradas significativas diferenças com valores de $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas por meio do software SigmaStat versão 3.5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da dose de atropina

A f_H dos animais que receberam 1,5 e 2,0 mg.kg^{-1} de At se manteve elevada durante a hipóxia e nas 3 h do período de recuperação (Figura 11). Isto indica que, nestas doses, a At foi efetiva em bloquear o tônus parassimpático cardíaco durante o tempo necessário para realização do protocolo de hipóxia. Contudo, quando aplicada na dose de 1,0 mg.kg^{-1} , o efeito da At não durou tempo suficiente, evidenciado pela queda na f_H após aproximadamente 20 min do retorno à normóxia (Figura 11), tornando esta dose inadequada aos objetivos deste trabalho.

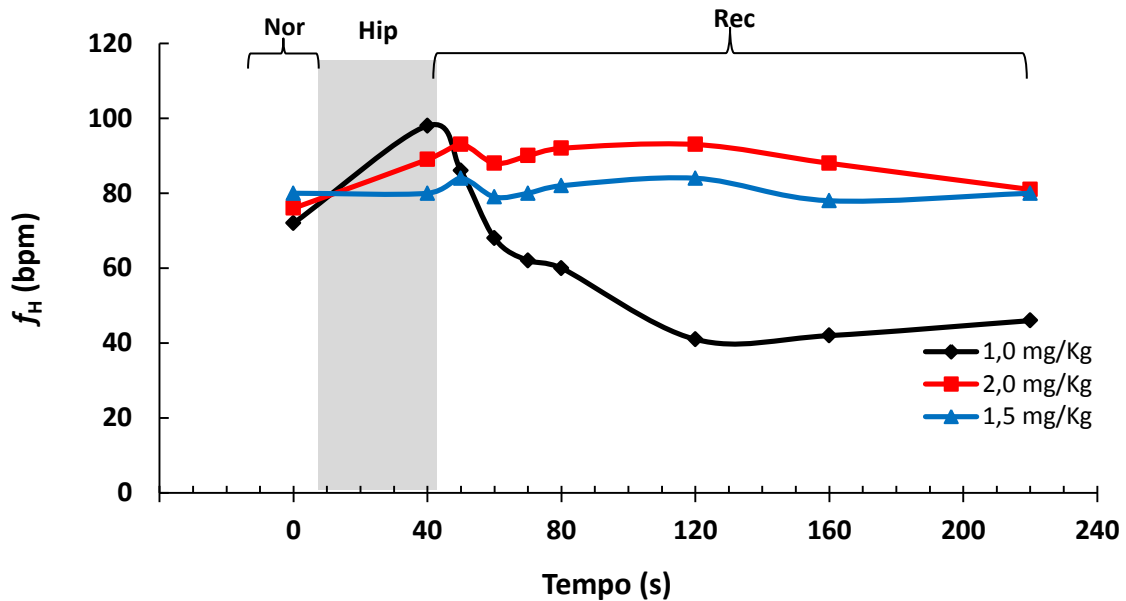


Figura 11. Frequência cardíaca (f_H -bpm) dos animais que receberam atropina nas doses de 1,0 mg.kg^{-1} (Linha preta), 1,5 mg.kg^{-1} (Linha azul) e 2,0 mg.kg^{-1} (Linha vermelha), 1 h após a administração, em normóxia (Nor), hipóxia (Hip) e subsequente período de recuperação (Rec).

Antes da vagotomia, o peixe atropinizado com 2,0 mg.kg^{-1} ainda apresentava a f_H relativamente elevada que não diminuiu em resposta ao NaCN (Figura 12). Se administrada nesta dose, portanto, a At poderia ainda estar ativa durante a exposição do animal vagotomizado ao protocolo de hipóxia, confundindo a origem destes resultados (At ou vagotomia). Já o animal que recebeu 1,5 mg.kg^{-1} do fármaco, além de apresentar valores de f_H antes da vagotomia próximos aos observados antes da injeção de At, respondeu ao NaCN com uma pronunciada bradicardia (Figura 12), evidenciando que a At não estava mais interagindo com os receptores muscarínicos do coração, e que esta era a dose ideal ao protocolo

experimental proposto. Por segurança, injeções externas de NaCN (via cânula intrabucal) foram aplicadas em todos os animais antes da vagotomia para verificar se a At não estava mais ativa (Figura 13A).

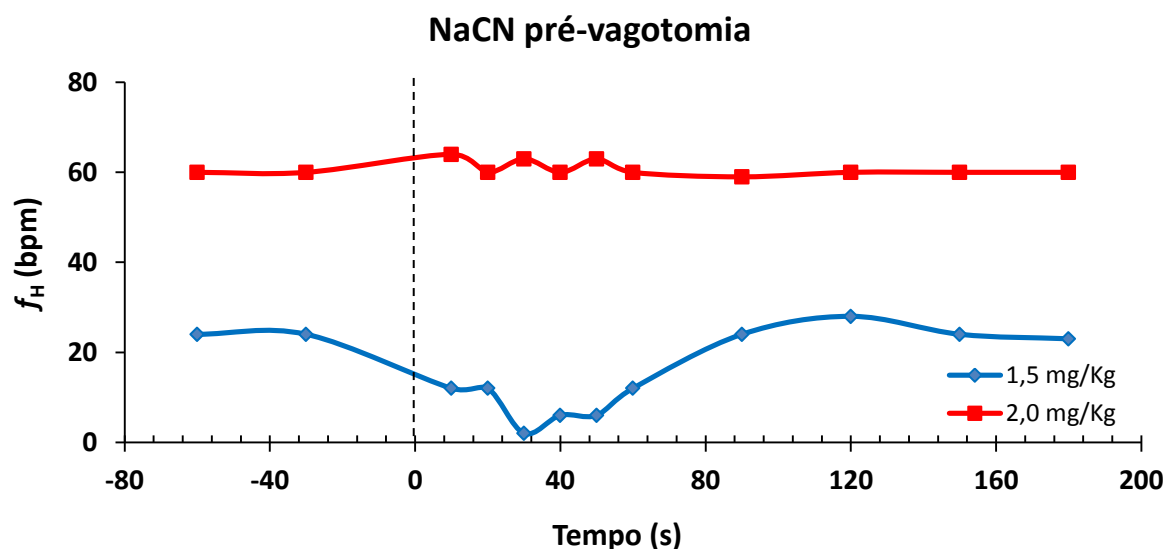


Figura 12. Frequência cardíaca (f_H - bpm) dos animais atropinizados com $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Linha azul) e $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Linha vermelha), antes e após injeção de cianeto (2 mg.kg^{-1}) intrabucal. A linha tracejada indica o momento da injeção.

4.2 Eficácia do método

A utilização do mesmo animal em todos os protocolos possibilitou a comparação dos efeitos dos diferentes métodos de abolição da bradicardia, At e vagotomia, com mínimas influências da variabilidade interindividual nos parâmetros cardiorrespiratórios analisados, o que permitiria evidenciar diferenças mais sutis entre os tratamentos. Contudo, este protocolo coloca em dúvida a validade das respostas dos animais vagotomizados, uma vez que a At (administrada aproximadamente 44 h antes dos experimentos com o grupo V) poderia ainda estar interagindo com os receptores muscarínicos do coração e, portanto, confundindo estes resultados. Porém, antes da desnervação, todos os animais apresentaram valores de f_H semelhantes aos encontrados antes da atropinização e desenvolveram uma pronunciada bradicardia em resposta às injeções de NaCN pré-desnervação (Figura 13A). Isto mostra que na dose administrada ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) a At perdeu seu efeito em menos de 30 h após sua injeção. As injeções de NaCN depois da vagotomia (Figura 13B) não alteraram a f_H , indicando a correta desnervação do ramo cardíaco do Vago.

O nível de hipóxia (20 mmHg) e o tempo em que os peixes foram submetidos a ela (40 min) foi suficiente para produzir respostas cardíacas acentuadas e em menos de 3 h de recuperação da hipóxia todos os parâmetros se restabeleceram.

A duração total dos experimentos com cada animal foi relativamente longa (cerca de 66 h). Contudo, não foram verificadas alterações significativas nos parâmetros avaliados entre os grupos Ctr, Ctr2, Salina e falso-operados. Portanto, se houve estresse de manipulação, este não afetou as respostas fisiológicas investigadas, ou foi o mesmo para ambos os grupos. A constância das respostas à hipóxia ao longo dos tratamentos Ctr2, Salina e falso-operados (Apêndice A), demonstra também, que a exposição do mesmo animal a mais de uma série de hipóxia, não provocou sensibilização dos quimiorreceptores de O_2 ou de vias ativadas por eles. Animais desta espécie já haviam se mostrado resistentes a protocolos extensos em estudos prévios também com desnervações (Florindo et al. 2004; 2006).

A metodologia utilizada não permitiu mensurar a pressão sanguínea na aorta ventral, uma vez que, para acessar este vaso é necessário introduzir uma cânula na artéria branquial, impedindo ou reduzindo o fluxo sanguíneo neste arco canulado, o que poderia alterar a EO_2 . A aferição da pressão na aorta caudal também não seria possível pela dificuldade em manter uma cânula neste vaso durante todo o protocolo experimental. A análise eletrocardiográfica não foi realizada devido à baixa qualidade do sinal do ECG.

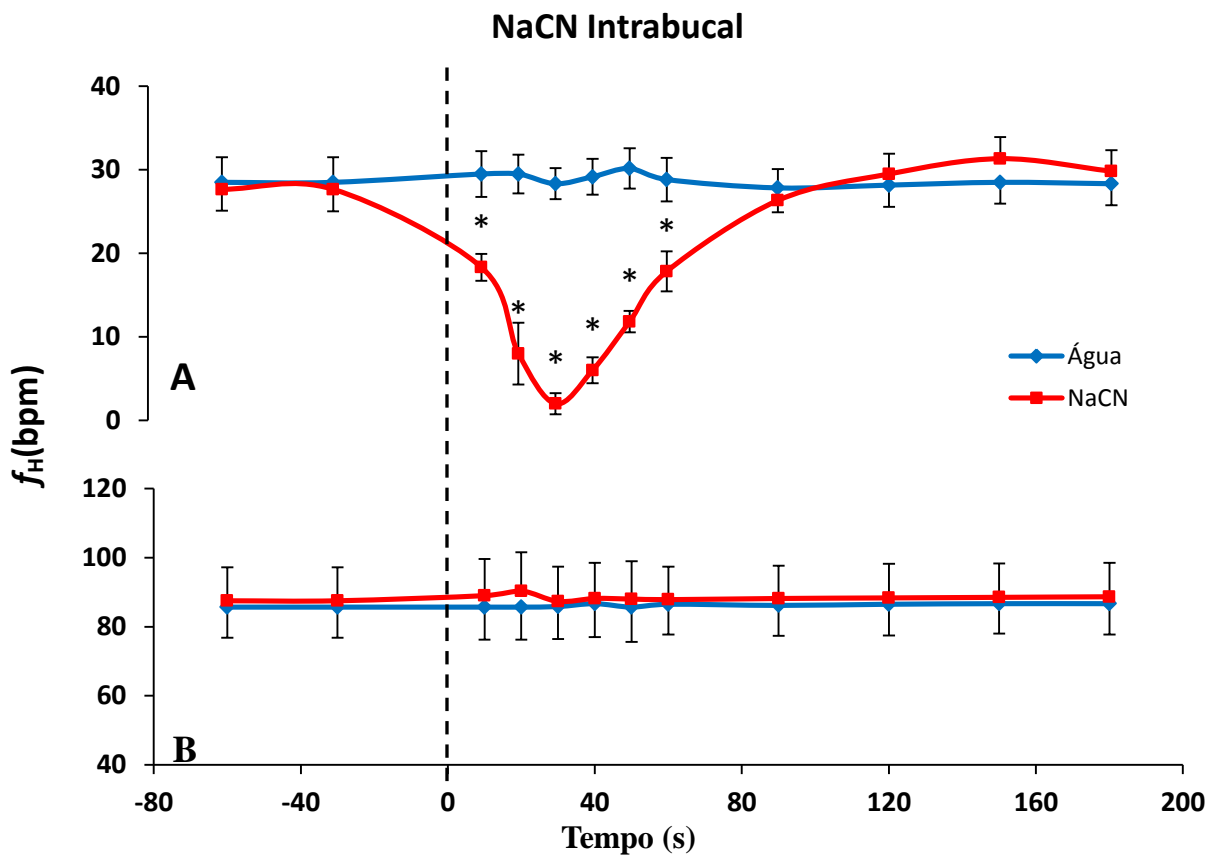


Figura 13. Frequência cardíaca (f_H - bpm) de tambaqui, *C. macropomum*, às injeções intrabucais de água e NaCN antes (A) e após (B) a vagotomia. A linha tracejada indica o momento das injeções. (*) indicam diferença significativa em relação aos valores de f_H pré-injeção. Os pontos são médias \pm E.P.M.; N = 9, ($P \leq 0,05$).

4.3 Frequência Cardíaca

Os valores médios da f_H dos grupos Ctr, A e V em todos os tempos do protocolo de hipóxia estão apresentados na Tabela 1 e representados graficamente na figura 14. As alterações na f_H dos grupos Ctr 2, Salina e falso-operados em resposta ao protocolo de hipóxia estão representadas graficamente no Apêndice A.

A f_H (bpm) média em cada tempo do protocolo de hipóxia (Normóxia, Hipóxia e tempos da Recuperação) não diferiu entre os grupos Ctr, Ctr 2, Salina e falso-operados. Isto evidencia que o estresse induzido pela injeção intraperitoneal e pelos procedimentos cirúrgicos da vagotomia não interferiu significativamente nesta resposta.

A f_H de repouso dos animais Ctr ($32 \pm 1,7$ bpm) foi similar às encontradas para mesma espécie por Rantin e Kalinin (1996), Gilmour et al. (2005) e Reid et al. (2005). Tanto a At quanto a vagotomia, elevaram a f_H em taxas semelhantemente altas (143% e 151%, respectivamente).

O grupo Ctr apresentou diminuição da f_H em hipóxia de $32 \pm 1,7$ para $18,1 \pm 1,5$ bpm e aumento de 55% da f_H após retornar à condição de normóxia. A taquicardia persistiu por 40 min e depois a f_H retornou aos valores pré-hipóxia. A alta f_H apresentada pelos grupos A e V em normóxia persistiu durante a hipóxia e toda recuperação e foi significativamente maior que a f_H do grupo Ctr em todos os tempos experimentais.

A grande elevação na f_H após o bloqueio parassimpático cardíaco (grupos A e V) indica um alto tônus vagal em normóxia nestes animais. O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, espécie filogeneticamente próxima ao tambaqui (pertencem à mesma subfamília: Serrasalminae), apresenta valores maiores de tônus colinérgico que adrenérgico no coração em normóxia, 29% contra apenas 9%, respectivamente (Leite et al. 2009). Contudo, apesar da grande influência da At/vagotomia na f_H de *C. macropomum*, não é possível afirmar se a f_H destes animais está sobre maior influência colinérgica que adrenérgica em normóxia pois os valores dos tônus autonômicos cardíacos não foram verificados nesta espécie.

Em algumas espécies de peixes como *Pollachius pollachius*, *Ciliata mustela*, *Raniceps raninus* e *Zoarces viviparus*, foram verificados maiores valores de tônus cardíaco adrenérgico que colinérgico em repouso (Axelsson et al. 1987). Entretanto, o predomínio do tônus vagal sobre a f_H de teleósteos é amplamente verificado (Axelsson et al. 1989; Axelsson et al. 1992; McKenzie et al. 1995; Altimiras et al. 1997; Stecyk e Farrell 2006; McKenzie et al. 2007; Leite et al. 2009). A intensidade em que o parassimpático inibe a f_H em normóxia, contudo, varia muito entre as espécies dificultando o estabelecimento de padrões. Enquanto efeitos

mínimos da At na f_H são observados em algumas espécies (McKenzie et al. 1995; Perry e Reid 2002; Perry e Desforges 2006; Iversen et al. 2010a) valores extremamente altos de tônus vagal foram verificados em *Dicentrarchus labrax* (Iversen et al. 2010b), em *Pagothenia borchgrevinki*, em *Katsuwonus pelamis* e em *Pagothenia bernacchii* (Altimiras et al. 1997).

A despeito da grande elevação na f_H seguida do tratamento com At ou vagotomia no presente trabalho (de 32 para 77,8 e 80,6 bpm, respectivamente), Sundin et al. (2000) verificaram menores aumentos da f_H em tambaqui após atropinização (~30 %). Esta divergência pode ter ocorrido devido a diferenças na dose de At ou dos próprios valores de tônus autonômicos cardíacos. No primeiro estudo (Sundin et al. 2000) foi utilizada uma dose menor de At ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), que pode não ter sido suficiente para bloquear totalmente o tônus vagal cardíaco. Além disto, os maiores valores de f_H de repouso (49 bpm) verificados no trabalho anterior, indicam que, possivelmente, estes animais estavam sobre menor influência colinérgica que os peixes utilizados no atual trabalho.

Muitos fatores podem interferir na regulação autonômica cardíaca de peixes produzindo diferenças intraespecíficas na f_H de repouso como: (a) divergências no estágio de desenvolvimento (Schwerte et al. 2006), (b) nas temperaturas de aclimação (Taylor et al. 1977), (c) nos procedimentos cirúrgicos, (d) na instrumentação utilizada (Altimiras e Larsen 2000; Gräns et al. 2010) e (e) no tempo de recuperação pós-cirúrgica (Campbell et al. 2004).

Tanto a At quanto a vagotomia foram igualmente eficientes em inibir a bradicardia hipóxica (Tabela 1 e Figura 14). Sundin et al. (2000), entretanto, verificaram que a At não aboliu totalmente a bradicardia hipóxica no tambaqui. Estes autores associaram a bradicardia após bloqueio colinérgico a uma disfunção do miocárdio por isquemia. Contudo, no atual trabalho, os animais atropinizados ou vagotomizados ficaram mais tempo expostos à hipóxia e, mesmo assim, não apresentaram redução da f_H . Portanto, a bradicardia observada por Sundin et al. (2000) provavelmente ocorreu devido à baixa dose de At utilizada, como citado anteriormente.

A redução da f_H em hipóxia (43%) apresentada pelos animais Ctr, é induzida por um aumento no tônus vagal inibitório, conhecido por atuar como um reflexo induzido pela estimulação de quimiorreceptores sensíveis ao O_2 (Taylor 1992). No tambaqui, estes quimiorreceptores possuem localização branquial e extra branquial (Sundin et al. 2000). Nos animais do grupo 1, ambos os métodos (At e vagotomia) foram capazes de bloquear as eferências cardíacas do quimiorreflexo de O_2 mantendo a f_H elevada: a vagotomia impedindo a liberação de Ach pelas terminações do nervo Vago no coração e a At interagindo com os

receptores muscarínicos cardíacos impedindo que a Ach liberada pelo vago estimulasse estes receptores, desencadeando a bradicardia.

Assim como nos grupos A e V, enguias europeias, atropinizadas também não apresentaram redução da f_H quando submetidas à hipóxia (Iversen et al. 2010a). Contudo, a bradicardia hipóxica foi apenas atenuada, e não abolida completamente, no bacalhau após vagotomia (McKenzie et al. 2009) e na truta atropinizada (Perry e Desforges 2006). No bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*, a correta desnervação do ramo cardíaco do vago foi confirmada por injeções de NaCN. Na truta, porém, a diminuição, mas não completa abolição da bradicardia hipóxica, pode estar associada a uma dose baixa de At, uma vez que o total bloqueio dos receptores muscarínicos cardíacos não foi confirmado.

A queda na f_H em hipóxia, mesmo após total bloqueio parassimpático cardíaco, como visto no bacalhau (McKenzie et al. 2009), pode ser associada ao efeito direto da hipóxia no miocárdio causando disfunção deste tecido (Glass et al. 1991; Rantin et al. 1995). Assim, a ausência de bradicardia hipóxica no tambaqui e na enguia após o bloqueio do tônus colinérgico cardíaco, indica que, provavelmente, estas espécies possuem miocárdios mais resistentes à hipóxia que o bacalhau. De fato, o coração da enguia é extremamente tolerante a hipóxia e hipoxemia (Davie et al. 1992; McKenzie et al. 2002). O tambaqui, por sua vez, apresenta um miocárdio predominantemente esponjoso (Simões et al. 2002) que favorece a difusão de O_2 do lúmen ventricular em direção à camada compacta (Davie e Farrell 1992). Além disto, tanto o tambaqui quanto a enguia possuem artérias coronárias, permitindo um melhor desempenho cardíaco em hipóxia que espécies que não possuem suprimento de sangue coronário, como o bacalhau.

Quando retornados à normóxia, a f_H dos animais Ctr se elevou rapidamente (Figura 14) a valores acima dos obtidos antes do início da hipóxia. Porém, a elevada f_H no início do período de recuperação foi ainda menor que os valores apresentados pelos animais dos grupos A e V. Portanto, esta taquicardia dos animais Ctr ocorreu, provavelmente, devido a uma diminuição, mas não completa abolição do tônus vagal. A elevação na f_H pós-hipóxia no grupo Ctr dificilmente ocorreu por um aumento do nível de catecolaminas circulantes ou do tônus simpático cardíaco, uma vez que a f_H dos animais atropinizados e vagotomizados não aumentou no retorno à normóxia.

A taquicardia em teleósteos tem sido associada à diminuição, ou até cessação, do tônus colinérgico – sem ou com pouca influência do tônus adrenérgico – em situações como exercício e digestão (Iversen et al. 2010), hiperóxia moderada (Barret e Taylor 1984) e após

estímulo hipóxico (Leite et al. 2009), como, provavelmente, ocorre com o tambaqui. Por outro lado, não se pode excluir a possibilidade do tambaqui ter desenvolvido f_H máximas após o bloqueio parassimpático cardíaco. Assim, a participação adrenérgica na taquicardia pós-hipóxia não seria evidenciada nos grupos A e V, uma vez que, a f_H destes animais estaria atuando no seu limite. Outros ensaios farmacológicos utilizando agonistas e antagonistas beta-adrenérgicos são necessários para esclarecer o papel do sistema adrenérgico na f_H do tambaqui.

O aumento da f_H nestas situações melhora o fluxo de sangue e oferta de O_2 para os tecidos. Quando exposto a tensões de O_2 abaixo da $P_{crit}O_2$, o tambaqui ativa o metabolismo anaeróbico, evidenciado pelo acúmulo de lactato (Affonso et al. 2002). Assim, no retorno à normóxia, a taquicardia associada à maior disponibilidade de O_2 favorece a recuperação aeróbica.

Tabela 1. Frequência cardíaca (f_H - bpm) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Valores em negrito indicam diferença significativa com o controle na mesma PO_2 e asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).

	f_H (bpm)		
	Controle	Atropina	Vagotomizado
Normóxia	32,0 \pm 1,7	77,8 \pm 4,1	80,6 \pm 5,8
Hipóxia	*18,1 \pm 1,5	85,2 \pm 6,0	81,7 \pm 7,0
Rec. 10min	*50,6 \pm 3,9	85,8 \pm 5,9	86,9 \pm 8,6
Rec. 20min	*45,8 \pm 3,5	82,7 \pm 4,4	83,8 \pm 8,6
Rec. 30min	*45,0 \pm 3,2	80,2 \pm 5,3	80,7 \pm 7,6
Rec. 40min	*43,5 \pm 3,0	80,5 \pm 5,4	81,3 \pm 7,0
Rec. 80min	34,3 \pm 2,5	78,7 \pm 5,9	82,2 \pm 5,6
Rec. 120min	28,5 \pm 1,6	75,6 \pm 6,3	81,7 \pm 6,5
Rec. 180min	31,7 \pm 3,6	75,4 \pm 5,7	79,2 \pm 6,0

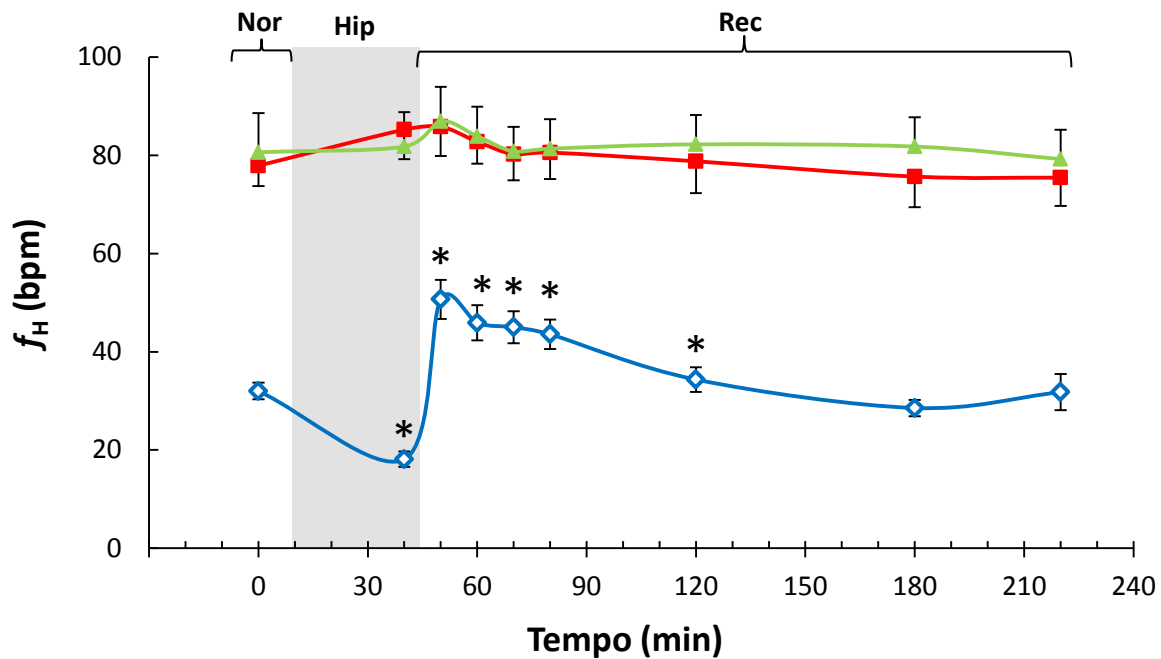


Figura 14. Frequência cardíaca (f_H - bpm) de tambaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (Linha Azul), Atropina (Linha Vermelha) e Vagotomizados (Linha Verde) em normóxia (Nor) hipóxia (Hip) e recuperação (Rec). (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia e símbolos abertos indicam diferença com os grupos Atropina e Vagotomizados na mesma PO_2 . Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).

4.4 Relações da frequência cardíaca com a captação e consumo de O_2

Apesar da grande elevação na f_H após o bloqueio do tônus colinérgico cardíaco em normóxia, a EO_2 e a $\dot{V}O_2$ não diferiu entre os grupos Ctr, Salina, falso-operados, A e V (Tabela 2). Durante a hipóxia, a inibição da bradicardia por meio dos dois métodos utilizados (At e vagotomia), também não alterou a significativa queda na $\dot{V}O_2$ e na EO_2 apresentada pelos grupos Ctr, Salina e falso-operados (Tabela 2).

O coração dos peixes apresenta uma capacidade única em aumentar o volume sistólico (V_s), ao contrário do coração de mamíferos que normalmente atua próximo ao limite da curva de Frank-Starling (Farrell e Jones 1992). Assim, muitas espécies de peixes são capazes de manter o débito cardíaco em hipóxia, apesar da bradicardia, por meio de grandes aumentos no V_s (Short et al 1979; Fritsche e Nilsson 1989). No entanto, algumas espécies como o bacalhau do Atlântico e a enguia, quando submetidas a níveis severos de hipóxia reduzem o débito cardíaco em função de acentuadas quedas na f_H . (Fritsche e Nilsson 1989; Iversen et al. 2010a). Esta diminuição do débito cardíaco em hipóxia aumenta a permanência do sangue nas lamelas melhorando potencialmente a EO_2 devido ao provável maior tempo para difusão do O_2 pelas brânquias (Satchell 1961).

Também tem sido sugerido que a maior pressão pulsátil na aorta ventral, seguida da redução na f_H (mecanismo de Frank-Starling), pode aumentar a superfície respiratória funcional (por meio do maior recrutamento lamelar) melhorando a capacidade de EO_2 em hipóxia (Davie e Daxboeck 1982; Reid et al. 2006).

Assim, segundo estes autores, a redução da f_H aumentaria a saturação de O_2 da hemoglobina e a PO_2 arterial. Apesar de os gases no sangue não terem sido mensurados no presente trabalho, qualquer alteração na capacidade de transferência de O_2 pelas brânquias refletiriam nos valores de EO_2 . Portanto, fica claro que, no tambaqui, menores valores de f_H (tanto em normóxia, quanto em hipóxia) não estão relacionados à maior transferência de gases pelas brânquias.

Desde que as teorias associando a bradicardia a uma melhor EO_2 pelas brânquias foram propostas (Satchell 1961; Randall 1982; Reid et al. 2006) este tem sido o alvo de poucos e contraditórios trabalhos. Dois estudos investigando esta hipótese no dogfish encontraram resultados divergentes. No primeiro, Short et al. (1979) observaram que a EO_2 pelas brânquias durante a hipóxia não diminuiu em animais vagotomizados, enquanto que Taylor e Barrett (1985) demonstraram redução da EO_2 após administração de At. O presente trabalho evidencia que possivelmente outras divergências metodológicas, como o excesso de instrumentação dos animais vagotomizados, e não o método de abolição da bradicardia, podem ter contribuído para gerar respostas tão diferentes no dogfish. Um trabalho mais recente com o bacalhau negro (Campbell e Ediggnton 2007) mostrou redução no consumo de O_2 após vagotomia. Contudo, não é possível afirmar se esta diferença está associada à bradicardia hipóxica nesta espécie, uma vez que o objetivo do trabalho não era este e os peixes não foram submetidos à hipóxia.

Apesar das contradições nos trabalhos com o dogfish (Short et al. 1979; Taylor e Barret, 1985), tanto na truta (Perry e Desforges 2006), na enguia (Iversen et al. 2010a), no bacalhau do Atlântico (McKenzie et al. 2009), assim como no tambaqui, a bradicardia hipóxica não apresentou influência na tomada de O_2 . Perry e Desforges (2006) verificaram que a bradicardia reflexa não alterou a PO_2 arterial de trutas submetidas à hipóxia (40 mmHg) de forma aguda, antes e após bloqueio colinérgico com At. Já na enguia e no bacalhau, a PO_2 foi reduzida gradualmente e verificou-se que, apesar de tanto a At (na enguia) quanto a vagotomia (no bacalhau) bloquearem eficientemente a bradicardia hipóxica, não houve alteração na $P_{crit}O_2$ nestas espécies (McKenzie et al. 2009; Iversen et al. 2010a). Portanto, conclui-se que, nestas espécies, a bradicardia hipóxica não influencia a tomada de O_2

independente da metodologia utilizada para bloquear o tônus colinérgico cardíaco: At ou vagotomia e da forma de exposição dos animais à hipóxia: gradual ou aguda.

Na truta, que é capaz de manter o débito cardíaco em hipóxia, a queda na f_H não melhorou a EO_2 . Contudo, nas espécies que reduzem o débito em hipóxia seria esperado que a eficiência na troca gasosa pelas brânquias aumentasse devido a maior permanência do sangue nas lamelas (Perry e Desforges 2006). No entanto, contradizendo esta hipótese, na enguia o menor débito cardíaco desenvolvido pelos animais controle em relação aos atropinizados, não alterou a $P_{crit}O_2$ ou a $\dot{V}O_2$ em hipóxia (Iversen et al. 2010a).

Quando a hipóxia estimula a bradicardia associada à hiperventilação branquial, ela favorece o sincronismo cardiorrespiratório, onde os batimentos cardíacos tendem a ocorrer em uma fase particular do ciclo respiratório (Randall 1982). Este reflexo, possivelmente melhora a troca gasosa pelas brânquias por favorecer a sincronização de dois fluxos pulsáteis, água e sangue (Satchell 1991).

No tambaqui em normóxia a razão entre f_R e f_H foi de 1,7:1. Estes valores diferem da relação 1:1 encontrada por Rantin e Kalinin (1996) para esta espécie. Maiores valores de f_R dos animais no presente trabalho (55 contra ~ 30 ciclos por min) foram responsáveis por esta diferença, uma vez que a f_H de repouso foi muito semelhante entre os trabalhos. O menor peso dos animais do atual trabalho indica que possivelmente estes apresentaram maiores taxas metabólicas que aqueles, justificando esta diferença na f_R .

Em hipóxia a elevação na f_R (96 %) e a queda na f_H (43 %) induziram uma razão de 5,9:1 ($f_R : f_H$). Este acoplamento cardiorrespiratório foi abolido tanto pela At quanto pela vagotomia. Porém, não foram verificadas diferenças na EO_2 e $\dot{V}O_2$ entre os grupos Ctr, A e V, indicando que no tambaqui o acoplamento cardiorrespiratório em hipóxia não melhora a transferências de O_2 pelas brânquias em hipóxia.

Perry e Desforges (2006) verificaram que a At induziu hipertensão sistêmica com aumentos significativos no débito cardíaco, tanto em normóxia quanto em hipóxia. Este efeito secundário da At pode ter influenciado a pressão de perfusão sanguínea lamelar e alterado a EO_2 dificultando a interpretação dos resultados. Um estudo prévio com o tambaqui mostrou que esta espécie apresenta um eficiente controle barostático uma vez que, apesar da queda na f_H em hipóxia, a pressão arterial destes animais permaneceu constante durante todo o experimento. Isto ocorreu, provavelmente devido a um aumento na resistência sistêmica (Sundin et al. 2000). Além disto, Sundin et al. (2000) também verificaram que o tratamento com At não alterou a pressão arterial do tambaqui. Assim, apesar de a pressão arterial não ter

vido analisada no presente trabalho, a At, provavelmente não induziu alterações secundárias no tabaqui, uma vez que as respostas cardiorrespiratórias dos grupos A e V não diferiram em nenhum momento do protocolo de hipóxia (Figuras 14, 15, 16 e 17).

Tabela 2. Frequência cardíaca (f_H - bpm), Taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ -mLO₂.kg⁻¹.h⁻¹) e Extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %) dos grupos Controle, Salina, falso-operados, Atropina e Vagotomizado em normóxia e hipóxia. Valores em negrito indicam diferença significativa em relação à normóxia e asteriscos indicam diferença com o controle na mesma PO₂. Valores apresentados como média ± E.P.M., (P ≤ 0,05).

	f_H (bpm)		$\dot{V}O_2$ (mLO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹)		EO ₂ (%)	
	Normóxia	Hipóxia	Normóxia	Hipóxia	Normóxia	Hipóxia
Controle	32,0 ± 1,7	18,1 ± 1,5	78,1 ± 2,8	30,3 ± 1,9	69,6 ± 1,3	24,2 ± 2,8
Salina	35,6 ± 3,1	22,0 ± 1,2	84,9 ± 4,9	35,6 ± 2,9	70,0 ± 1,8	25,5 ± 1,7
falso-operados	31,8 ± 2,6	22,2 ± 1,5	83,5 ± 5,5	36,3 ± 3,1	69,4 ± 1,9	25,1 ± 2,5
Atropina	77,8 ± 4,1*	85,2 ± 6,0*	78,5 ± 2,5	31,6 ± 2,1	66,0 ± 2,5	24,9 ± 2,4
Vagotomizado	80,6 ± 5,8*	81,7 ± 7,0*	83,9 ± 1,4	31,6 ± 2,6	68,3 ± 2,8	24,4 ± 2,6

4.5 Respostas respiratórias ao protocolo de hipóxia

Tanto o tratamento com At quanto a vagotomia não alteraram os valores dos parâmetros respiratórios em nenhum momento do protocolo de hipóxia. Os valores médios da $\dot{V}O_2$ dos grupos Ctr, A e V são apresentados na tabela 3 e representados graficamente na figura 15; da EO₂ na tabela 4 e figura 16 e da \dot{V}_G , f_R , V_T e $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ nas tabelas 5,6,7 e 8, respectivamente e na figura 17.

Em hipóxia houve redução da $\dot{V}O_2$ (de 78,1 ± 2,8 para 30,3 ± 1,9) e da EO₂ (de 69,6 ± 1,3 para 24,2 ± 2,8) no grupo Ctr, enquanto os valores de \dot{V}_G , f_R , V_T e $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ aumentaram em ~650 %, ~96 %, ~275 % e ~1800 %, respectivamente. Ao retornar à normóxia a $\dot{V}O_2$ aumentou cerca de duas vezes os valores de repouso, sofrendo redução gradual até restabelecer a $\dot{V}O_2$ basal em menos de 80 min (Figura 15). A EO₂ aumentou sucessivamente após a hipóxia atingindo os valores de repouso em menos de 40 min (Figura 16). A $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ voltou ao nível de repouso logo após o término da hipóxia, enquanto a f_R permaneceu elevada

por pelo menos 10min e a \dot{V}_G tanto quanto a V_T por pelo menos 20 min após retornar às condições normóxicas (Figura 17).

Como visto, a despeito das diferenças na f_H entre os grupos Ctr, A e V, a $\dot{V}O_2$, EO_2 e demais parâmetros respiratórios mensurados, foram muito semelhantes entre os grupos em todos os tempos experimentais. A At também não alterou a $\dot{V}O_2$ ou $P_{crit}O_2$ de enguias (Iversen et al. 2010a) bem como a f_R e amplitude ventilatória de trutas (Perry e Desforges 2006) ambas submetidas à hipóxia. Estes resultados evidenciam que a At ou a vagotomia não influenciaram direta ou indiretamente as respostas respiratórias à hipóxia e foram eficientes em demonstrar que a bradicardia não melhora a transferência de O_2 pelas brânquias nestas espécies, assim como foi verificado no tambaqui neste estudo. Curiosamente, no bacalhau, a vagotomia não alterou a captação de O_2 em hipóxia, mas diminuiu as respostas ventilatórias em níveis de O_2 abaixo da $P_{crit}O_2$ desta espécie (McKenzie et al. 2009). Estes resultados no bacalhau mostram que a interação da bradicardia com as respostas ventilatórias à hipóxia podem ser espécie-específicas ou dependentes da PO_2 .

Os valores da $\dot{V}O_2$ em normóxia foram muito semelhantes aos encontrados por Corrêa (1996). Em hipóxia a $\dot{V}O_2$ reduziu em aproximadamente 62 % e no início do período de recuperação aumentou para valores duas vezes maiores que os pré-hipóxia (Figura 12). Esta acentuada diminuição da $\dot{V}O_2$ que ocorreu abaixo de níveis críticos de O_2 ambiental ($P_{crit}O_2 = 24$ mmHg) no tambaqui (Corrêa 1996), demonstra que os ajustes ventilatórios (Figura 17) não foram suficientes para manter o metabolismo aeróbico.

Para compensar a baixa produção de energia aeróbica durante a hipóxia, e manter o balanço energético celular, muitas espécies de peixes aumentam o metabolismo anaeróbico (Almeida-Val et al. 1993; Virani e Rees 2000; Almeida-Val et al. 2006; Mandic et al. 2008; Richards 2009) como também ocorre com o tambaqui (Affonso et al. 2002). Quando são retornados às condições normóxicas, reativam o metabolismo aeróbico (efeito Pasteur) apresentando um excesso de consumo de O_2 no início do período de recuperação e permitindo reestabelecer o débito de O_2 assim como sustentar os custos da própria recuperação (van Ginneken et al. 1995; Virani e Rees 2000). Provavelmente, isto deve ter ocorrido com o tambaqui.

Os valores da EO_2 em normóxia observados no presente trabalho (~70%) se assemelham aos encontrados por Corrêa (1996). EO_2 elevadas também são encontradas em outras espécies tolerantes à hipóxia como a tilápia, *Oreochromis niloticus* (Fernandes e

Rantin 1989; Martins et al. 2011), o curimatã, *Prochilodus scrofa* (Fernandes et al. 1995) e a carpa, *Cyprinus carpio* (Lomholt e Johansen 1979).

Quando submetido à hipóxia, o tambaqui apresentou uma acentuada redução da EO_2 maior que 65%. Esta queda na EO_2 pode ser relacionada aos aumentos extremos da \dot{V}_G observados em hipóxia (Fernandes e Rantin 1989), o que fica mais evidente pela elevada $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ em hipóxia. A relação negativa entre \dot{V}_G e EO_2 também foi verificada na recuperação da hipóxia quando a \dot{V}_G se manteve elevada por pelo menos 20 min, o que provavelmente dificultou o restabelecimento da EO_2 que aumentou de forma gradual alcançando os valores pré-hipóxia em pouco mais de 30 minutos. É importante ressaltar que o tambaqui em hipóxia, quando tem acesso à superfície realiza a ASR, sendo que esta adaptação deve representar uma redução do custo energético da \dot{V}_G devido as maiores concentrações de O_2 na água inspirada (Kramer 1983).

Os elevados valores de \dot{V}_G durante a hipóxia foram alcançados por meio de maiores aumentos na V_T (~3 vezes) que na f_R (~2 vezes). Esta estratégia tem sido observada na maioria das espécies de peixes já estudadas (ver revisão de Perry et al. 2009) e segundo Rantin et al. (1992), os peixes provavelmente, desenvolvem menores gastos energéticos elevando o V_T , do que aumentando a f_R contra a alta viscosidade da água. Apesar disto, aumentos na V_T são limitados pelo volume da câmara bucal e opercular (Kalinin et al. 1996; 2000), o que explica os associados, porém menores, aumentos na f_R do tambaqui em hipóxia.

Em situações de hipóxia moderada, espécies oxirreguladoras elevam a \dot{V}_G mantendo constante a quantidade de O_2 que passa pelas brânquias, o que permite a manutenção da $\dot{V}O_2$ (Hughes 1973). Contudo, em hipóxia severa (tensões abaixo da $P_{crit}O_2$), muitas espécies diminuem a EO_2 em função de grandes aumentos na \dot{V}_G (Hughes e Knights 1968; Hughes e Saunders 1970; Fernandes e Rantin 1989; Martins et al. 2011). Segundo Hughes e Saunders (1970) o tempo para difusão do O_2 da água para o sangue diminui com o aumento da velocidade em que a água passa pelas brânquias, prejudicando a EO_2 . Além disto, esta grande elevação na \dot{V}_G também pode ter aumentado o espaço morto ventilatório reduzindo a quantidade de água em contato com as brânquias, também diminuindo a EO_2 .

A grande velocidade da água passando pelas brânquias em hipóxia nos grupos Ctr, A e V pode ter prejudicado a EO_2 em ambos os grupos e, portanto, “mascarado” o possível benefício da bradicardia neste parâmetro. Apesar disto, os valores de EO_2 em normóxia dos animais antes e após bloqueio colinérgico foram semelhantes, indicando que alterações na f_H ,

provavelmente não interferem na capacidade de transferência gasosa pelas brânquias no tambaqui.

Tabela 3. Taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ - $\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média \pm E.P.M., ($P \leq 0,05$).

Tempo	$\dot{V}O_2$ ($\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)		
	Controle	Atropina	Vagotomizado
Normóxia	78,1 \pm 2,8	78,5 \pm 2,5	83,9 \pm 1,4
Hipóxia	30,3 \pm 1,9*	31,6 \pm 2,1*	31,6 \pm 2,6*
Rec. 10min	235,0 \pm 9,8*	245,6 \pm 12,5*	250,7 \pm 14,2*
Rec. 20min	172,2 \pm 10,2*	189,8 \pm 14,3*	182,4 \pm 11,9*
Rec. 30min	132,9 \pm 10,2*	141,4 \pm 11,1*	144,8 \pm 9,8*
Rec. 40min	110,8 \pm 8,5*	126,2 \pm 10,4*	124,4 \pm 9,5*
Rec. 80min	89,2 \pm 4,8	96,0 \pm 7,6	91,5 \pm 23,1
Rec. 120min	79,1 \pm 4,0	80,6 \pm 4,4	81,4 \pm 3,0
Rec. 180min	82,9 \pm 5,6	77,1 \pm 3,3	79,0 \pm 2,3

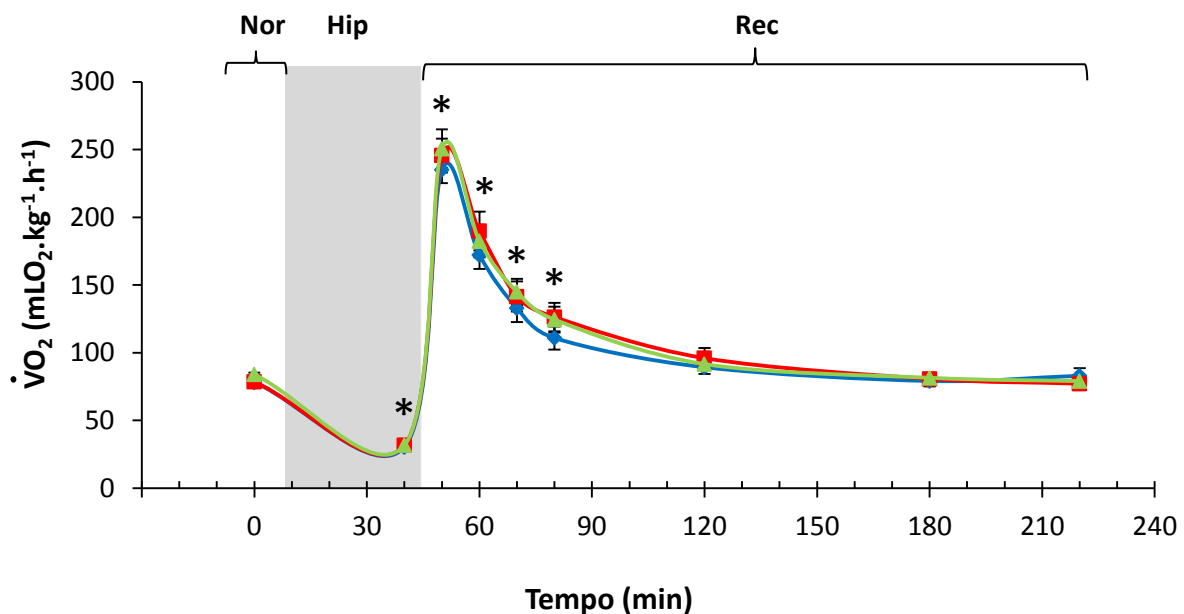


Figura 15. Taxa metabólica ($\dot{V}O_2$ - $\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) de tambaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (linha Azul), Atropina (Linha vermelha) e Vagotomizado (linha verde) em normóxia (Nor) hipóxia (Hip) e recuperação (Rec). (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia ($P \leq 0,05$). Valores apresentados como média \pm E.P.M..

Tabela 4. Extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂- %) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média ± E.P.M., (P ≤ 0,05).

Tempo	EO ₂ (%)		
	Controle	Atropina	Vagotomizado
Normóxia	69,6 ± 1,3	66,0 ± 2,5	68,3 ± 2,8
Hipóxia	24,2 ± 2,8*	24,9 ± 2,4*	24,4 ± 2,6*
Rec. 10min	39,8 ± 3,9*	35,4 ± 3,1*	40,1 ± 2,8*
Rec. 20min	52,4 ± 3,5*	48,7 ± 3,1*	52,3 ± 3,0*
Rec. 30min	57,9 ± 2,7*	57,3 ± 2,8*	57,7 ± 3,1*
Rec. 40min	60,9 ± 1,9	61,0 ± 2,6	62,1 ± 2,7
Rec. 80min	65,5 ± 1,4	63,8 ± 2,2	67,5 ± 2,2
Rec. 120min	68,4 ± 2,0	65,9 ± 2,6	68,2 ± 2,4
Rec. 180min	69,5 ± 1,7	69,0 ± 3,0	68,8 ± 3,6

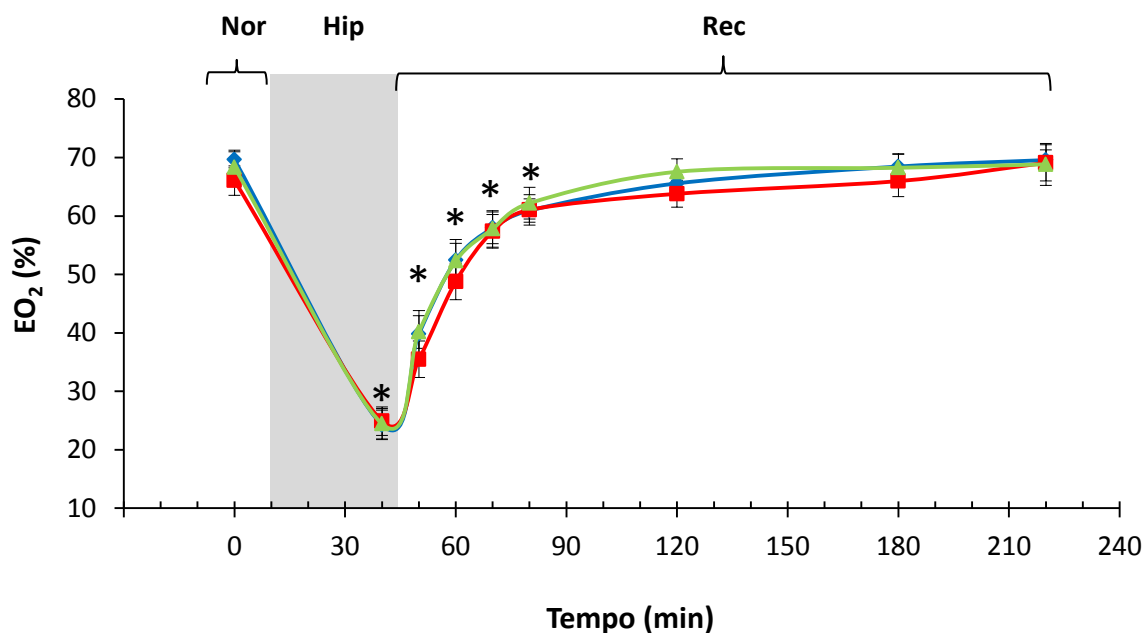


Figura 16. Extração de oxigênio da corrente ventilatória (EO₂ - %) de tambaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (linha azul), Atropina (linha vermelha) e Vagotomizado (linha verde) em normóxia (Nor) hipóxia (Hip) e recuperação (Rec). (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia (P ≤ 0,05). Valores apresentados como média ± E.P.M..

Tabela 5. Ventilação Branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média ± E.P.M., (P ≤ 0,05).

\dot{V}_G (mLH ₂ O.kg ⁻¹ .min ⁻¹)			
Tempo	Controle	Atropina	Vagotomizado
Normóxia	343,0 ± 13,1	372,0 ± 20,8	403,5 ± 24,8
Hipóxia	2904,3 ± 312,1*	2664,8 ± 244,2*	2828,6 ± 445,2*
Rec. 10min	2276,2 ± 292,1*	2460,2 ± 281,2*	2218,4 ± 217,9*
Rec. 20min	1120,6 ± 137,8*	1429,9 ± 253,2*	1124,4 ± 145,5*
Rec. 30min	740,0 ± 82,2	839,5 ± 104,8	782,2 ± 77,7
Rec. 40min	569,1 ± 48,8	684,4 ± 82,4	642,4 ± 72,1
Rec. 80min	439,8 ± 37,1	495,3 ± 54,4	460,6 ± 38,4
Rec. 120min	354,5 ± 19,4	384,1 ± 30,4	406,4 ± 28,9
Rec. 180min	362,8 ± 23,0	348,0 ± 17,3	397,1 ± 23,0

Tabela 6. Frequência Respiratória (f_R – ciclos por minuto, cpm) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média ± E.P.M., (P ≤ 0,05).

f_R (cpm)			
Tempo	Controle	Atropina	Vagotomizado
Normóxia	55,2 ± 3,1	47,5 ± 3,6	54,7 ± 3,9
Hipóxia	107,0 ± 2,6*	100,7 ± 2,6*	102,1 ± 4,4*
Rec. 10min	71,8 ± 5,6*	71,2 ± 4,4*	68,8 ± 8,2*
Rec. 20min	57,1 ± 3,8	57,8 ± 3,0	54,1 ± 2,6
Rec. 30min	57,5 ± 4,6	52,4 ± 3,6	52,8 ± 2,4
Rec. 40min	56,8 ± 4,4	53,6 ± 3,2	50,7 ± 2,1
Rec. 80min	53,5 ± 5,0	56,1 ± 3,6	51,0 ± 4,1
Rec. 120min	50,5 ± 4,9	51,6 ± 3,0	47,2 ± 3,8
Rec. 180min	51,3 ± 5,1	55,2 ± 3,4	49,1 ± 3,8

Tabela 7. Volume Ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo⁻¹) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média ± E.P.M., ($P \leq 0,05$).

V_T (mLH ₂ O.kg ⁻¹ .ciclo ⁻¹)			
Tempo	Controle	Atropina	Vagotomizado
Normóxia	5,8 ± 0,3	8,2 ± 0,7	7,6 ± 0,5
Hipóxia	27,1 ± 2,8*	26,3 ± 2,0*	27,7 ± 4,9*
Rec. 10min	33,8 ± 2,9*	36,7 ± 3,5*	33,4 ± 4,0*
Rec. 20min	21,5 ± 2,8*	26,5 ± 4,2*	23,0 ± 3,7*
Rec. 30min	13,3 ± 1,7	16,5 ± 2,2	16,0 ± 2,0
Rec. 40min	10,5 ± 1,3	13,2 ± 1,9	13,1 ± 2,0
Rec. 80min	8,4 ± 0,7	8,8 ± 1,0	8,6 ± 0,6
Rec. 120min	7,7 ± 0,9	7,6 ± 0,8	8,3 ± 0,5
Rec. 180min	7,5 ± 0,8	6,6 ± 0,8	7,9 ± 0,4

Tabela 8. Necessidade Ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ - mLH₂O.mLO₂⁻¹) dos grupos Controle, Atropina e Vagotomizado em normóxia, hipóxia e tempos da recuperação. Asteriscos indicam diferença em relação à normóxia. Valores apresentados como média ± E.P.M., ($P \leq 0,05$).

$\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ (mLH ₂ O.mLO ₂ ⁻¹)			
Tempo	Controle	Atropina	Vagotomizado
Normóxia	4,3 ± 1,0	4,9 ± 0,3	4,4 ± 0,1
Hipóxia	90,9 ± 8,9*	86,3 ± 8,8*	88,0 ± 9,0*
Rec. 10min	9,6 ± 1,15	11,5 ± 1,2	8,9 ± 0,6
Rec. 20min	6,3 ± 0,4	7,6 ± 0,8	6,1 ± 0,2
Rec. 30min	5,4 ± 0,2	5,8 ± 0,3	5,3 ± 0,3
Rec. 40min	5,1 ± 0,1	5,3 ± 0,3	5,0 ± 0,3
Rec. 80min	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,2	4,5 ± 0,1
Rec. 120min	4,4 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,5 ± 0,2
Rec. 180min	4,3 ± 0,1	4,5 ± 0,1	4,5 ± 0,2

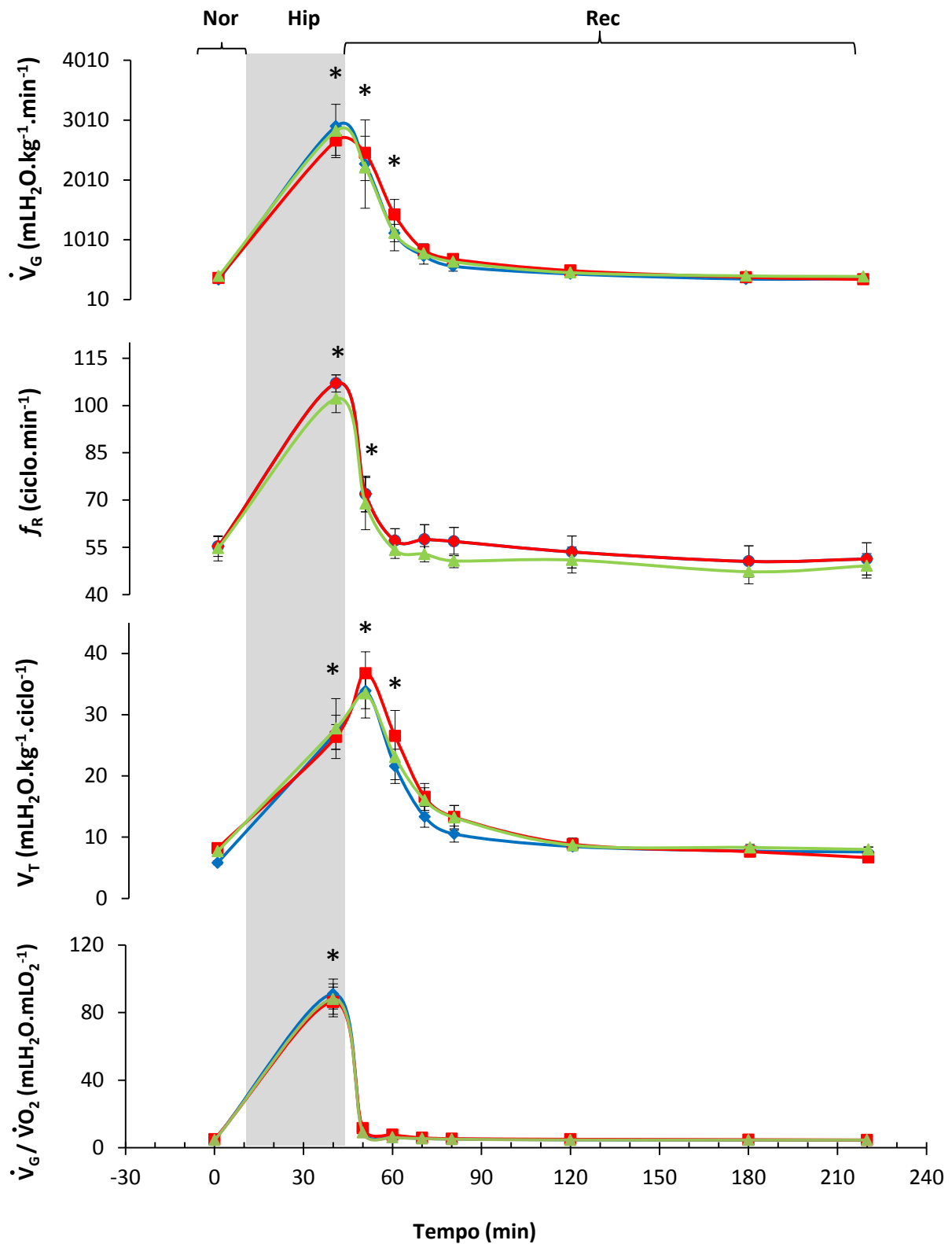


Figura 17. Ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹), frequência respiratória (f_R - ciclo.min⁻¹), volume ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo⁻¹) e necessidade ventilatória ($\dot{V}_G / \dot{V}_{O_2}$ - mLH₂O.mLO₂⁻¹) de tabaqui, *C. macropomum*, nos grupos Controle (linhas azuis), Atropina (linhas vermelhas) e Vagotomizado (linhas verdes) em cada tempo experimental. (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia ($P \leq 0,05$). Valores apresentados como média \pm E.P.M..

4.6 Alternativas para a função da bradicardia hipóxica

O bloqueio do tônus colinérgico cardíaco por meio da At ou vagotomia no tambaqui mostrou que, nesta espécie, a bradicardia hipóxica não melhora a EO_2 . Nos trabalhos com bloqueio parassimpático cardíaco utilizando a truta, a enguia, o “dogfish” e o bacalhau a teoria amplamente aceita de que a queda na f_H em hipóxia melhoraria a transferência de gases pelas lamelas branquiais também não foi comprovada (Short et al. 1979; Perry e Desforges 2006; McKenzie et al. 2009; Iversen et al. 2010a). Surgem assim, outras possibilidades para a função do reflexo bradicárdico com foco na sobrevivência do próprio miocárdio.

O coração dos peixes está contido dentro do pericárdio e é formado por quatro câmaras dispostas em série: o seio venoso, o átrio, o ventrículo e o bulbo arterioso nos teleósteos, ou cone arterioso nos elasmobrânquios (Satchell 1991) (Figura 15). Entre as câmaras cardíacas, o ventrículo é o principal responsável em aumentar a energia cinética do sangue com 58-85 % do peso do coração (Satchell 1991). O miocárdio ventricular dos peixes pode ser composto apenas por um arranjo de fibras musculares formando trabéculas (Esponjosa), ou apresentar uma camada exterior (Compacta) envolvendo a camada esponjosa (Farrell e Jones 1992). A grande variabilidade interespecífica do coração de peixes se deve à variação no desenvolvimento de cada camada, compacta e esponjosa, e ao padrão de vascularização do tecido. Assim, o ventrículo dos peixes pode ser classificado em quatro subtipos como mostrado na Figura 19 (Davie e Farrell 1991).

Como muitas espécies de peixes não apresentam sistema coronariano (coração do tipo I), o fornecimento de O_2 para o miocárdio depende apenas da PO_2 do sangue venoso no lúmen do átrio e do ventrículo, que é drasticamente reduzida em hipóxia (Farrell 1993). Contudo, mesmo naquelas espécies em que o miocárdio é suprido com sangue arterial em situações de hipóxia severa e/ou prolongada, a PO_2 arterial pode cair a níveis críticos comprometendo as funções cardíacas.

Glass et al. (1991) questionaram a bradicardia hipóxica como uma resposta reflexa ou uma disfunção cardíaca, ou ambas, devido à isquemia do miocárdio. Assim como a elevação na \dot{V}_G , a bradicardia também é um reflexo originado da estimulação de quimiorreceptores de O_2 (Satchell 1991). Contudo, como visto a seguir, verificou-se em várias espécies evidências de sofrimento de miocárdios com e sem irrigação coronariana durante a hipóxia.

Por meio da análise eletrocardiográfica de animais em hipóxia foram verificadas alterações na onda T na traíra, *Hoplias malabaricus*, no trairão, *Hopliius lacerdae*, no pacu, na carpa e no tambaqui (Glass et al. 1991; Rantin et al. 1993; Rantin et al. 1995; Corrêa 1996).

Estes resultados indicam alterações na direção de repolarização ventricular em hipóxia severa, provavelmente, devido a uma condição de isquemia cardíaca afetando os miócitos que têm por finalidade dar início ao processo de repolarização ventricular (Guerra 1992).

Além de alterações na onda T, também foram observadas extra-sístoles na carpa em hipóxia (Glass et al. 1991) e arritmias na dourada-australiana, *Pagrus auratus* (Jansen et al. 2010) que são indicativos de isquemia do miocárdio. Outra evidência do efeito direto da hipóxia no coração foi verificada no bacalhau do Atlântico que apresentou bradicardia em hipóxia, mesmo após bloqueio colinérgico (McKenzie et al. 2009).

Estes trabalhos demonstrando indícios de sofrimento do miocárdio de peixes em hipóxia, associados à falta de evidência de que a bradicardia hipóxica melhora a transferência de gases pelas brânquias, fortalecem a hipótese de que esta redução na f_H é um reflexo com função de proteção do miocárdio (Farrell 2007).

Segundo Farrell (2007) a bradicardia hipóxica pode ser considerada uma resposta de proteção ao miocárdio por diminuir a atividade e consumo energético deste tecido. Além disto, o maior tempo de permanência do sangue no lúmen do coração durante a diástole aumenta a difusão do O_2 do sangue para os miócitos. Portanto, provavelmente, a bradicardia promove maior proteção àqueles miocárdios que não apresentam suprimento coronariano. Contudo, este reflexo também melhora o transporte de O_2 no miocárdio de espécies com sistema coronariano, uma vez que o fluxo de sangue nas coronárias (comprometido durante a sístole pela compressão dos vasos) é maior durante a diástole (Axelsson e Farrell 1993; Gamperl et al. 1995), que tem seu período estendido na hipóxia. A importância da irrigação coronariana foi evidenciada no salmão-rei, *Oncorhynchus tshawytscha*, em que o desempenho natatório reduziu em 30% quando o fluxo sanguíneo nas coronárias foi interrompido (Farrell e Stefenssen 1987).

Na maioria dos teleósteos a força de contração do coração diminui com aumentos da f_H , resultado de um efeito força-frequência negativo (Shiels et al. 2002). Esta relação negativa entre a f_H e a força de contração pode estar relacionada ao tempo disponível para o influxo de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma (Shiels et al. 2002) e para interação deste íon com o sistema contrátil (Gesser et al. 1997). Assim, a bradicardia hipóxica melhora a contratilidade cardíaca compensando os possíveis efeitos diretos da hipóxia na contração miocárdica (Farrell 2007). Além disto, durante a hipóxia, a bradicardia associada à maior resistência periférica permite o maior enchimento do ventrículo aumentando o estiramento das fibras cardíacas. O maior comprimento dos miofilamentos também melhora a contratilidade do miocárdio (mecanismo

de Frank-Starling) induzindo grandes aumentos do V_s . Em algumas espécies esta resposta é suficiente para manter ou até elevar o débito cardíaco apesar da queda na f_H (Farrell e Jones 1992).

Assim como no tambaqui, em muitos teleósteos oxirreguladores a bradicardia hipóxica aparece em tensões de O_2 próximas ou abaixo da $P_{crit}O_2$ da espécie (Rantin et al. 1993; Rantin et al. 1995; Corrêa 1996; Iversen et al. 2010a). A ativação do reflexo bradicárdico apenas quando o animal perde a capacidade de regular a $\dot{V}O_2$ é um forte indício de que a bradicardia possui função de proteção do miocárdio quando o metabolismo aeróbico deste tecido fica comprometido. Além disto, a PO_2 que desencadeia a bradicardia está intimamente relacionada à tolerância à hipóxia espécie-específica. No tambaqui e na traíra que são espécies altamente tolerantes à hipóxia, a bradicardia se torna significativa em PO_2 próximas a 30 mmHg, (Rantin et al. 1993; Corrêa 1996). Já no dourado, *Salminus maxillosos*, que vive em ambientes de corredeira bem oxigenados e é menos tolerante à hipóxia, a bradicardia aparece em PO_2 próximas a 70 mmHg (Souza et al. 2001).

Estudos com o tambaqui mostraram que esta espécie apresenta um miocárdio ventricular predominantemente esponjoso com artérias coronárias na superfície e entre as fibras cardíacas da camada compacta (Simões et al. 2002). Portanto, mais semelhante ao ventrículo do tipo II (Figura 19). Porém, apesar da presença de coronárias, tambaquis expostos à hipóxia apresentaram alterações eletrocardiográficas na onda T (Corrêa 1996), indicando um possível efeito direto da hipóxia no miocárdio como citado anteriormente.

Já em experimentos sem acesso à superfície, o tambaqui apresentou reversão da bradicardia hipóxica após aproximadamente 5 h de exposição à PO_2 de 10 mmHg e retomando os valores normóxicos de f_H na sexta hora de hipóxia (Florindo et al. 2006). Esta reversão da bradicardia mostra que as alterações na onda T de tambaquis em hipóxia (Corrêa 1996) ocorrem, provavelmente por uma disfunção miocárdica transitória e não permanente; uma vez que os animais conseguiram restabelecer a f_H mesmo em hipóxia. Os mecanismos que permitem esta recuperação da f_H não foram investigados. Contudo é possível especular que a ativação de respostas de médio e longo prazo à hipóxia tal como o aumento nas concentrações de hemoglobina (Affonso et al. 2002), provavelmente favorecem o desempenho cardíaco nesta espécie tornando as possíveis vantagens da bradicardia hipóxica ao miocárdio desnecessárias.

Também foi verificado que no tambaqui exposto a 6 h de hipóxia (20 mmHg) com acesso à superfície aquática, o desenvolvimento da ASR preveniu a bradicardia hipóxica,

provavelmente, por aumentar a $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ a níveis acima dos necessários para a ativação do reflexo bradicárdico (Rantin e Kalinin 1996).

Baseado nestes achados com o tambaqui é possível especular que a bradicardia hipóxica protege o miocárdio nesta espécie, por meio dos mecanismos propostos anteriormente neste tópico, apenas quando o animal não consegue regular eficientemente a captação de O_2 . Estas situações ocorrem em PO_2 abaixo da $P_{\text{crit}}\text{O}_2$ quando não há acesso à superfície aquática. Deste modo, no ambiente natural, quando o tambaqui tem dificuldade em realizar ASR devido à presença de macrófitas no corpo d'água (Saint-Paul e Soares 1987) ou quando há presença de predadores terrestres, os possíveis benefícios da bradicardia hipóxica ao miocárdio se tornam particularmente vantajosos.

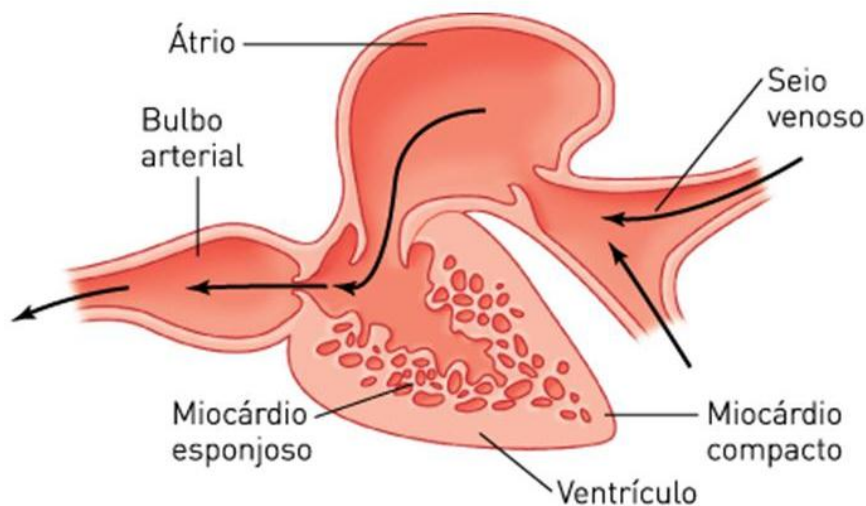


Figura 18. Esquema representativo do coração de um teleósteo. Detalhe para o Miocárdio Compacto e Esponjoso (Adaptado de Farrell e Jones 1992).

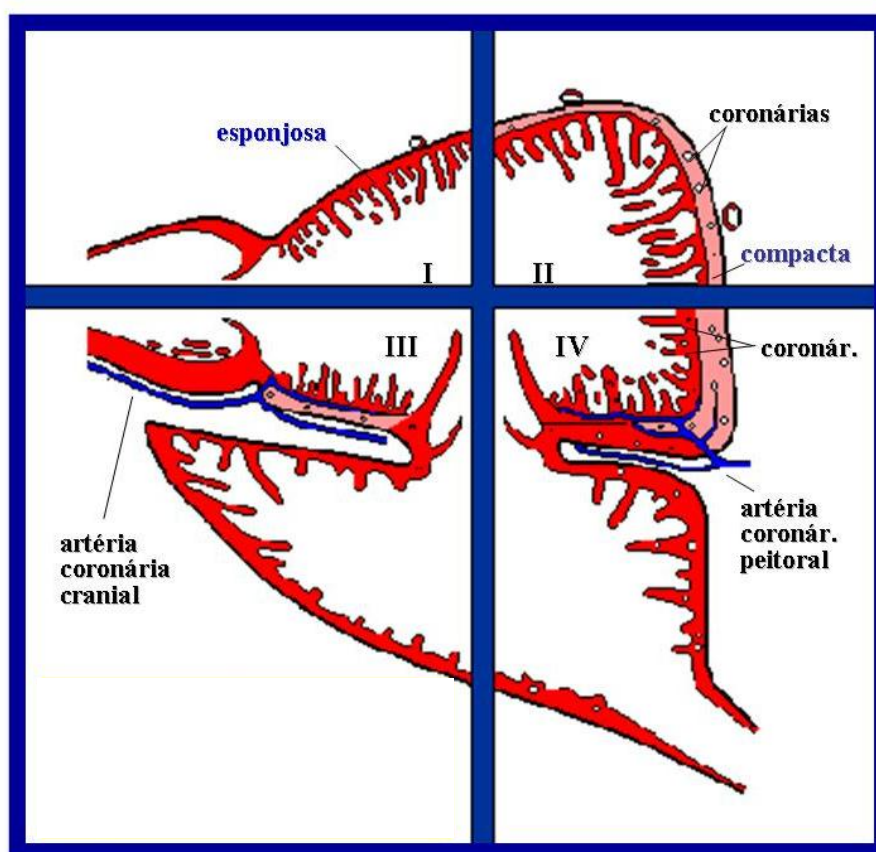


Figura 19. Ilustração esquemática das principais características que distinguem os quatro tipos de ventrículo de peixes. O Tipo I apresenta apenas a camada esponjosa sem capilares sanguíneos no músculo cardíaco. O Tipo II é caracterizado por duas camadas (esponjosa e compacta) com circulação coronária apenas na camada compacta. O Tipo III é semelhante ao II, mas apresenta coronárias nas duas camadas. O Tipo IV apresenta uma espessa camada compacta com mais capilares coronários. A circulação coronária, independente do tipo, é derivada da circulação cranial e da circulação peitoral em algumas espécies (Adaptado de Davie e Farrell 1991).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que no tambaqui, *Colossoma macropomum*:

- O tônus colinérgico cardíaco é elevado em normóxia; aumenta em hipóxia, induzindo a bradicardia e reduz na recuperação, permitindo a elevação na f_H .
- Tanto a atropina quanto a vagotomia são igualmente eficientes em inibir a bradicardia hipóxica.
- Alterações na f_H , provavelmente, não melhoram a transferência de O_2 pelas brânquias em normóxia, hipóxia ou na recuperação.
- A inibição do tônus parassimpático cardíaco por ambos os métodos (atropina e vagotomia) não interfere nas respostas respiratórias à hipóxia e subsequente período de recuperação.

6. REFERÊNCIAS

- Affonso EG, Polez VLP, Corrêa CF, Mazon AF, Araujo MRR, Moraes G (2002) Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp Biochem Physiol C* 133:375–82.
- Almeida-Val VMF, Gomes ARC, Lopes NP (2006) Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (eds) *Fish Physiology: The Physiology of Tropical Fishes*, vol 21. Academic Press, San Diego, pp 443-500.
- Almeida-Val VMF, Val AL, Hochachka PW (1993) Hypoxia tolerance in amazon fishes: status of an under-explored biological “goldmine”. In: Hochachka PW, Lutz PL, Sick T, Rosenthal M, van den Thillart G (eds) *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press, Boca Raton, pp 435–445.
- Altimiras J, Larsen E (2000) Non-invasive recording of heart rate and ventilation rate in rainbow trout during rest and swimming. *Fish go wireless! J Fish Biol* 57:197–209.
- Altimiras J, Aissaoui A, Tort L, Axelsson M (1997) Cholinergic and Adrenergic Tones in the Control of Heart Rate in Teleosts. How Should They be Calculated? *Comp Biochem Physiol A* 118:131–139.
- Axelsson M, Davison W, Forster ME, Farrell AP (1992) Cardiovascular responses of the red-blooded antarctic fishes *Pagothenia bernacchii* and *P. borchgrevinki*. *J Exp Biol* 167:179–201.
- Axelsson M, Driedzic WR, Farrell AP, Nilsson S (1989) Regulation of cardiac output and gut blood flow in the sea raven, *Hemitripterus americanus*. *Fish Physiol Biochem* 6:315–326.
- Axelsson M, Ehrenström F, Nilsson S (1987) Cholinergic and adrenergic influence on the teleost heart in vivo. *J Exp Biol* 46:179–186.
- Axelsson M, Farrell AP (1993) Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Am J Physiol* 264:963–971.
- Barrett DJ, Taylor EW (1984) Changes in heart rate during progressive hyperoxia in the dogfish *Scyliorhinus canicula* L.: evidence for a venous oxygen receptor. *Comp Biochem Physiol A* 78:697–703.
- Black CM (2000) Routes of Administration for Chemical Agents. In: Ostrander GK (ed) *Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Fish*. Academic Press, Londres, pp 529-542.
- Burleson ML, Milsom WK (1993) Sensory receptors in the first gill arch of rainbow trout. *Resp Physiol* 93:97–110.
- Burleson ML, Smatresk NJ (1990) Evidence for two oxygen sensitive chemoreceptor loci in Channel catfish. *Physiol Zool* 63:208-221.

- Burleson ML, Smatresk, NJ, Milsom, WK (1992) Afferent Inputs Associated with Cardioventilatory Control in Fish. In: Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP (eds) Fish Physiology: The Cardiovascular System, vol 12A. Academic Press, San Diego, pp 389-426.
- Butler PJ, Taylor EW (1971) Response of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L) to slowly induced and rapidly induced hypoxia. *Comp Biochem Physiol A* 39:307-323.
- Campbell HA (2004) The use of power spectral analysis to determine cardiorespiratory control in the short-horned sculpin *Myoxocephalus scorpius*. *J Exp Biol* 207:1969-1976.
- Campbell HA, Egginton S (2007) The vagus nerve mediates cardio-respiratory coupling that changes with metabolic demand in a temperate nototheniid fish. *J Exp Biol* 210:2472-80.
- Corrêa CF (1996) Efeitos das reduções graduais do oxigênio ambiental sobre a função cardio-respiratória de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Teleostei, Serrasalmidae). Dissertação - Universidade Federal de São Carlos.
- Davie PS, Daxboeck C (1982) Effect of pulse pressure on fluid exchange between blood and tissues in trout gills. *Can J Zool* 60:1000-1006.
- Davie PS, Farrell AP (1991) The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. *Can J Zool* 69: 1993-2001.
- Davie PS, Farrell AP, Franklin CE (1992) Cardiac performance of an isolated eel heart: effects of hypoxia and responses to coronary artery perfusion. *J Exp Zool* 262:113-21.
- Farrell AP (1993) Cardiac output in fish: Regulation and limitations. In: Bicudo E (ed) The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations to Environment and Mode of Life. CRC Press Inc., Boca Raton, pp 208-214.
- Farrell AP (2007) Tribute to P. L. Lutz: a message from the heart--why hypoxic bradycardia in fishes? *J Exp Biol* 210:1715-25.
- Farrell AP, Jones DR (1992) The heart. In: Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP (eds) Fish Physiology: The Cardiovascular System, vol 12A. Academic Press, Londres, pp 1-88.
- Farrell AP, Sobin SS, Randall DJ, Crosby S (1980) Intralamellar blood flow patterns in fish gills. *Am J Physiol* 239: 428-436.
- Farrell AP, Steffensen JF (1987) Coronary Ligation Reduces Maximum Sustained Swimming Speed In Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Comp Biochem Physiol* 87:35-37.
- Fernandes MN, Barrionuevo WR, Rantin FT (1995) Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. *J Fish Biol* 46: 123-133.

- Fernandes MN, Rantin FT (1987) Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental reductions of dissolved oxygen. *Bol Fisiol Anim* 11: 51-60.
- Fernandes MN, Rantin FT (1989) Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. *J Fish Biol* 35:509–519.
- Florindo LH, Leite CAC, Kalinin AL, Reid SG, Milsom WK, Rantin FT (2006) The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. *J Exp Biol* 209:1709–15.
- Florindo LH, Reid SG, Kalinin AL, Milsom WK, Rantin FT (2004) Cardiorespiratory reflexes and aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): acute responses to hypercarbia. *J Comp Physiol B* 174:319–28.
- Fritsche R, Nilsson S (1989) Cardiovascular responses to hypoxia in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J Exp Biol* 48: 153-160.
- Fritsche R, Nilsson S (1993) Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. In: Rankin JC, Jensen F (eds) *Fish Ecophysiology*. Springer Netherlands, pp 180–206.
- Fry FEJ (1971) The effect of environmental factors on the physiology of fish. In: Hoar WS, Randall DJ (eds) *Fish physiology*. Academic Press, Nova York, pp 1-98.
- Gamperl AK, Axelsson M, Farrell AP (1995) Effects of swimming and environmental coronary blood flow in rainbow trout in hypoxia. *Am J Physiol* 269:1258–1266.
- Gesser H, Driedzic WR, Rantin FT, Freitas JC (1997) Ca²⁺ regulation of heart contractility in *Octopus*. *J Comp Physiol B* 167: 474-480.
- Gilmour KM, Milsom WK, Rantin FT, Reid SG, Perry SF (2005) Cardiorespiratory responses to hypercarbia in tambaqui, *Colossoma macropomum*: chemoreceptor orientation and specificity. *J Exp Biol* 208:1095–107.
- Gilmour KM, Perry SF (2007) Branchial chemoreceptor regulation of cardiorespiratory function. In: Hara T, Zielinski B (eds) *Fish Physiology: Sensory systems neuroscience*. Academic Press, San Diego, pp 97-120.
- Glass ML, Rantin FT, Verzola RMM, Fernandes MN, Kalinin AL (1991) Cardio-respiratory synchronization and myal function in hypoxic carp, *Cyprcardiinus carpio* L. *J Exp Biol* 39:143–149.
- Graham JB (1997) *Air-Breathing fishes: evolution, diversity and adaptation*. Academic Press, San Diego.
- Gräns A, Olsson C, Pitsillides K, Nelson HE, Cech JJ, Axelsson M (2010) Effects of feeding on thermoregulatory behaviours and gut blood flow in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using biotelemetry in combination with standard techniques. *J Exp Biol* 213:3198–206.

- Guerra CDR (1992) Respostas cardio-respiratórias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holberg, 1887), às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente. Dissertação - Universidade Federal de São Carlos.
- Hughes GM (1973) Respiratory Responses to Hypoxia in Fish. *Am Zool* 13:475–489.
- Hughes GM, Alberts C, Muster D, Gotz KH (1983) Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20° C and the effects of hypoxia. *J Fish Biol* 22: 613-628.
- Hughes GM, Knights B (1968) The effect of loading the respiratory pumps on the oxygen consumption of *Callionymus lyra*. *J Exp Biol* 49:603–615.
- Hughes GM, Saunders RL (1970) Responses of the respiratory pumps to hypoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Exp Biol* 53:539–545.
- Iversen NK, Dupont-Prinet A, Findorf I, McKenzie DJ, Wang T (2010b) Autonomic regulation of the heart during digestion and aerobic swimming in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol A* 156:463–8.
- Iversen NK, McKenzie DJ, Malte H, Wang T (2010a) Reflex bradycardia does not influence oxygen consumption during hypoxia in the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Comp Physiol B* 180:495–502.
- Janssen GJA, Jerrett AR, Black SE, Forster ME (2010) The effects of progressive hypoxia and re-oxygenation on cardiac function, white muscle perfusion and haemoglobin saturation in anaesthetised snapper (*Pagrus auratus*). *J Comp Physiol B* 180:503–10.
- Kalinin AL, Rantin FT, Fernandes MN, Glass ML (1996) Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (eds) *Physiology and Biochemistry of Fishes of the Amazon*. Editora do INPA, Manaus, pp 191-202.
- Kalinin AL, Severi W, Guerra C, Costa M, Rantin FT (2000) Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus* during normoxia and exposed to graded hypoxia. *Rev Bras Biol* 60: 249-25.
- Kramer DL (1983) The evolutionary ecology of respiratory mode in fishes: an analysis based on the costs of breathing. *Environ Biol Fishes* 9:145–158.
- Kramer DL, Lindsey CC, Stevens ED (1978) The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. *Can J Zool* 56:717-729.
- Laurent P, Rouzeou JD (1972) Afferent neural activity from the pseudobranch of teleosts: Effects of PO₂, pH, pressure osmotic and Na⁺ ions. *Resp Physiol* 14:307-331.

- Leite CAC, Florindo LH, Kalinin AL, Milsom WK, Rantin FT (2007) Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. J Comp Physiol A 193:1001–11.
- Leite CAC, Taylor EW, Guerra CDR, Florindo LH, Belão T, Rantin FT (2009) The role of the vagus nerve in the generation of cardiorespiratory interactions in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. J Comp Physiol A 195:721–31.
- Lomholt JP, Johansen K (1979) Hypoxia acclimation in carp- How it affects O₂ uptake, ventilation, and O₂ extraction from water. Physiol Zool 52:38–49.
- Mandic M, Lau GY, Nijjar MMS, Richards JG (2008) Metabolic recovery in goldfish: A comparison of recovery from severe hypoxia exposure and exhaustive exercise. Comp Biochem Physiol 148:332–8.
- Maricondi-Massari MM, Kalinin AL, Glass ML, Rantin FT (1998) The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ECG-waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J Therm Biol 23: 283-290.
- Martins ND, Colvara WA, Rantin FT, Kalinin AL (2011) Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Chemosphere 84:154–9.
- McKenzie DJ, Bursleson ML, Randall DJ (1991) The effects of branchial denervation and pseudobranch ablation on cardioventilatory control in an air-breathing fish. J Exp Biol 161: 347-365.
- McKenzie DJ, Campbell HA, Taylor EW, Micheli M, Rantin FT, Abe AS (2007) The autonomic control and functional significance of the changes in heart rate associated with air breathing in the jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. J Exp Biol 210:4224–32.
- McKenzie DJ, Skov PV, Taylor EW, Wang T, Steffensen JF (2009) 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 153:332–8.
- McKenzie DJ, Taylor EW, Bronzi P, Bolis CL (1995) Aspects of cardioventilatory control in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). Resp Physiol 100:45–53.
- McKenzie DJ, Taylor EW, Dalla Valle AZ, Steffensen JF (2002) Tolerance of acute hypercapnic acidosis by the European eel (*Anguilla anguilla*). J Comp Physiol B 172:339–46.
- Milsom WK (1996) Control of breathing in fish: Role of chemoreceptors. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (eds) Physiology and Biochemistry of the Amazon. Editora do INPA, Manaus, pp 359-377.
- Milsom WK, Brill RW (1986) Oxygen sensitive afferent information arising from the first gill arch of yellow fin tuna. Resp Physiol 66: 193-203.

- Milsom WK, Reid SG, Rantin FT, Sundin L (2002) Extrabranhial chemoreceptors involved in respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). *J Exp Biol* 205:1765–74.
- Nilsson S, Holmgren S, Fange R (1983) Autonomic nerve functions in fish. In: Rankin JC, Ptcher TJ, Duggan RT (eds) *Controll process in fish physiology*. Springer, Nova York, pp 1-22.
- Olle CD (2007) Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR®) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus*. Tese, Universidade Federal de São Carlos.
- Perry SF, Desforges PR (2006) Does bradycardia or hypertension enhance gas transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? *Comp Biochem Physiol A* 144:163–72.
- Perry SF, Jonz MG, Gilmour KM (2009) Oxygen Sensing And The Hypoxic Ventilatory Response. In: Richards JG, Farrell AP, Brauner, CJ (eds) *Hypoxia*. Academic Press, pp 193–253.
- Perry SF, Reid SG (2002) Cardiorespiratory adjustments during hypercarbia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are initiated by external CO₂ receptors on the first gill arch. *J Exp Biol* 205:3357–65.
- Randall DJ (1982) The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. *J Exp Biol* 100:275–288.
- Randall DJ, Bueggren W, French K (1997) Gas exchange and acid-base balance. In: Randall DJ, Bueggren W, French K (eds) *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W. H. Freeman and Co, Nova York, pp 517-570.
- Rantin FT, Glass ML, Kalinin AL, Verzola RMM, Fernandes MN (1993) Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias mulubaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. *Envi Biol Fishes* 36: 93–97.
- Rantin FT, Kalinin AL (1996) Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (eds) *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Editora do INPA, Manaus, pp 169-180.
- Rantin FT, Kalinin AL, Glass ML, Fernandes MN (1992) Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J Fish Biol* 41:805–812.
- Rantin FT, Kalinin AL, Guerra CDR, Maricondi-Massari M, Verzola RMM (1995) Electrocardiographic characterization of myocardial function in normoxic and hypoxic teleosts. *Braz J Med Biol Res* 2: 1277-1289.
- Reid SG, Perry SF, Gilmour KM, Milsom WK, Rantin FT (2005) Reciprocal modulation of O₂ and CO₂ cardiorespiratory chemoreflexes in the tambaqui. *Resp Physiol Neurobiol* 146:175–94.

- Reid SG, Sundin L, Milsom WK (2006) The Cardiorespiratory System in Tropical Fishes: Structure, Function and Control. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (eds) Fish physiology: The physiology of tropical fishes, vol 21. Academic Press, San Diego, pp 225-265.
- Richards JD, Farrell AP, Brauner CJ (2009) Fish Physiology: Hypoxia, vol 27. San Diego, Academic Press.
- Saint-paul U (1984) Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminidae. *Envi Biol Fishes* 11:53–62.
- Saint-Paul U (1988) Diurnal routine O₂ consumption at different O₂ concentrations by *Colossoma macropomum* and *Colossoma brachypomum* (Teleostei: serrasalmidae). *Comp Biochem Physiol A* 89:675–682.
- Saint-paul U, Soares GM (1987) Diurnal distribution and behavioral responses of fishes to extreme hypoxia in an Amazon floodplain lake. *Envi Biol Fishes* 20:91–104.
- Satchell GH (1961) The response of the dogfish to anoxia. *J Ex Biol* 38:531–543.
- Satchell GH (1991) Physiology and form of fish circulation. Cambridge: Cambridge University Press.
- Saunders RL, Sutterlin AM (1971) Cardiac and respiratory response to hypoxia in the sea raven, *Hemipterus americanus*, an investigation of possible control mechanism. *J Fisheries Res Board Can* 28: 491–503.
- Schmidt-Nielsen K (2002) Respiração. In: Schmidt-Nielsen K (ed) Fisiologia animal: Adaptação e meio ambiente. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda., pp 5-61.
- Schwerte T, Prem C, Mairösl A, Pelster B (2006) Development of the sympatho-vagal balance in the cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) characterized by power spectrum and classical signal analysis. *J Exp Biol* 209:1093–100.
- Shiels HA, Vornanen M, Farrell AP (2002) The force-frequency relationship in fish hearts--a review. *Comp Biochem Physiol A* 132:811–26.
- Short S, Taylor EW, Butler PJ (1979) The Effectiveness of Oxygen Transfer During Normoxia and Hypoxia in the Dogfish (*Scyliorhinus canicula* L) Before and After Cardiac Vagotomy. *J Comp Physiol B* 132:289–295.
- Silva JWB, Chacon, JO (1983) O centro de pesquisas ictiológicas (Pentecoste, Ceará, Brasil), suas instalações e seus quatro primeiros anos de funcionamento (1973-1977). Fortaleza, Departamento nacional de Obras contra as secas.
- Simões K, Vicentini CA, Orsi AM, Cruz C (2002) Características morfológicas do miocárdio ventricular de Tambaqui (*Colossoma macropomum*; Characidae, Cuvier, 1818) *Braz J Vet* 39:74–77.

- Smatresk NL, Burtleson ML, Azizi SQ (1986) Chemoreflexive responses to hypoxia and NaCN in longnose gar: evidence for two chemoreceptive loci. *Am J Physiol* 251: 116-125.
- Smith FM, Jones DR (1978) Localization of receptors causing hypoxic bradycardia in trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Zool* 56: 1260-1265.
- Souza RHS, Soncini R, Glass L, Sanches JR, Rantin FT (2001) Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. *J Comp Physiol B* 171: 483-489.
- Stecyk JAW, Farrell AP (2006) Regulation of the Cardiorespiratory System of Common Carp (*Cyprinus carpio*) during Severe Hypoxia at Three Seasonal. *Physiol Biochem Zool* 614-627.
- Sundin L, Nilsson GE (1997) Neurochemical mechanisms behind gill microcirculatory responses to hypoxia in trout: in vivo microscopy study. *The American journal of physiology* 272:R576-85.
- Sundin L, Nilsson GE, Block M, Löfman CO (1995) Control of gill filament blood flow by serotonin in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol* 268:R1224-9.
- Sundin L, Reid SG, Rantin FT, Milsom WK (2000) Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *J Exp Biol* 203:1225-39.
- Taylor EW (1992) Nervous Control of the Heart and Cardiorespiratory Interactions. In: Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP (eds) *The Cardiovascular System*. Academic Press, pp 343-387.
- Taylor EW, Barrett DJ (1985) Evidence of a respiratory role for the hypoxic bradycardia in the dogfish *Scyliorhinus canicula* L. *Comp Biochem Physiol A* 80:99-102.
- Taylor EW, Leite CAC, Florindo LH, Belão T, Rantin, FT (2009) The basis of vagal efferent control of heart rate in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *J Exp Biol* 212: 906-913.
- Taylor EW, Short S, Butler PJ (1977) The role of the cardiac vagus in the response of the dogfish *Scyliorhinus canicula* to hypoxia. *J Exp Biol* 70:57-75.
- Val AL, Almeida-Val VMF (1995) *Zoophysiology: Fishes of the Amazon and Their Environment: Physiological and Biochemical Aspects*. Springer Verlag, Heidelberg
- van Ginneken V, van Den Thillart G, Addink A, Erkelens C (1995) Fish muscle energy metabolism measured during hypoxia and recovery : an in vivo ³¹P-NMR study. *Am J Physiol* 268:1178-87.
- Virani NA, Rees BB (2000) Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comp Biochem Physiol A* 126:397-405.

APÊNDICE A – Representações gráficas das respostas cardiorrespiratórias dos peixes do grupo 2 - Controles à hipóxia e recuperação subsequente.

Colunas pretas indicam grupo Ctr2; colunas brancas indicam grupo Salina e colunas cinza indicam grupo falso-operados. (*) indica diferença significativa dos valores de normóxia. Valores apresentados como média ± E.P.M., ($P \leq 0,05$).

