



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS/UFSCAR (São Carlos) – UNESP (Araraquara)

THIAGO DE CAMPOS BELÃO

**“LOCALIZAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS
QUIMIORRECEPTORES DE O₂ BRANQUIAIS E O CONTROLE NEURAL
PERIFÉRICO DOS REFLEXOS CARDIORRESPIRATÓRIOS DE UM
TELEÓSTEO DE RESPIRAÇÃO AÉREA, O BAGRE-AFRICANO, *CLARIAS
GARIEPINUS.*”**

São Carlos – SP

Junho de 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FISIOLÓGICAS/UFSCAR (São Carlos) – UNESP (Araraquara)

**“LOCALIZAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS
QUIMIORRECEPTORES DE O₂ BRANQUIAIS E O CONTROLE NEURAL
PERIFÉRICO DOS REFLEXOS CARDIORRESPIRATÓRIOS DE UM
TELEÓSTEO DE RESPIRAÇÃO AÉREA, O BAGRE-AFRICANO, *CLARIAS
GARIEPINUS.*”**

THIAGO DE CAMPOS BELÃO

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Concentração em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin

São Carlos – SP

Junho de 2014

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

B426Ld

Belão, Thiago de Campos.

Localização, distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais e o controle neural periférico dos reflexos cardiorrespiratórios de um teleósteo de respiração aérea, o bagre-africano, *Clarias gariepinus* / Thiago de Campos Belão. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 111 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. Quimiorreceptores de oxigênio. 3. Variabilidade da frequência cardíaca. 4. Respiração aérea. 5. Hipóxia. 6. Injeções de cianeto de sódio. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

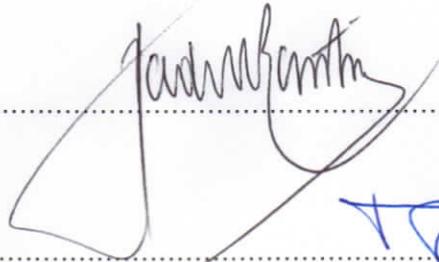
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Thiago de Campos Belão

Dia 30/06/2014

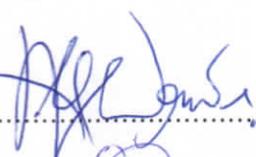
Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin.....



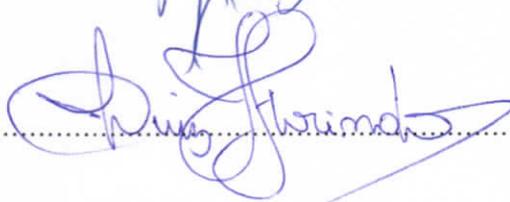
Prof. Dr. David J. McKenzie.....



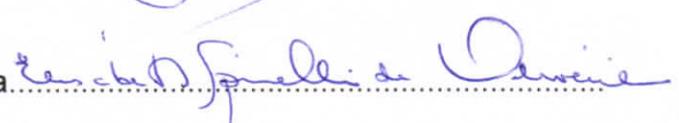
Prof. Dr. John Campbell McNamara.....



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



Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira.....





Este trabalho foi realizado no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos, e teve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2010/13108-6).

Dedicatória

Dedico este trabalho,

A Deus

*Que todo este trabalho seja para honra e glória de Deus, que é minha fonte eterna de
inspiração e amparo em todos os momentos da minha vida;*

“Que todos os dias Deus cumpra Sua promessa de dar “farta provisão de sabedoria a todos os que Lhe pedem” (Tiago 1:5), para descobrir o que é correto, vontade para elegê-lo e a força para que seja duradouro.”

À minha amada esposa

Por estar sempre ao meu lado, apoiando e incentivando-me em todos estes anos de estudo, sempre com muito carinho, paciência, compreensão e amor o que me faz sentir realizado.

Eu te amo Sheylla.

“Há momentos na vida em que se deveria calar... e deixasse que o sentimento falasse ao coração; pois há sentimentos que a linguagem não expressa... e emoções que as palavras não sabem traduzir...”

Aos meus pais, Antonio e Zenilda, e familiares maravilhosos

Uns mais de perto e outros mais de longe, às vezes sem saber sobre minha pesquisa, mas que invariavelmente estiveram aconselhando-me em todas decisões importantes para minha vida profissional.

Amo todos vocês.

“Ajudar a crescer não é assumir as necessidades dos outros, mas apoiá-los e aconselhá-los para que as assumam e tomam posição acertada.”

Agradecimento Especial

Ao meu orientador Dr. Francisco Tadeu Rantin. Pela competência profissional, orientação objetiva e presente desde minha iniciação científica, e pelo belo exemplo de humanidade admirável com todos que convive. Por oferecer oportunidades de conhecer novas linhas de pesquisa que contribuíram, e muito, para meu crescimento profissional. Também pelas condições excelentes de trabalho e confiança em meu trabalho, além dos diversos conselhos em minha carreira profissional.

“Os verdadeiros sábios se dão a conhecer pelos bons princípios de seus atos, pela intocável moral de suas atitudes e pelo fato de servirem de exemplo dos ensinamentos que transmitem”.

Eduardo Lambert

Agradecimentos

À Comissão de Pós-Graduação do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UNESP/UFSCar na pessoa do coordenador Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez pela oportunidade de realizar este trabalho na instituição.

À todos os docentes do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UNESP/UFSCar que através da transmissão de conhecimento pelas disciplinas e/ou conselhos tiveram grande relevância em muitas partes deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (Processo 2010/13108-6) que me deu condições de realizar este projeto e concluir mais uma etapa da minha busca por conhecimento.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas - UFSCar, principalmente ao amigo querido Seu Ângelo, pela disposição sempre presente em ajudar no que fosse necessário e, também, pela amigável convivência.

À secretaria de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, em especial ao Alexandre, pelo pronto atendimento aos pedidos e solicitações feitas.

Aos amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa: André G., Daniele, Diana, Eliton, Felipe, Juliana, Lucão, Marcelo, Natalia, Nathan, Rafael Z e Vivian, pela amizade, companheirismo e momentos alegres que passamos juntos.

Aos Profs. Dr. David J. McKenzie (Institut des Sciences de l'Evolution, Station Méditerranéenne de L'Environnement Littoral, Universidade de Montpellier – França) e Dr. John Fleng Steffensen (Marine Biological Section, Department of Biology in Helsingør, Universidade de Copenhague – Dinamarca) que proporcionaram oportunidades de colaboração e aprendizado em suas respectivas áreas da Fisiologia Comparada.

Aos amigos da Igreja Adventista do 7º Dia, dentre eles em especial Régis e família, Ricardo e família, Graziane e Mario, João Thiago e família, Carol e Enzo, Sarah e Lederson, Marcelo e Sandra, Paulo e Alessandro. Agradeço pela maravilhosa convivência, apoio e as orações a meu favor durante todo meu doutorado e vida em São Carlos.

À Piscicultura Polettini nas pessoas de Cesar e Daniel que sempre apoiaram os projetos científicos de nosso laboratório doando exemplares de bagres-africanos para a pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos.

“A experiência mostra que o sucesso é devido menos à habilidade que ao zelo. O vencedor é aquele que se entrega à busca de corpo e alma.”

CHARLES BUXTON

“Deus é o autor da ciência. As pesquisas científicas abrem ao espírito vasto campo de ideias e informações, habilitando-nos a ver Deus em Suas obras criadas. A ignorância pode tentar apoiar o ceticismo, apelando para a ciência; em vez de o sustentar, porém, a verdadeira ciência contribui com novas provas da sabedoria e do poder de Deus. Devidamente compreendidas, a ciência e a Palavra escrita concordam entre si, lançando luz uma sobre a outra. Juntas, conduzem-nos para Deus, ensinando-nos algo das sábias e benéficas leis por que Ele opera.”

ELLEN G. WHITE

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da Criação, seja animal ou vegetal, ninguém o ensinará a amar seu semelhante.”

ALBERT SCHWEITZER

RESUMO

O bagre-africano é um teleósteo de respiração bimodal com ABOs presentes nos 2^{os} e 4^{os} arcos branquiais. Como outros respiradores bimodais, o bagre-africano realiza ajustes cardiorrespiratórios para sobreviver em baixas PwO_2 . Estes são modulados por quimiorreceptores de O_2 branquiais que monitoram a PwO_2 e/ou PaO_2 . O presente estudo analisou a distribuição, localização e orientação dos quimiorreceptores de O_2 branquiais de *Clarias gariepinus*, seu controle sobre a função cardiorrespiratória e a modulação do controle autonômico do coração. Para isto, *C. gariepinus* foi dividido em dois grupos (controle – GC; experimental – GD, com ablação do 1^o par de arcos branquiais) e seus parâmetros cardiorrespiratórios foram analisados durante hipóxia *sem* e *com* acesso ao ar atmosférico, injeções internas e externas de NaCN e injeções de antagonistas do sistema autonômico. Durante hipóxia *sem* acesso ao ar os GC e GD elevaram os parâmetros respiratórios (f_R , V_T e \dot{V}_G). Porém, o GD apresentou-os superestimados desde normóxia, a fim de compensar a queda na extração de O_2 (EO_2) resultante da ablação dos 1^{os} arcos branquiais. Além disso, o decréscimo da EO_2 foi responsável pela diminuição da $\dot{V}O_2$, e, conseqüentemente, pelo aumento da PcO_2 de 61 mmHg para 79 mmHg, nos GC e GD, respectivamente. Ainda, o GD apresentou bradicardia semelhante ao GC, porém seus valores foram superestimados em todas as PwO_2 . Em hipóxia *com* acesso ao ar ambos os grupos demonstraram diminuição da f_R e da V_{AMP} nas últimas PO_2 devido principalmente a aumentos da f_{RA} no GC que compensaram a absorção de O_2 atmosférico. Todavia, no GD o aumento da f_{RA} foi atenuado pela ablação dos 1^{os} arcos branquiais. Além disso, ambos os grupos apresentaram bradicardia pré-RA (típica de respirador aquático) e taquicardia pós-RA (típica de respirador aéreo). Injeções externas e internas de NaCN causaram bradicardia nos GC e GD, enquanto as injeções internas aumentaram os parâmetros ventilatórios apenas no GC. Desta forma, conclui-se que *C. gariepinus* apresenta quimiorreceptores de O_2 branquiais, que modulam a f_H , distribuídos por todos arcos branquiais e que monitoram tanto a PwO_2 quanto a PaO_2 . Ao contrário, a modulação da f_R e V_{AMP} ocorre apenas por quimiorreceptores de O_2 do 1^o par de arcos branquiais e que monitoram apenas a PaO_2 . Ainda, injeções internas de NaCN elevaram mais a f_{RA} no GC que as externas, porém tiveram pouco efeito sobre a f_{RA} do GD. Assim, a f_{RA} é modulada principalmente por quimiorreceptores de O_2 dos 1^{os} arcos branquiais que, predominantemente, monitoram a PaO_2 . Injeções bloqueadoras do sistema autonômico do coração de *C. gariepinus* demonstraram que a modulação tanto da bradicardia pré-RA quanto da taquicardia pós-RA ocorre pela variação do tônus vagal colinérgico, sendo este tônus elevado na bradicardia, porém reduzido na taquicardia. O tônus adrenérgico, apesar de diminuir pós-RA, demonstra queda menor que a do tônus colinérgico, o que sugere um “reflexo adrenérgico” advindo da vasoconstrição periférica importante para os respiradores bimodais perfundirem melhor seus ABOs.

Palavras-chave: respirador bimodal, hipóxia, quimiorreceptor, frequência cardíaca, tônus adrenérgico e colinérgico.

ABSTRACT

The African sharptooth catfish *Clarias gariepinus* is a facultative air-breather with the ABO present in the 2nd and 3rd gill arches. Like other bimodal respirators, the African catfish presents cardiorespiratory adjustments to survive low PwO_2 . These regulations are modulated by gill O_2 chemoreceptors monitoring the PwO_2 and/or the PaO_2 . The present study analyzed the distribution, location and orientation of the branchial O_2 chemoreceptors of *C. gariepinus*, and the role of these receptors on the cardiorespiratory function and the modulation of the heart autonomic control. *C. gariepinus* were divided into two experimental groups (Control – GC, intact fish, and Experimental – GD, with the 1st gill arches excised) and their cardiorespiratory variables were analyzed during graded hypoxia *with* and *without* access to the atmospheric air, internal and external NaCN injections and autonomic nervous system antagonists. During hypoxia without access to air, both GC and GD showed increases in the respiratory variables (f_R , V_T and \dot{V}_G). However, the GD displayed higher values, since normoxia until severe hypoxia, to compensate the decrease in the EO_2 resulting from the ablation of the 1st gill arches. Furthermore, the decrease in EO_2 was responsible for the decrease in $\dot{V}O_2$ and, consequently, for the increase of the PcO_2 from 61 mmHg (GC) to 79 mmHg (GD). The GD featured bradycardia similar to GC, however, their values were higher in all PwO_2 . In hypoxia *with* access to air, both groups showed decrease in the f_R and V_{AMP} in the mores hypoxic tensions. This was attributed to the increases in the f_{RA} in GC which compensate the O_2 uptake. However, the GC increases in f_{RA} were attenuated by the excision of the 1st gill arches. Moreover, both groups developed bradycardia pre-RA (typical of aquatic respirator) and tachycardia post-RA (typical of aerial respirator). Internal and external NaCN injections caused bradycardia in both groups, while the internal injections increased the ventilator variables only in GC. Thus, it is concluded that *C. gariepinus* possess branchial O_2 chemoreceptors modulating the f_H distributed by all gill arches, monitoring both PwO_2 and PaO_2 . Conversely, f_R and V_{AMP} are modulated by receptors located in the 1st gill arches monitoring exclusively the PaO_2 . Furthermore, NaCN internal injections elevated more the f_{RA} in GC than the external ones, but with low effect on the f_{RA} of GD. Thus, the f_{RA} is primarily modulated by O_2 chemoreceptors located in the 1st gill arches monitoring, predominantly, the PaO_2 . Injections blocking the autonomic system to the heart showed that the modulation of pre-AB bradycardia and post-AB tachycardia occurs due to variations in the vagal cholinergic tonus, which is elevated during bradycardia and reduced during tachycardia. The adrenergic tonus, in spite of the decrease in the post-AB, is lower than the cholinergic, suggests a "reflex adrenergic" arising from the peripheral vasoconstriction, important to optimize the perfusion of the ABOs.

Keywords: bimodal breather, hypoxia, O_2 chemoreceptor, heart rate, adrenergic and cholinergic tones

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Ilustração da cascata de O_2 em normóxia (linha preta) e hipóxia (linha vermelha). Trajetória do O_2 desde a superfície funcional respiratória de um teleósteo até o meio intracelular (mitocôndria). P_eO_2 : pressão parcial de O_2 de entrada (câmara bucal); $P_{mit}O_2$: pressão parcial de O_2 na mitocôndria; **Hb- O_2** : reação de oxidação da hemoglobina. **Fonte:** Adaptado de HUGHES (1973) e RANTIN & MARINS (1984)..... 06
- FIGURA 2** – Células tipo I sensíveis ao O_2 do corpo carotídeo de mamíferos (células glomus). **Fonte:** Adaptado de RANDALL et al. (1997)..... 09
- FIGURA 3** – Modelo proposto da localização das prováveis células receptoras de O_2 nas brânquias dos peixes: rastros (**R**); lamela secundária (**L**); extremidades das lamelas (**FT**) e centro dos filamentos (**F**). **Fonte:** Adaptado de COOLIDGE et al. (2008)..... 10
- FIGURA 4** - **Modelo proposto para a detecção do O_2 pelas NECs nas brânquias dos peixes.** Diagrama esquemático ilustrando que as NECs branquiais podem responder ao decréscimo da PO_2 interna (corrente sanguínea) ou externa (água corrente). O decréscimo da PO_2 é detectado pela NEC e induz (1) uma inibição dos canais de K^+ transmembrana. Isto provoca (2) uma redução no potencial de membrana (V_m) e (3) uma ativação subsequente dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Um influxo de Ca^{+2} através da membrana (4) aumentará os níveis de Ca^{+2} intracelular, que (5) causará a secreção de um ou mais tipos de neurotransmissores das vesículas sinápticas citoplasmáticas para a fenda sináptica. Esta neurotransmissão das NECs pré-sinápticas (6) provocará a ativação de receptores sensoriais pós-sinápticos levando um aumento na taxa de disparos dos impulsos nervosos. **Fonte:** Adaptado de PERRY et al. (2009a)..... 11

- FIGURA 5** – Localização dos nervos cranianos de tambaqui, *colossoma macropomum*. Evidência para origem dos nervos na porção dorsal do encéfalo e a inervação dos arcos branquiais. **Fonte:** Adaptado de MILSOM et al., 2002..... 14
- FIGURA 6** – Exemplar de bagre-africano, *Clarias gariepinus* (BURCHELL, 1822) de 385 g..... 17
- FIGURA 7** – Peixe de respiração aérea generalizado “*Aeroespirichthys*” ilustrando os ABOs conhecidos atualmente, incluindo: superfície epitelial modificada dentro da cavidade bucal (**Br**); (**F**) faringeal; esofágica (**E**); opercular (**O**), como também nas brânquias (**B**), na pele (**S**), no estômago (**Es**) e no intestino (**I**). Espaços modificados incluem a câmara suprabranquial (**SB**), e sacos faringeais (SF). Câmaras modificadas incluem o ducto pneumático (**DP**) e pulmão ou bexiga natatória (**P-BN**). Projeções dentro destes espaços incluem o labirinto (**L**), dendritos (**D**) e leques branquiais (**LB**). **Fonte:** Adaptado de GRAHAM (1997)..... 18
- FIGURA 8** – Fotografias das estruturas morfo-funcionais de respiração de um bagre-africano, *Clarias gariepinus* (~ 1,7 kg). **A**– Vista dos arcos branquiais separados; **B** – Vista dos arcos branquiais unidos; **C** – Vista aproximada dos leques branquiais e do ABO; **LE** – lado esquerdo, **LD** – lado direito. **Fonte:** Adaptado de GLASS & RANTIN (2009)..... 19
- FIGURA 9** – Ilustração do sítio de ligação do cianeto inibindo o transporte de elétrons (e^-) na membrana interna da mitocôndria, impedindo a utilização do O_2 e produção de ATP..... 22
- FIGURA 10** – Exemplar de bagre-africano, *C. gariepinus*, anestesiado sobre a mesa cirúrgica com cânulas de polietileno implantadas na boca e nas bordas de ambos os opérculos e os eletrodos de ECG implantados próximo à cavidade cardíaca e na musculatura acima da linha lateral..... 28

- FIGURA 11** – Ilustração do sistema de respirometria utilizado na obtenção dos dados de $\dot{V}O_2$, \dot{V}_G , f_R , V_T e f_H 31
- FIGURA 12** – Ilustração do sistema experimental desenvolvido para animais de respiração aérea e utilizado na obtenção de dados de f_R , V_{AMP} , f_{RA} e f_H do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, exposto à hipóxia gradual..... 34
- FIGURA 13** – Efeito da redução das $P_{insp}O_2$ na tomada de O_2 ($\dot{V}O_2$ - $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico nos grupos GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$). As setas indicam a PcO_2 de ambos grupos (61 mmHg e 79 mmHg, respectivamente). Símbolos abertos indicam valores que tiveram diferença significativa com relação ao controle ($p \leq 0,05$). Pontos são apresentados individualmente..... 45
- FIGURA 14** – Efeito da redução das $P_{insp}O_2$ na extração de oxigênio da corrente ventilatória (EO_2 - %) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico nos grupos GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$). Símbolos abertos indicam valores diferentes significativamente de valores iniciais (normóxia). * - indica valores significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p \leq 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M..... 47
- FIGURA 15** – Relações entre o V_T (A), a f_R (B) e a \dot{V}_G (C) e as $P_{insp}O_2$ (mmHg) dos grupos GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$) de *C. gariepinus* em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico. Símbolos abertos indicam diferença significativa dos valores iniciais (normóxia). * - indica valores significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p \leq 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M..... 50
- FIGURA 16** – Relações entre a frequência cardíaca (f_H – bpm) e as $P_{insp}O_2$ (mmHg) de *C. gariepinus* do GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$) durante hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico. Símbolos abertos indicam diferença significativa dos valores iniciais (normóxia). * - indica

valores significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p \leq 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M..... 53

FIGURA 17 – **A** – Frequência respiratória (f_R - resp.min⁻¹) e **B** – Amplitude ventilatória (V_{AMP} - %) de *C. gariepinus* com acesso ao ar atmosférico em resposta a hipóxia gradual. ● – peixe com os arcos branquiais intactos (GC) pré-RA e ▲ - pós-RA. ■ – peixe com os arcos branquiais extirpados (GD) pré-RA e ◆ - pós-RA. **B** – frequência de respiração aérea (f_{RA} - resp.h⁻¹) de *C. gariepinus* com acesso ao ar atmosférico em resposta à hipóxia gradual. ● – peixe com os arcos branquiais intactos (GC), ◆ - peixe com os arcos branquiais extirpados (GD). Símbolos abertos indicam valores significativamente diferentes dos valores em normóxia. * - indica valores significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p < 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M. ($n = 9$)..... 61

FIGURA 18 – Registro dos complexos QRS do ECG do grupo GC (**A**) e GD (**B**) de *Clarias gariepinus* em hipóxia severa com acesso ao ar atmosférico ($P_wO_2 = 20$ mmHg), mostrando a atenuação dos valores da f_H tanto pré- como pós-RA..... 65

FIGURA 19 – Curva dose-resposta das injeções externas de água e de concentrações crescentes de NaCN sobre a frequência cardíaca (**A**) e a frequência respiratória (**B**) de *C. gariepinus* intactos ($n = 4$), com acesso ao ar atmosférico. As barras representam médias \pm S.E.M. Os números acima das barras indicam a variação, em porcentagem, dos valores médios das injeções externas de NaCN comparado com a injeção controle (água)..... 69

FIGURA 20 – Curva dose-resposta das injeções internas de salina e de concentrações crescentes de NaCN sobre a frequência cardíaca (**A**) e a frequência respiratória (**B**) de *C. gariepinus* intactos ($n = 4$), com acesso ao ar atmosférico. As barras representam médias \pm S.E.M. Os números acima das barras indicam a variação, em porcentagem, dos valores médios das injeções internas de NaCN comparado com a injeção controle (salina)..... 70

- FIGURA 21** – Mudanças na frequência respiratória (f_R – resp.min⁻¹) de *C. gariepinus* após a sequência de injeções externas de H₂O (1,0 mL), NaCN (1,0 mL de 1,25 mg.mL⁻¹) e injeções internas de salina (0,5 mL) e NaCN (0,5 mL de 0,75 mg.mL⁻¹). **A** e **B** – peixes com os arcos branquiais intactos (GC; $n = 12$), **C** e **B** – peixes com os primeiros arcos branquiais extirpados (GD; $n = 12$). As setas indicam o momento das injeções. Símbolos abertos representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). * - indica valores que são significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M..... 74
- FIGURA 22** – Mudanças na amplitude ventilatória (V_{AMP} - %) de *C. gariepinus* após a sequência de injeções externas de H₂O (1,0 mL), NaCN (1,0 mL de 1,25 mg.mL⁻¹) e injeções internas de salina (0,5 mL) e NaCN (0,5 mL de 0,75 mg.mL⁻¹). **A** e **B** – peixes com os arcos branquiais intactos (GC; $n = 12$), **C** e **B** – peixes com os primeiros arcos branquiais extirpados (GD; $n = 12$). As setas indicam o momento das injeções. Símbolos abertos representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). * - indica valores que são significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M..... 75
- FIGURA 23** – Mudanças na frequência cardíaca (f_H – bpm) de *C. gariepinus* após a sequência de injeções externas de H₂O (1,0 mL), NaCN (1,0 mL – 1,25 mg.mL⁻¹) e injeções internas de salina (0,5 mL) e NaCN (0,5 mL de 0,75 mg.mL⁻¹). **A** e **B** – peixes com os arcos branquiais intactos (GC; $n = 12$), **C** e **B** – peixes com os primeiros arcos branquiais extirpados (GD; $n = 12$). As setas indicam o momento das injeções. Símbolos abertos representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). * - indica valores que são significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M..... 76
- FIGURA 24** – Números de respirações aéreas após injeções de NaCN externas (barras brancas) e internas (barras pretas) do grupo controle (GC) e do grupo

com ablação do 1º par de arcos branquiais (GD) do bagre-africano, *Clarias gariepinus*. O número de peixes que demonstraram o comportamento de respiração aérea (n) aparece dentro das barras. * - indicam valores que são significativamente diferentes entre os grupos ($p \leq 0,05$). Valores são médias \pm S.E.M..... 77

FIGURA 25 – Efeitos das injeções internas (veia caudal) do suporte farmacológico sobre a frequência cardíaca (f_H – bpm) de *C. gariepinus* ($n = 4$) durante normóxia. **Cont** – controle; **Adr** – injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de adrenalina; **Prop + Adr** - injeção de 0,5 mL de 3,0 mg.Kg⁻¹ de propranolol seguido, após 1 h, da injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de adrenalina; **Ach** - injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de acetilcolina; **Atrop + Ach** – injeção de 0,5 mL de 1,2 mg.Kg⁻¹ de atropina seguido, após 1 h, da injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de acetilcolina. Valores são médias \pm S.E.M..... 79

FIGURA 26 – Percentagem dos tônus colinérgico e adrenérgico após bloqueio parassimpático e simpático do coração do grupo controle (GC; $n = 10$) e do grupo com ablação do 1º par de arcos branquiais (GD; $n = 10$) do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, durante normóxia com acesso ao ar atmosférico. Barras brancas representam valores pré-RAs e barras pretas valores pós-RAs. * - indica valores significativos entre os dados do mesmo grupo experimental. # - indica valores significativos entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$). Valores são médias \pm S.E.M..... 86

LISTA DAS TABELAS

- TABELA 1** – Valores médios (\pm S.E.M.) da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ e dos parâmetros cardiorrespiratórios obtidos do grupo controle (GC) de *Clarias gariepinus* ($n = 10$) em hipóxia gradual ($P_{\text{wO}_2} = 140, 100, 70, 50$ e 30 mmHg) *sem* acesso ao ar atmosférico ($n = 10$)..... 44
- TABELA 2** – Valores médios (\pm S.E.M.) da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ e dos parâmetros cardiorrespiratórios obtidos do grupo desbranquiado (GD) de *Clarias gariepinus* ($n = 10$) durante hipóxia gradual ($P_{\text{wO}_2} = 140, 100, 70$ e 50 mmHg) *sem* acesso ao ar atmosférico 44
- TABELA 3** – Comparação dos valores de P_{cO_2} , $\dot{V}\text{O}_2$, e EO_2 de *Clarias gariepinus* ($n = 10$) com os valores de outros respiradores bimodais siluriformes e não-siluriformes, e teleósteos de respiração exclusivamente aquática durante normóxia..... 46
- TABELA 4** – Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros respiratórios do GC de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual ($P_{\text{wO}_2} = 140, 100, 70, 50, 30$ e 10 mmHg) e a percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-respiração aérea em cada P_{wO_2} 60
- TABELA 5** – Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros respiratórios do GD de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual ($P_{\text{wO}_2} = 140, 100, 70, 50, 30$ e 10 mmHg) e a percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-respiração aérea em cada P_{wO_2} 60
- TABELA 6** – Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros cardíacos do GC de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual, percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-RA e aumento nos batimentos-por-minuto pós-RA de cada P_{wO_2} . * - indica valores significativamente diferentes em relação aos valores de f_{H} pré-RA ($p < 0,05$)..... 66

- TABELA 7** – Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros cardíacos do GD de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual, percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-RA e aumento nos batimentos-por-minuto pós-RA de cada P_wO_2 . * - indica valores significativamente diferentes em relação aos valores de f_H pré-RA. ^a - indica valores significativamente diferente dos respectivos valores do grupo GC da Tabela 7 ($p < 0,05$)..... 66
- TABELA 8** – Comparação dos valores de f_H (bpm) pré- e pós-RA de *Clarias gariepinus* do grupo GC com os valores de f_H (bpm) pré- e pós-RA de outros teleósteos de respiração aérea durante hipóxia severa..... 67
- TABELA 9** – Valores médios (\pm S.E.M.) da frequência cardíaca (f_H) pré e pós-respirações aéreas do GC ($n = 10$) e do GD ($n = 10$) de *Clarias gariepinus* seguido dos bloqueios parassimpático e simpático do coração durante normóxia ($PwO_2 \sim 140$ mmhg)..... 85

ABREVIACÕES

ABO – órgão de respiração aérea (<i>Air-Breathing Organ</i>)	PO₂ – pressão parcial do gás oxigênio
Ach – tratamento com acetil-colina	PaO₂ – pressão parcial de O ₂ no sangue arterial
Atr – tratamento com atropina	PcO₂ – pressão parcial crítica de O ₂
Adr – tratamento com adrenalina	PwO₂ – pressão parcial do O ₂ na água
AV – atrioventricular	P&A – tratamento com propranolol e atropina para completo bloqueio do controle autonômico do coração
bpm – batimentos por minuto	prop – tratamento com propranolol
e⁻ - elétrons	RA – respiração aérea
ECG – eletrocardiografia	R-R – intervalo entre dois picos R do complexo QRS da eletrocardiografia
f_R – frequência respiratória aquática	SA – nódulo sinusal
f_{RA} – frequência respiratória aérea	V_{AMP} – amplitude ventilatória
GC – grupo controle/intacto	V_G – ventilação branquial
GD – grupo desbranquiado (grupo experimental com a ablação do 1 ^o par de arcos branquiais)	V_T – volume ventilatório
ṀO₂ – difusão do O ₂ através da membrana	V̇O₂ – taxa metabólica ou consumo de O ₂
NaCN – cianeto de sódio	IX – Nervo Craniano Glossofaríngeo
NEBs – <i>Neuroepithelial Bodies</i>	X – Nervo Craniano Vago
NEC – células neuroepiteliais presentes nas lamelas secundárias das branquiais (<i>Neuroepithelial cells</i>)	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. HIPÓXIA AÉREA E ADAPTAÇÕES DOS ANIMAIS	01
1.2. HIPÓXIA AQUÁTICA E ADAPTAÇÕES DOS PEIXES	03
1.3. QUIMIORRECEPTORES DE O₂	
1.3.1. Importância, Localização e Sensibilidade ao O₂	07
1.3.2. Distribuição e Orientação	12
1.4. PEIXES DE RESPIRAÇÃO AÉREA E O BAGRE-AFRICANO, <u>CLARIAS GARIEPINUS</u>	15
1.5. SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO E O CONTROLE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM PEIXES	20
1.6. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO CIANETO	21
2. OBJETIVOS	
2.1. PRINCIPAL	23
2.2. DEMAIS OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. COLETA E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO	24
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
3.3. PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS	
3.3.1. Procedimentos Cirúrgicos	26
3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL I – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DURANTE HIPÓXIA GRADUAL <u>SEM</u> ACESSO AO AR ATMOSFÉRICO	29
3.4.1. Respostas Cardiorrespiratórias à Hipóxia Gradual	32
3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL II: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DURANTE HIPÓXIA GRADUAL <u>COM</u> ACESSO AO AR ATMOSFÉRICO	32
3.6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL III: IDENTIFICAÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES DE O₂ BRANQUIAIS	35

3.7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV: RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE AUTONÔMICO E A FREQUÊNCIA CARDÍACA PRÉ E PÓS RESPIRAÇÃO AÉREA.....	36
3.8. ANÁLISE DOS DADOS.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL I: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DURANTE HIPÓXIA GRADUAL <u>SEM</u> ACESSO AO AR ATMOSFÉRICO.....	40
Taxa Metabólica.....	40
Cardíaca.....	51
Aquática.....	54
4.2.1.2. Amplitude Ventilatória.....	55
4.2.1.3. Frequência de Respiração Aérea.....	57
4.2.2. Frequência Cardíaca.....	62
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL III: IDENTIFICAÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS QUIMIORECEPTORES DE O ₂ BRANQUIAIS	
4.3.1. Curva Dose-Resposta.....	68
4.3.2. Análise da orientação dos quimiorreceptores de O ₂ através das injeções externas e internas de NaCN.....	71
4.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV: RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE AUTONÔMICO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA PRÉ- E PÓS-RESPIRAÇÃO AÉREA	
4.4.1. Suporte Farmacológico.....	78
4.4.2. Relação entre o Tônus Adrenérgico e Colinérgico e a f _H Pré- e Pós-respiração aérea.....	80
5. DISCUSSÃO FINAL.....	83
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. HIPÓXIA AÉREA E ADAPTAÇÕES DOS ANIMAIS DE RESPIRAÇÃO AÉREA

Do ponto de vista fisiológico, os gases mais importantes são o oxigênio, gás carbônico e nitrogênio. Eles estão presentes no ar atmosférico na proporção de 20,95%, 0,03% e 78,09%, respectivamente. Dentre estes, o O₂ é o responsável pela obtenção de energia química em forma de ATP através da oxidação dos alimentos. Este composto ubíquo, é obtido por meio da hidrólise de uma ligação de fosfato “rica em energia”, é a fonte de energia imediata para processos como a contração muscular, o movimento ciliar, a luminescência dos vaga-lumes, a descarga do peixe elétrico e assim por diante. Desta forma, a quantidade de O₂ consumida reflete uma medida do metabolismo energético aeróbico do organismo (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

No entanto, apesar da porcentagem do O₂ ser a mesma em todo ambiente aéreo (WEST, 1996), sua a pressão parcial (PO_2), que é a pressão que o O₂ exerce sozinho ao ocupar um recipiente numa determinada temperatura, pode variar. No ambiente aéreo, a PO_2 pode variar com relação à altitude sendo 150 mmHg no nível do mar e cerca de 45 mmHg no monte Everest à 8.848 m de altitude (DEJOURS, 1966). Assim, a relação do aumento da altitude associado ao decréscimo da pressão barométrica em conjunto com a diminuição da PO_2 é chamada de hipóxia hipobárica e promove alterações no conteúdo da pressão parcial do O₂ do sangue arterial (PaO_2) e, conseqüentemente, na “quantidade” de O₂ fornecido aos tecidos (MAGALHÃES et al., 2002)

Apesar de não existir uma distinção clara entre altitudes baixas e altas, é comum aceitar que altas altitudes são aquelas que causam dificuldade respiratória, aumento na frequência cardíaca, insônia e dores de cabeça nos seres humanos aclimatizados em baixas altitudes, como ao nível do mar (HEATH & WILLIAMS, 1981). É estimado que aproximadamente 30% da superfície terrestre encontram-se acima de 1 km de altitude (WEBBER, 1979). Segundo PAWSON & JEST (1978) existem três grandes áreas de altas altitudes no planeta em que são encontradas maiores populações humana e animal. São elas o planalto tibetano e a região do Himalaia na Ásia (com média de altitude de 4,5 km e 15 picos acima de 7,9 km), a Cordilheira dos Andes na América do Sul (com média de altitude de 4 Km) e a região da Etiópia na África (com variação entre 2,4 e 3,7 km e picos máximos de 4,62 km). Além da baixa PO_2 nestes ambientes, é importante considerar outros fatores estressantes para a sobrevivência dos animais ali como, por exemplo, o frio e cobertura de neve, baixa umidade do ar, reduzida absorção atmosférica de energia radiante, topografia

acidentada e solos pobres em nutrientes que gera pouco desenvolvimento da biomassa vegetal e, portanto, má nutrição dos animais (BOUVEROT, 1985a).

Uma grande variedade de animais de diferentes filos está aclimatizada nestes ambientes hipóxicos de altas altitudes. Entre os vertebrados inferiores temos, por exemplo, os anfíbios do gênero *Elentherodactylus* (HESSE, 1947) à 4,5 km de altitude das regiões úmidas da Cordilheira dos Andes, o lagarto *Mabuya varia* (SNYDER & WEATHERS, 1977) à 4 km de altitude no ponto mais alto da África, no monte Quilimanjaro, e os peixes do gênero *Nemachilus* (ZUTSHI et al., 1972) que foram encontrados à 4,7 km de altitude nos altiplanos da Ásia. Também, algumas espécies de aves são capazes de voar em extremas altitudes como o ganso de cabeça listada, *Anser indicus*, a gralha de bico amarelo, *Pyrhocorax graculus*, e alguns abutres como *Gyptaetus barvatus* e *Gyps himalayensis* as quais sobrevoam as regiões do Himalaia incluindo o monte Everest à 5,5 km de altitude (SWAN, 1961; NAPIER, 1972). Entre os mamíferos, o iaque (*Poephagus grunniens*) é o animal domesticado melhor aclimatizado às elevadas altitudes, vivendo na Ásia central à 5,8 km de altitude (HESSE, 1947). Também, as lhamas (*Lama glama* e *Lama pacos*), o guanaco (*Lama guanacoe*) e a vicunha (*Vicugna vicugna*) são bem adaptados a altitudes elevadas entre 4,8 e 5,4 km da região Andina (PEARSON, 1951; KOFORD, 1956), além de muitos outros mamíferos e seres humanos (BOUVEROT, 1985a).

Diversas estratégias fisiológicas permitem estes animais sobreviverem em hipóxia hipobárica como, por exemplo, a diminuição da resistência ao fluxo de O₂ (BOUVEROT, 1985b), hiperventilação mediada por quimiorreceptores (RAHN & OTIS, 1949), ajuste na condutância do O₂ sanguíneo gerada pela alteração do hematócrito (chilenos, CLENCH et al., 1982; pato de Pequim, *Anas peking*, BLACK & TENNEY, 1980; rã do Titicaca, *Telmatobius culeus*, HUTCHISON et al., 1976), alterações na afinidade HbO₂ (peruanos, LENFANT et al., 1968; lhama, BANCHERO et al., 1971; ganso do Canadá, *Branta canadensis*, PETSCHOW et al., 1977), redistribuição sanguínea ao longo do corpo e mudanças bioquímicas (BOUVEROT, 1985c; BOUVEROT & LERAY, 1985; GNAIGER, 2000) e depressão da taxa metabólica (MALAN, 2000; BOUTILIER, 2001).

Tais respostas fisiológicas também ocorrem durante a hipóxia apresentada nos animais que mergulham em águas profundas. Além disso, estes apresentam outras estratégias como adaptações morfológicas de seus pulmões para efetuar mais rapidamente as trocas gasosas, um maior armazenamento do O₂ tanto nos pulmões como nos tecidos corpóreos, maior eficiência no transporte de O₂, maior tolerância à hipóxia tecidual e desvios cardíacos no grupo dos répteis (BERKSON, 1966; BLESSING, 1972; WOOD et al., 1984; QVIST et

al., 1986; JONES et al., 1987; Le BEOUF et al., 1989; SUAREZ et al., 1989; CASTELLINI et al., 1988, 1992; LUTCAVAGE et al., 2002).

1.2. HIPÓXIA AQUÁTICA E ADAPTAÇÕES DOS PEIXES

Diferentemente do ambiente aéreo, o ambiente aquático, que é principal ambiente do presente estudo, apresenta consideráveis variações nas propriedades físico-químicas da água como oxigênio, gás carbônico, prótons H^+ , temperatura e íons dissolvidos, principalmente nos ecossistemas dulcícolas (PERRY & LAURENT, 1993). Entre os gases dissolvidos na água, o O_2 também é considerado um dos mais importantes na dinâmica das espécies e caracterização dos ecossistemas aquáticos (ARANA, 1997), principalmente devido sua disponibilidade ser considerada uma importante força seletiva na sobrevivência dos organismos ali presentes (ALMEIDA-VAL et al., 1993).

Reduções na disponibilidade de O_2 afetam mais diretamente animais de respiração aquática que animais de respiração aérea (RA). Estas reduções de O_2 podem ocorrer de forma severa nos ambientes aquáticos devido ao “input” antropogênico de matéria orgânica e a decomposição desta por microrganismos aeróbicos (FERNANDES & RANTIN, 1989; RANDALL et al., 1997). Além disso, existem variações sazonais e diárias do O_2 dissolvido na água causadas naturalmente por diversos fatores como, por exemplo, alterações na temperatura ambiental que ocorrem principalmente em ambientes tropicais, supersaturação da água com oxigênio devido à fotossíntese das macro e micrófitas durante a fase clara da fotossíntese que podem elevar a concentração de O_2 até 150%, e a diminuição da concentração deste gás durante a noite podendo baixar a menos de 5% de saturação de O_2 devido à respiração aeróbica destas algas (KRAMER, 1987; PULELLA, 1997; RANDALL et al., 1997; FLORINDO, 2002). Sendo assim, reduções da pressão parcial do O_2 dissolvido na água (PwO_2), provocadas tanto naturalmente como de forma antropogênica, são chamadas de hipóxia ambiental.

Diversos estudos tem mostrado a importância da hipóxia ambiental aquática, pois ela atua diretamente tanto na flora quanto na fauna dos ambientes aquáticos prejudicando o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos ali presentes e, conseqüentemente, de toda cadeia trófica (VONDRACEK et al., 1982; RICKLEFS, 1993).

Entre os animais aquáticos, os peixes são frequentemente afetados pela hipóxia ambiental (GLASS, 1992). Segundo HOCHCHKA (1980), quando os peixes são expostos à hipóxia podem responder comportamentalmente, nadando para áreas com maior

disponibilidade de O_2 . Porém, caso tal situação persista, a estratégia utilizada por esses animais parece ser a de “esperar para ver”, sendo que, em seguida, respostas fisiológicas e bioquímicas são desencadeadas para compensar os efeitos hipóxicos.

Primeiramente, é necessário compreender o transporte de O_2 em vertebrados, o qual ocorre em etapas consecutivas: **a.** convecção do meio respirado (ar ou água) para o local de troca gasosa; **b.** difusão do gás do meio respirado para o sangue; **c.** a convecção com o tecido sanguíneo pela vasculatura corpórea; **d.** outra difusão do O_2 do sangue para os tecidos (HUGHES, 1973; GLASS 1992; Fig. 1). Esta trajetória do O_2 ocorre pela diferença de PO_2 entre as etapas, sendo que no início da trajetória o meio o externo (a água) possui a maior PO_2 , enquanto o meio mais interno (meio mitocondrial, especificamente na membrana interna da mitocôndria) possui a menor PO_2 . Assim, qualquer aumento na resistência à difusão do O_2 em uma destas etapas pode causar um efeito hipóxico levando a uma modificação da PO_2 ao longo desta trajetória e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de O_2 disponível à mitocôndria para os processos aeróbicos (FERNANDES & RANTIN, 1989; FERNANDES et al., 1994).

Desta forma, alterações na disponibilidade do O_2 ambiental induzem ajustes necessários em uma ou mais destas etapas a fim de adequar à demanda de O_2 do animal à captação deste gás a cada ciclo respiratório e sua distribuição para os tecidos. Dentre os animais de respiração aquática, os peixes são obrigados a promover ajustes cardiovasculares e respiratórios para manter a transferência de O_2 adequada desde o ambiente até os tecidos, o que é denominado de **cascata de O_2** (FERNANDES & RANTIN, 1989). O sucesso ecológico de determinadas espécies de peixes depende, particularmente, de suas habilidades em detectar as mudanças nos níveis de O_2 e utilizar vias sensoriais para efetuar ajustes rápidos e apropriados na função cardiorrespiratória (FRITSCHÉ & NILSSON, 1993).

Geralmente, quando os peixes não podem escapar de uma condição de hipóxia ambiental, eles respondem primeiramente com um aumento na ventilação branquial (\dot{V}_G), utilizando-se de movimentos respiratórios mais rápidos (aumento na frequência respiratória - f_R) e mais profundos (aumento no volume ventilatório - V_T), em conjunto com uma bradicardia reflexa (GLASS et al., 1991; RANTIN & KALININ, 1996; RANTIN et al., 1998). O aumento do fluxo de água através das brânquias (aumento da \dot{V}_G - hiperventilação) ocorre devido a elevações tanto da f_R quanto do V_T (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979; RANDALL, 1982; SMITH & JONES, 1982) e é importante, durante exposições à baixas PO_2 , para manter mais alto possível o gradiente de difusão entre a água e o sangue (SAUNDERS, 1962). Este fino ajuste cardiorrespiratório permite um aumento no tempo de

passagem do sangue através das lamelas secundárias das brânquias que resulta numa maximização na eficiência da transferência do O₂ da água para os capilares branquiais e, conseqüentemente, para a circulação sistêmica (TAYLOR et al., 1999; CAMPBELL & EGGINTON, 2007). Este controle respiratório é modulado por impulsos nervosos originados a partir do “Gerador de Ritmo Respiratório” localizado na medula. Ele é ajustado de acordo com as necessidades do animal através de informações aferentes do sistema nervoso central e periférico, gerando um padrão final de despolarização nos núcleos motores respiratórios. Além disso, dentre os teleósteos mais tolerantes à hipóxia, o “Gerador de Ritmo Respiratório” tende a modular a hiperventilação através de um maior incremento no V_T do que na f_R , o que sugere ser uma estratégia de economia energética (RANTIN et al., 1992; 1993).

Outra estratégia frente à hipóxia prolongada é o aumento do número de eritrócitos, e, portanto, da concentração de hemoglobina, concomitantemente a uma maior afinidade Hb-O₂. Tais alterações fisiológicas facilitam a capacidade de extração e transporte do O₂ desde o ambiente até os tecidos (GRAHAM, 1983, 1985; CRUZ, 2007). Também, alguns peixes podem reduzir sua taxa metabólica de diversas formas como, por exemplo, pela redução do nível de atividade no próprio ambiente hipóxico, ou movendo-se para águas geladas ou ainda deprimindo ativamente o metabolismo para conservação de energia. Esta última, chamada de depressão (ou supressão) metabólica por hipóxia, ainda não é totalmente compreendida, mas há indícios que esteja relacionada à acidose tecidual gerada pela produção de prótons H⁺ através da produção do ATP por vias anaeróbicas (GAUTIER, 1996; JACKSON, 2004).

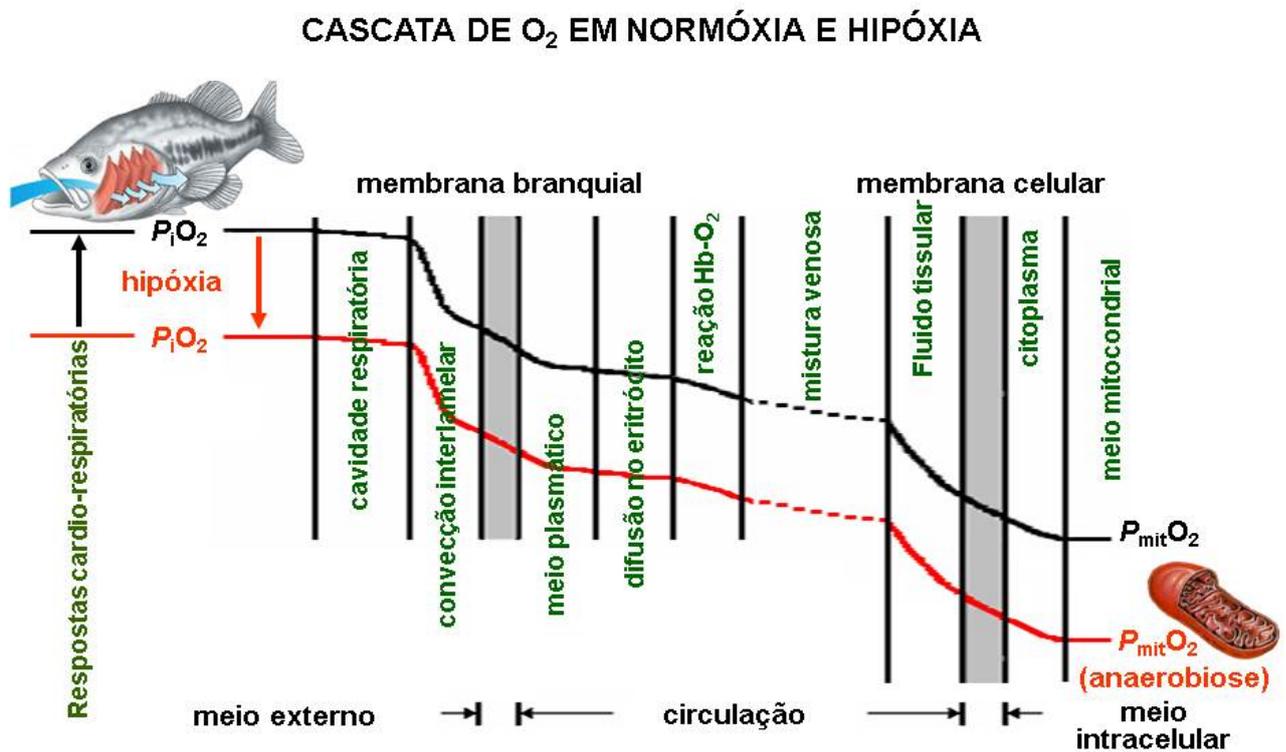


Figura 1. Ilustração da cascata de O₂ em normóxia (linha preta) e hipóxia (linha vermelha). Trajetória do O₂ desde a superfície funcional respiratória de um teleosteo até o meio intracelular (mitocôndria). P_eO_2 : pressão parcial de O₂ de entrada (câmara bucal); $P_{mit}O_2$: pressão parcial de O₂ na mitocôndria; **Hb-O₂**: reação de oxidação da hemoglobina. Adaptado de HUGHES (1973) e RANTIN & MARINS (1984).

1.3. QUIMIORRECEPTORES DE O₂

1.3.1. Importância, Localização e Sensibilidade ao O₂

O sucesso ecológico das espécies de peixes na ocupação de ambientes sujeitos à hipóxia depende, particularmente, de suas capacidades em detectar as mudanças nos níveis de O₂ e utilizar mecanismos sensoriais para efetuar ajustes rápidos e apropriados na função cardiorrespiratória (FRITSCHÉ & NILSSON, 1993; FRITSCHÉ et al., 1993).

O padrão respiratório é originado e modulado através do “Gerador de Ritmo Respiratório”, localizado na medula, e pode ser ajustado de acordo com as necessidades metabólicas do animal ou induzido por situações ambientais como, por exemplo, hipóxia ambiental ou presença de toxinas (BIANCHI et al., 1995; TAYLOR, 1992; MARTINS et al., 2011). Este ajuste é realizado através de informações aferentes de quimiorreceptores de O₂ do sistema nervoso central e periférico, os quais geram o padrão final de despolarização nos núcleos motores respiratórios (BALLINTIEN & JUCH, 1984; FELDMAN et al., 1990; LEITE et al., 2009).

Diferentemente, o ritmo cardíaco é gerado no próprio miocárdio. Os teleósteos possuem inervações cardíacas, vagal e simpática, que são responsáveis, respectivamente, pela eferência central colinérgica e adrenérgica para modulação da frequência cardíaca (TAYLOR, 1992; LEITE et al., 2009).

Desta forma, a integração do sistema respiratório e cardiovascular é o resultado do processamento central de uma ampla variedade de “inputs” sensoriais originados em diferentes grupos de receptores, incluindo os quimiorreceptores que monitoram as tensões/pressões parciais de gases externos (água corrente) e internos (corrente sanguínea), assim como o equilíbrio ácido-base. Em vista disso, variedades de estruturas têm sido testadas como sítios sensíveis ao O₂ (MILSOM, 1997).

Através de estudos dessas estruturas e secção de nervos cranianos foram propostos vários sítios de quimiorrecepção ao O₂, como: o cérebro (BAMFORD, 1974; JONES, 1983; WILKIES, 1981) as brânquias (POWER & CLARK, 1942) as pseudobrânquias (LAURENT & ROUZEAU, 1972), o sistema vascular venoso (BARRETT & TAYLOR, 1984), o sistema vascular branquial aferente (SMATRESK et al., 1986) e o sistema vascular arterial (RANDALL, 1982). Entretanto, estudos mais recentes mostram fortes evidências de que os quimiorreceptores sensíveis ao O₂ estão localizados predominantemente, se não exclusivamente, na cavidade orobranquial (FLORINDO et al., 2006) e nas brânquias da maioria dos peixes actinoptérgicos (MILSOM, 1997).

As células neuroepiteliais das brânquias (NECs – *Neuroepithelial Cells*) são consideradas as prováveis células sensíveis ao O₂ e responsáveis por modular os reflexos cardiorrespiratórios dos peixes frente à hipóxia (DUNEL-ERB et al., 1982; BAILLY et al., 1992; SUNDIN et al., 1998; JONZ & NURSE, 2003; VULESEVIC et al., 2006; BURLESON et al., 2006; COOLIDGE et al., 2008). Morfologicamente, as NECs lembram as células sensíveis ao O₂ do tipo I do corpo carotídeo (célula glomus; Fig. 2) e dos corpos neuroepiteliais dos mamíferos (NEBs – *Neuroepithelial Bodies*) (GONZÁLES et al., 1994; CUTZ & JACKSON, 1999), e, portanto, podem ser consideradas como suas precursoras filogenéticas. COOLIDGE et al. (2008) observaram, em três espécies de teleósteos, a presença destas NECs em diversas áreas de seus aparato respiratório (rastros branquiais, lamelas secundárias, extremidades dos filamentos, centro dos filamentos e ao redor das artérias aferentes e eferentes; Fig. 3), porém consideraram que sua localização é espécie-específica e pode estar correlacionada com a tolerância à hipóxia.

De qualquer forma, uma importante questão persiste: como o O₂ é “sentido” dentro da célula e como o estímulo hipóxico resulta numa resposta celular? Estudos em peixes postulam que as NECs branquiais possuem um mecanismo de transdução similar ao dos quimiorreceptores de O₂ dos mamíferos (LÓPEZ-BARNEO et al., 2001; ver Fig. 4). Primeiramente, o mecanismo conhecido para mamíferos comprovaram que os estímulos hipóxicos da água circulante e/ou da corrente sanguínea promovem uma inibição nos canais de K⁺ transmembrana das NECs alterando seu potencial de membrana (V_m). Isto ocorre devido a atuação de cada bomba Na⁺/K⁺ que continua transferindo 3 cátions Na⁺ do interior das NECs para o exterior e 2 cátions K⁺ para o interior da mesma causando a perda de uma carga positiva a cada ciclo. Desta forma, a inibição dos canais de K⁺ leva a uma hiperpolarização no V_m resultando na abertura de canais Ca²⁺ voltagem-dependentes e, por fim, no influxo de Ca²⁺. O aumento do Ca²⁺ citosólico libera um ou mais tipos de neurotransmissores na fenda sináptica, entre eles a serotonina, elevando a taxa de disparos dos impulsos nervosos (WEIR et al., 2005).

Todavia, diversos passos necessitam ser verificados para as NECs branquiais, dentre eles se o neurotransmissor liberado na fenda sináptica, induzido por hipóxia, é mesmo a serotonina e se não existem outras formas de inibição do canal de K⁺ como através da queda na formação do ATP (WYATT & BUCKLER, 2004; VARAS et al., 2007) e, conseqüentemente, o aumento da razão AMP/ATP (EVANS et al., 2005; WYATT & EVANS, 2007; WYATT et al., 2007). De qualquer maneira, sendo os canais de K⁺ os propulsores da quimiotransdução induzida pela hipóxia, pode-se considerar este mecanismo

como relativamente conservado entre os vertebrados (PERRY et al., 2009a) e de grande importância para o estudo da fisiologia cardiorrespiratória.

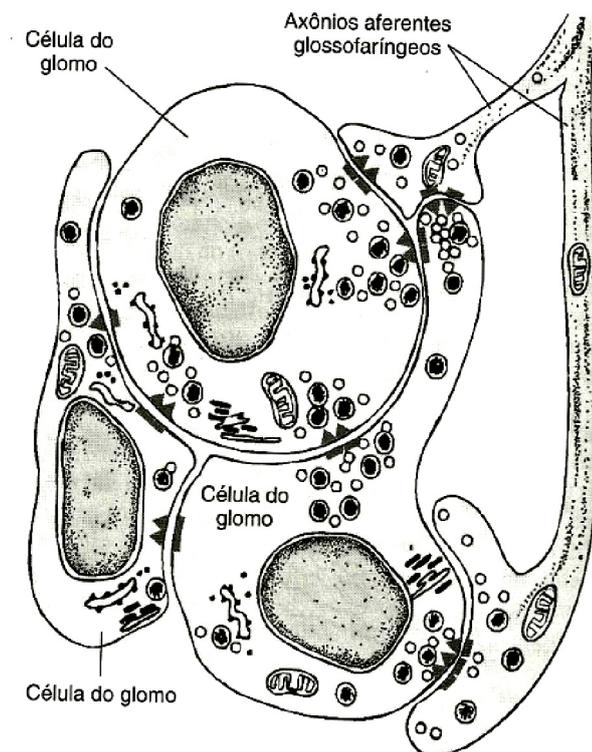


Figura 2. Células tipo I sensíveis ao O_2 do corpo carotídeo de mamíferos (células glomus). **Fonte:** Adaptado de RANDALL et al. (1997).

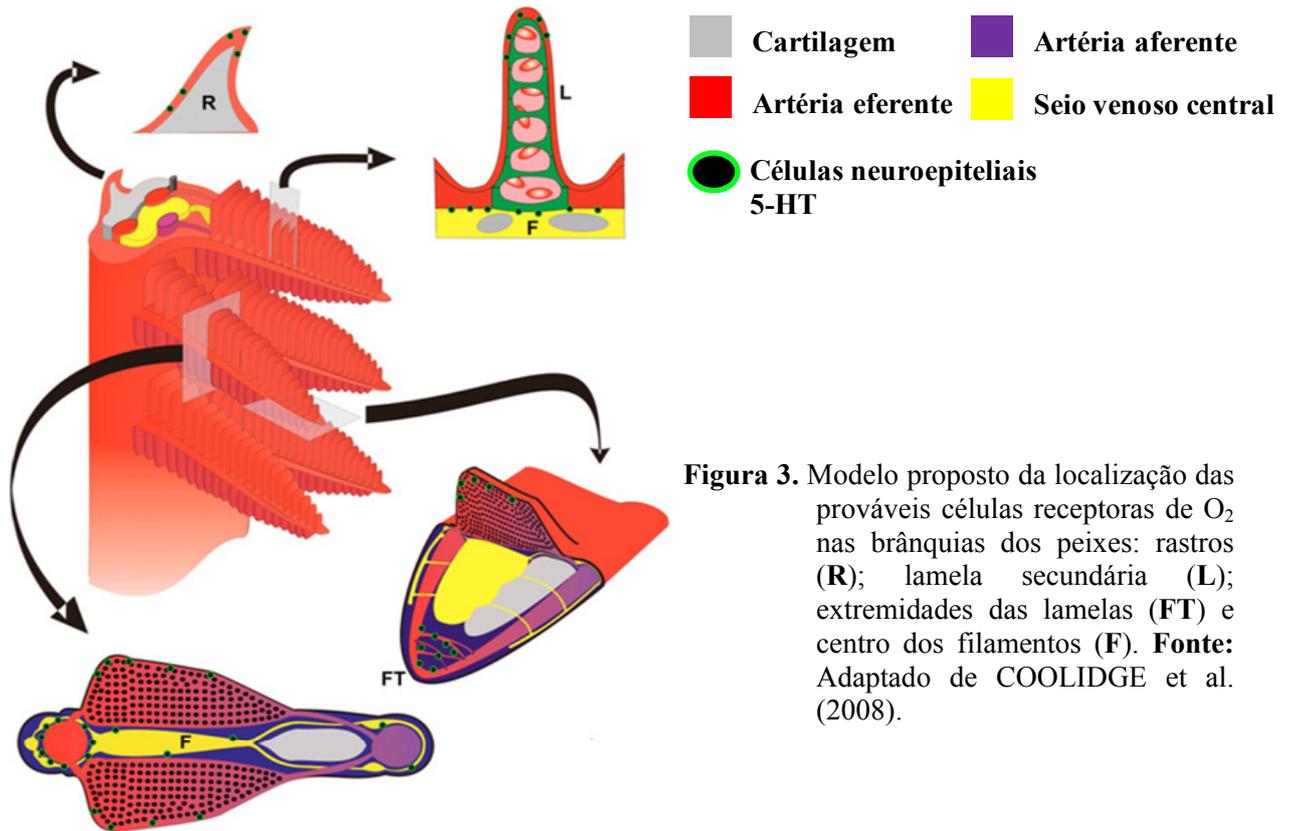


Figura 3. Modelo proposto da localização das prováveis células receptoras de O₂ nas brânquias dos peixes: rastros (R); lamela secundária (L); extremidades das lamelas (FT) e centro dos filamentos (F). **Fonte:** Adaptado de COOLIDGE et al. (2008).

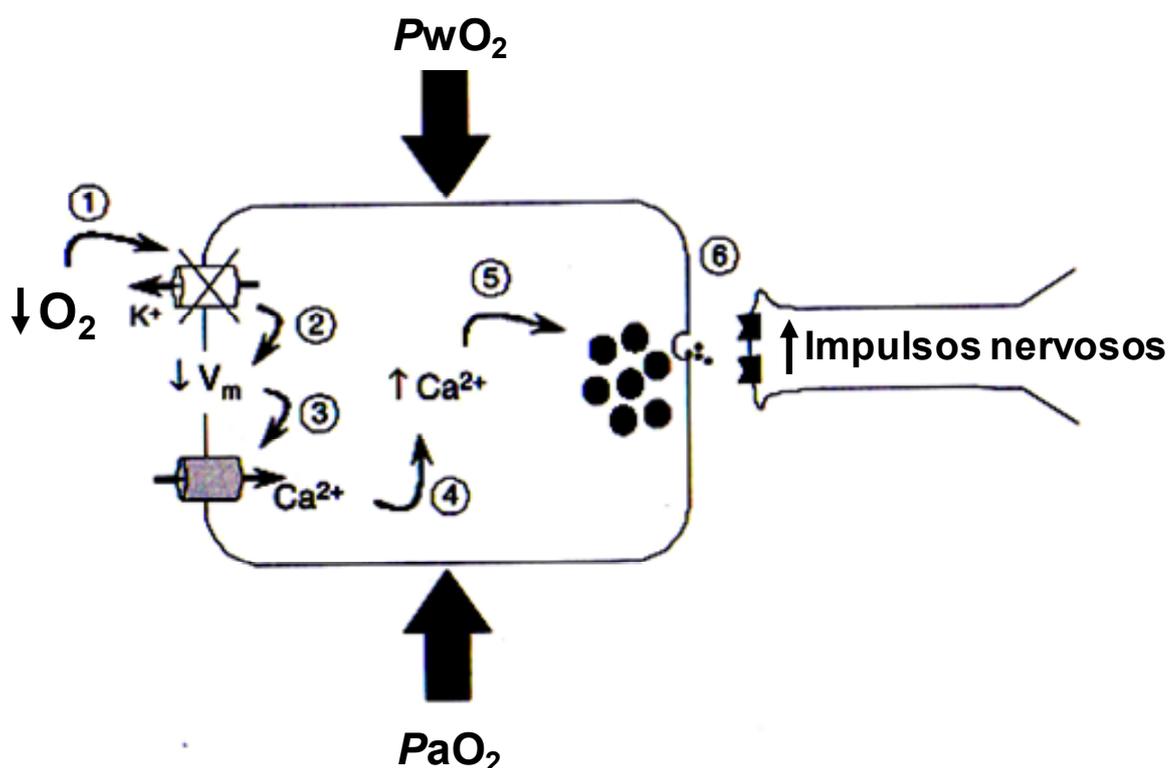


Figura 4. Modelo proposto para a detecção do O_2 pelas NECs nas brânquias dos peixes.

Diagrama esquemático ilustrando que as NECs branquiais podem responder ao decréscimo da PO_2 interna (corrente sanguínea) ou externa (água corrente). O decréscimo da PO_2 é detectado pela NEC e induz (1) uma inibição dos canais de K^+ transmembrana. Isto provoca (2) uma redução no potencial de membrana (V_m) e (3) uma ativação subsequente dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Um influxo de Ca^{2+} através da membrana (4) aumentará os níveis de Ca^{2+} intracelular, que (5) causará a secreção de um ou mais tipos de neurotransmissores das vesículas sinápticas citoplasmáticas para a fenda sináptica. Esta neurotransmissão das NECs pré-sinápticas (6) provocará a ativação de receptores sensoriais pós-sinápticos levando um aumento na taxa de disparos dos impulsos nervosos. **Fonte:** Adaptado de PERRY et al. (2009a).

1.3.2. Distribuição e Orientação

Muitos estudos demonstraram que quimiorreceptores de O₂ branquiais são inervados pelos nervos cranianos IX (glossofaríngeo) e X (vago) (SMATRESK, 1987; BURLESON & SMATRESK, 1990a; McKENZIE et al., 1991a), enquanto que os da cavidade orobranquial pelos nervos V (trigêmio) e VII (facial) (FLORINDO et al., 2006). No entanto, surge outro importante questionamento: os quimiorreceptores sensíveis ao O₂ destes locais possuem orientação tanto a nível externo, monitorando a *PO*₂ da água corrente, quanto a nível interno, monitorando a *PO*₂ da corrente sanguínea?

Segundo MILSOM & BRILL (1986), BURLESON (1991) e BURLESON & MILSOM (1993), os quimiorreceptores de O₂ branquiais podem responder somente, ou preferencialmente, a mudanças no nível externo (água corrente) ou no nível interno (corrente sanguínea) de O₂. Estes autores observaram que alguns receptores são sensíveis às mudanças na *PO*₂ tanto da água corrente que banha as brânquias quanto a *PO*₂ do sangue que perfunde as mesmas. Tais informações sugerem que os quimiorreceptores de O₂ estão distribuídos difusamente nas brânquias, apesar de algumas espécies, como o atum, haver uma predominância de quimiorreceptores de O₂ orientados externamente e, em truta, orientados internamente. Até o momento, nenhum dos estudos comprovou se a orientação externa e interna dos receptores é um aspecto comum a todos os peixes, ou se está associada com diferenças no habitat (MILSOM, 1997).

As observações de que as brânquias possuem quimiorreceptores de O₂ orientados tanto interna quanto externamente são justificadas por estudos sobre os reflexos que sugerem que os quimiorreceptores de O₂ orientados internamente produzem somente respostas ventilatórias (RANDALL & SMITH, 1967; CAMERON & WOHLSCHLAG, 1969; CAMERON & DAVIES, 1970; HOLENTON 1971; SMITH & JONES, 1978; SMATRESK et al., 1986; BURLESON & SMATRESK, 1990b; BURLESON, 1991; McKENZIE et al., 1991a; BURLESON & MILSON, 1993), enquanto que os quimiorreceptores de O₂ orientados externamente produzem ambos os efeitos reflexos, cardiovasculares e ventilatórios (RANDALL & SMITH, 1967; SAUNDERS & SUTTERLIN, 1971; SMITH & JONES, 1978; SMATRESK et al., 1986; BURLESON & SMATRESK, 1990b; BURLESON, 1991; MCKENZIE et al., 1991; BURLESON & MILSOM, 1993).

Segundo SMITH & JONES (1978) e DAXBOECK & HOLETON (1978) a deservação do 1º arco branquial elimina a resposta cardíaca à hipóxia em trutas. Além disso, MILSOM (1997) relatou que a bradicardia hipóxica nesta espécie origina-se somente

frente à hipóxia externa. Este autor sugere que os receptores de O₂ orientados externamente devem estar restritos ao 1º par de arcos branquiais e que, se estiverem presentes nos outros pares de arcos, não devem estar envolvidos com respostas cardíacas, mas somente com respostas ventilatórias. No bagre *Ictalurus punctatus*, a bradicardia resultante da injeção de cianeto de sódio (NaCN) ao fluxo ventilatório de água (ver *item 1.4.1.*), foi abolida somente após a deservação bilateral dos ramos do vago inervando os 1^{os} e 3^{os} arcos branquiais (BURLESON & SMATRESK, 1990b). No entanto, a injeção de NaCN na circulação sanguínea, via aorta dorsal, não apresentou efeitos sobre o ritmo cardíaco o que sugere que, nesta espécie, os arcos branquiais, com exceção do 1º arco branquial, realmente possuem receptores orientados externamente e que existe variabilidade na distribuição destes receptores, ou pelo menos daqueles envolvidos no reflexo cardíaco (MILSOM, 1997). Desta forma, pode-se concluir que as respostas cardiorrespiratórias induzidas pelos quimiorreceptores de O₂ diferem consideravelmente entre as espécies de peixes e, em alguns casos, chegam até ser contraditórias.

Sendo o volume de informações sobre os quimiorreceptores de O₂ de espécies tropicais de RA muito pequeno isto dificulta qualquer tipo de análise comparativa (MILSOM, 2012). Além disso, a literatura fornece poucas informações sobre os mecanismos que iniciam a RA acessória e as alterações cardiorrespiratórias associadas com o estresse hipóxico em peixes de RA em geral (McKENZIE et al., 1991a). Face ao exposto, o presente projeto pretendeu, além de estudar as respostas cardiorrespiratórias mediadas pelos quimiorreceptores de O₂ branquiais frente a exposições de hipóxia, estender estes conhecimentos a uma espécie tropical de RA: o bagre africano, *Clarias gariepinus*.

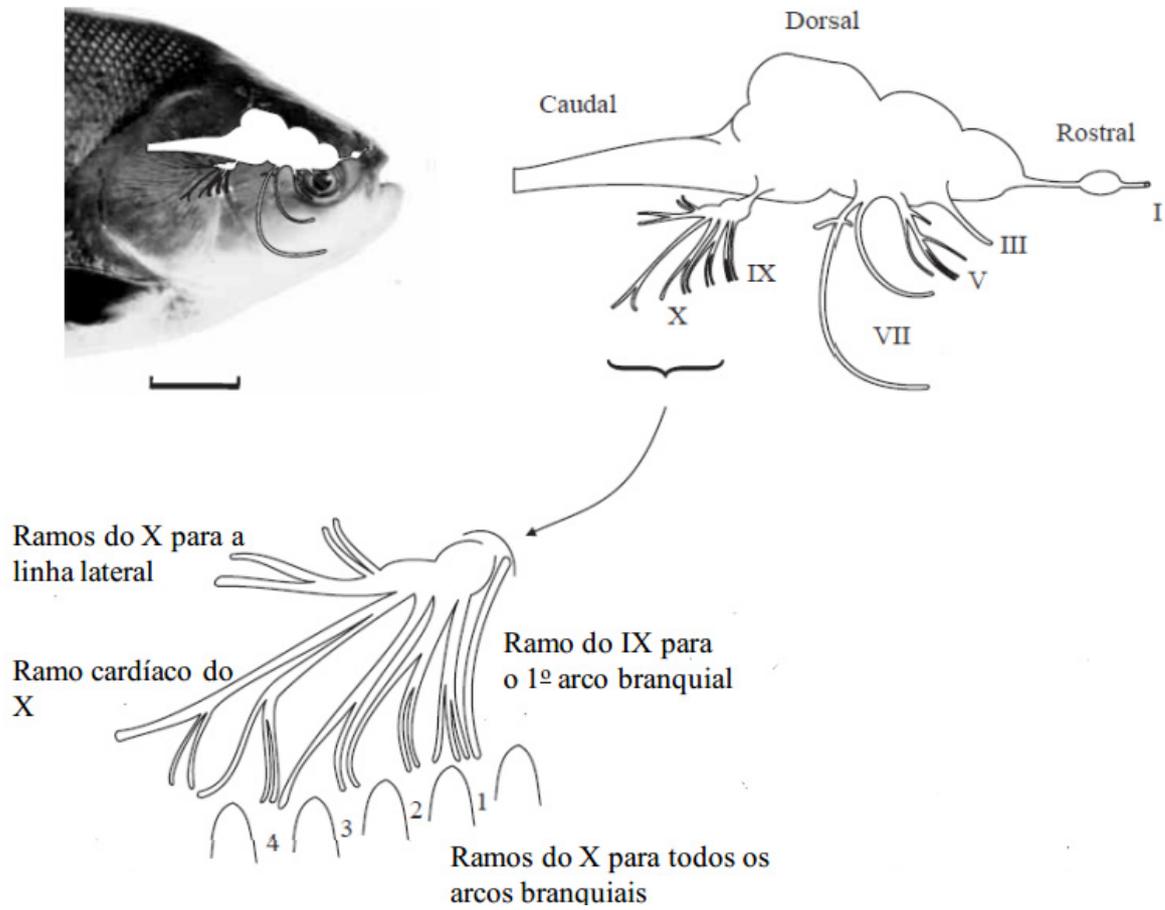


Figura 5. Localização dos nervos cranianos de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Evidência para origem dos nervos na porção dorsal do encéfalo e a inervação dos arcos branquiais. **Fonte:** Adaptado de MILSOM et al., 2002.

1.4. PEIXES DE RESPIRAÇÃO AÉREA E O BAGRE-AFRICANO, CLARIAS GARIEPINUS

Espécies de RA podem frequentemente ser encontradas, principalmente em regiões tropicais, confinadas em lagoas marginais hipóxicas e hipercárbicas durante semanas ou até meses de estiagem. Nestas situações inóspitas, adaptações à RA são determinantes para a sobrevivência de muitas espécies (KRAMER et al., 1978).

Entre os teleósteos de RA, os órgãos acessórios de respiração aérea (ABOs – *Air Breathing Organs*) são bastante diversificados. Em algumas espécies ocorrem modificações na bexiga natatória e, em outras, as modificações podem estar relacionadas à cavidade bucofaringeana, câmara opercular, trato gastrointestinal, entre outros. GRAHAM (1997) descreveu detalhadamente a morfologia dos ABOs atualmente conhecidos e até hipotetizou um modelo de como seria todos estes ABOs num único organismo (Fig. 6).

Entre os peixes de RA existe uma grande variação interespecífica no que se refere ao grau de dependência da água ou do ar, a qual está diretamente relacionada com o desenvolvimento de suas brânquias e ABOs, além do próprio habitat natural (FARBER & RAHN, 1970; GAREY & RAHN, 1970; HUGHES & SINGH, 1970, JOHANSEN, 1970; SINGH & HUGHES, 1971). Além disso, diversos fatores podem influenciar a capacidade de extração do O₂ do ar atmosférico como, por exemplo, a quantidade de O₂ e CO₂ do meio aquático, temperatura, afinidade Hb-O₂, perfusão dos gases pelas estruturas respiratórias, nível de atividade/forageamento, aclimação à hipóxia e predadores (GRAHAM, 1985; KRAMER & GRAHAM, 1976; KRAMER et al., 1983; GRAHAM & BAIRD, 1984; SMITH & KRAMER, 1984; GEE, 1986; HILLMAN & WITHERS, 1987; SHINGLES et al., 2005; CHAPMAN & MCKENZIE, 2009). Ainda, outros fatores podem afetar a própria duração da respiração aérea como, nível de claridade, período do dia, a profundidade em que o peixe vive e toxinas presentes na água (KULAKKATTOLICKAL & KRAMER, 1988).

A família Clariidae possui aproximadamente 14 gêneros e a principal característica que une todas as espécies é o órgão suprabranquial de RA (TEUGELS & DOMENIQUE, 2003). O bagre-africano, *Clarias gariepinus* (Fig. 5) adapta-se facilmente em rios com altos fluxos de água ou ambientes inóspitos como águas calmas de lagos bem turbidos de 4 à 80 metros de profundidade (FAO, 1997; MILI & TEIXEIRA, 2006), as quais podem possuir grandes variações no pH (6,5 à 8,0) e na temperatura (8 à 35 °C) (TEUGELS, 1986). Eles também são capazes de secretar muco e enterrarem-se na lama a fim de prevenir a desidratação durante a estiagem (PIENAR, 1968; TEUGELS, 1986; SKELTON, 1993).

Outra característica do bagre-africano é a capacidade de rastejar-se na terra através de movimentos de natação e utilizando sua forte nadadeira peitoral a fim de procurar de melhores condições de vida, alimentação e sítios reprodutivos. Os machos e fêmeas de *Clarias gariepinus* atingem a maturação sexual com tamanhos similares (ao redor de 330 mm) e seus períodos reprodutivos estão associados ao verão e ao período de chuvas (BRUTON, 1979; ZAKI & ABDULA, 1983; OSUIGWE & ERONDU, 1997; DADEBO, 2000). Segundo NATAKANI et al. (2001), o bagre-africano possui fecundação externa com cuidado parental. Além disso, apesar do bagre-africano utilizar o rastejamento para fuga de predadores, ele pode ser facilmente predado principalmente pelos homens, mas também por leopardos, crocodilos e pássaros, sendo a águia-pescadora (gênero *Haliaeetus*) e o marabu (*Leptoptilos crumeniferus*) seus predadores mais comuns (SKELTON, 1993).

O bagre-africano é considerado uma espécie de grande porte podendo atingir até 170 cm de comprimento total e 60 kg de massa corpórea (TEUGELS, 2003). Apresenta hábitos noturnos e é omnívoro de tal forma que têm preferência por forragear à noite a procura de uma ampla variedade de presas, tais como peixes, pássaros, anfíbios, pequenos mamíferos, répteis, caracóis, caranguejos, camarões, insetos, plantas, podendo ainda ser planctógafo se necessário (MUNRO, 1967; HICKLEY & BAILEY, 1987; ADEYEMO et al., 1997; DADEBO, 2000; ARRINGTON et al., 2002; FERRI, 2004). Tal predação torna-se mais visível durante períodos de estiagem, quando presas e predadores ficam mais agrupados. Entretanto, diversos clariídeos são capazes de sobreviver por longos períodos de escassez de alimento (COURTENAY, 1970; COURTENAY et al., 1974).

O gênero *Clarias* é comumente distribuído por toda a África e sul da Ásia. Atualmente, eles estão distribuídos em muitas áreas da América também (LACHNER et al., 1970; COURTENAY & STAUFFER, 1984; TEUGELS & DOMENIQUE, 2003). Tendo em vista sua rusticidade, hábito alimentar variado, alta taxa de crescimento e conversão alimentar, boa qualidade de sua carne, além da capacidade de adaptação em ambientes inóspitos, *Clarias gariepinus* foi introduzida no Brasil na década de 90 com objetivo de procriação para comercialização (VERRETH et al., 1993; ALVES, 1999). Entretanto, tanques foram construídos inapropriadamente o que facilitou a fuga de alguns exemplares. Estes, por sua vez, pôr terem poucos predadores naturais e serem resistentes às condições ambientais adversas, começaram a reproduzir-se facilmente e colocar em risco a ictiofauna nativa, visto que são predadores generalistas de topo de cadeia (ALVES et al., 1999; MILI & TEIXEIRA, 2006; RICHTER, 2014). Atualmente, a espécie encontra-se registrada para as bacias

hidrográficas do rio São Francisco, Rio Doce, Rio Grande (ALVES, 1999) e rio Paraná (NAKATANI et al., 2001).

Segundo revisão taxonômica de GRAHAM (1997), o bagre-africano ocupa a seguinte posição sistemática:

Reino: ANIMALIA

Filo: CHORDATA

Classe: OSTEICHTHYES

Sub-Classe: ACTINOPTERYGII

Divisão: HALECOSTOMI

Subdivisão: TELEOSTEI

Infradivisão: EUTELEOSTEI

Superordem: OSTARIOPHSI

Ordem: SILURIFORMES

Família: CLARIIDAE

Gênero: *Clarias*

Espécie: *Clarias gariepinus*

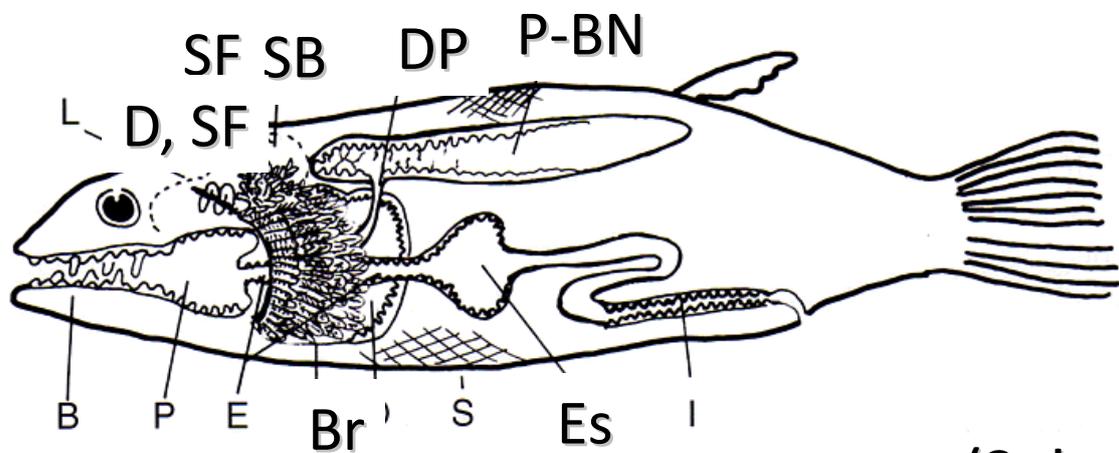


Figura 6. Exemplar de bagre-africano, *Clarias gariepinus* (BURCHELL, 1822) de 385g. (Fotografado por BELÃO, T.C.)

Uma das primeiras descrições do órgão de respiração aérea (ABO) desta família foi feita por GEOFFROY ST. HILAIRE (1802) para *Silurus* (= *Clarias*) *anguillaris*. O ABO deste gênero é composto de um par de câmaras suprabranquiais localizadas na parte posterior-dorsal da cavidade opercular e quase totalmente preenchido por órgãos arborescentes, que são extensões das partes mais elevadas dos 2^{os} e 4^{os} arcos branquiais (Fig. 7). A abertura de cada câmara possui leques branquiais que são extensões das últimas lamelas branquiais que se fundiram durante o desenvolvimento ontogenético. A superfície mais interna destas câmaras, a base, as paredes interiores da câmara e as superfícies arborescentes são todas envolvidas por um epitélio branquial modificado e vascularizado que auxilia a função respiratória aérea (MOUSSA, 1956, 1957; MUNSHI, 1962, 1976; SINGH et al., 1982).

Na última década, estudos realizados com o bagre-africano, *Clarias gariepinus*, abrangeram diversas áreas como crescimento, reprodução, parasitas naturais, comportamento,

toxinas e genética (PANTASIS & NEOFITOU, 2004; NA-NAKORN et al., 2004; CAVACO, 2005; YILMAZ, 2005; MAUGUIT & VANDEWALLE, 2007; KONAS et al., 2010; OLURIN & OLUWO, 2010; AKOLL et al., 2012; ENYIDI et al., 2013; NDIMELE & OWODEINDE, 2012; MARIMUTHU et al., 2013; MUKAI et al., 2013; VAN RENSBURG et al., 2013; WANG et al., 2013). Além disso, as respostas cardiorrespiratórias frente à hipóxia foram estudadas por BELÃO et al. (2011) e serviram de piloto para o presente estudo. Contudo, a localização, distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais, responsáveis pela origem da modulação destas respostas, ainda não foram identificados o que torna o presente estudo de grande relevância, principalmente para comparação com outras espécies de RA.



(Graham, 1997)

Figura 7. Peixe de respiração aérea generalizado “*Aeroespirichthys*” ilustrando os ABOs conhecidos atualmente, incluindo: superfície epitelial modificada dentro da cavidade bucal (**Br**); (**F**) faríngeal; esôfágica (**E**); opercular (**O**), como também nas brânquias (**B**), na pele (**S**), no estômago (**Es**) e no intestino (**I**). Espaços modificados incluem a câmara suprabranquial (**SB**), e sacos faríngeos (**SF**). Câmaras modificadas incluem o ducto pneumático (**DP**) e pulmão ou bexiga natatória (**P-BN**). Projeções dentro destes espaços incluem o labirinto (**L**), dendritos (**D**) e leques branquiais (**LB**). **Fonte:** Adaptado de GRAHAM (1997).

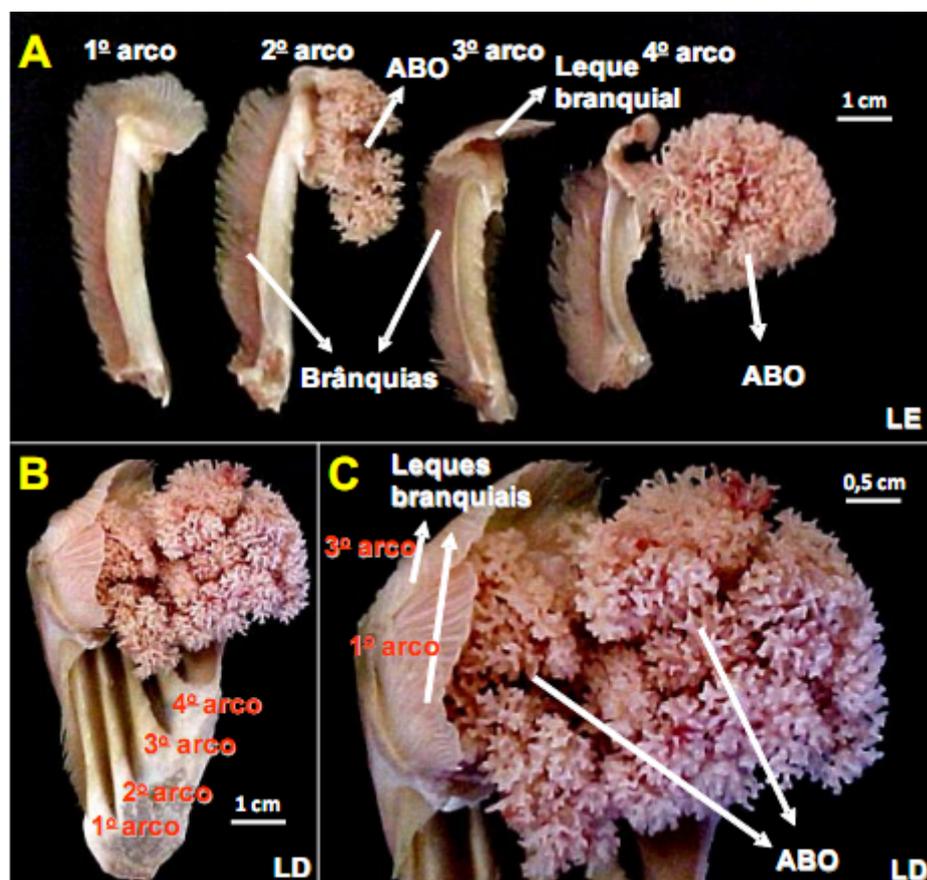


Figura 8. Fotografias das estruturas morfofuncionais de respiração de um bagre-africano, *Clarias gariepinus* (~ 1,7 kg). **A**– Vista dos arcos branquiais separados; **B** – Vista dos arcos branquiais unidos; **C** – Vista dos leques branquiais e do ABO; **LE** – lado esquerdo, **LD** – lado direito. **Fonte:** Adaptado de GLASS & RANTIN (2009).

1.5. SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMICO E O CONTROLE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM PEIXES

A função cardíaca dos peixes normalmente está sob o controle do sistema nervoso autônomo, o qual possui gânglios neurais eferentes que fazem sinapse no coração (NILSSON, 1983; SANDBLOM & AXELSSON, 2011). O coração dos teleósteos e os elasmobrânquios são inervados por fibras colinérgicas que percorrem todo o nervo vago e alcançam o seio venoso mediante os ductos de Cuvier. Terminais do nervo vago são encontrados no seio venoso, no tecido marca-passo, nas paredes do átrio, na junção átrio-ventricular (AV), porém não no ventrículo (SANTER, 1985). Esta inervação colinérgica parassimpática geralmente é inibitória e atua no receptor muscarínico do marca-passo e dos tecidos atriais deprimindo a frequência cardíaca e sua excitabilidade. Entretanto, a inervação vagal é estimulatória no coração da lampreia e provoca seus efeitos através de receptores nicotínicos (SANTER, 1985). O coração de elasmobrânquios e linguado da família Pleuronectidae parecem não ter inervação simpática (COBB & SANTER, 1973; DONALD & CAMPBELL, 1982; NILSSON, 1994; SANDBLOM & AXELSSON, 2011). Contudo, o coração da maioria dos peixes é inervado também por fibras nervosas simpáticas adrenérgicas que são normalmente excitatórias e atuam mediante receptores adrenérgicos aumentando a contratilidade e a f_H do miocárdio (NILSSON, 1983; SANTER, 1985; SANDBLOM & AXELSSON, 2011). Estas fibras nervosas simpáticas percorrem ao longo do nervo vago e alcança o coração inervando todas as partes do miocárdio dos peixes (GAMPERL & SHIELS, 2014).

O ritmo intrínseco das células marca-passo que define o batimento cardíaco dos peixes, conhecido como f_H basal, varia significativamente entre as espécies. Esta f_H basal pode variar com a temperatura ou a história de aclimação das espécies, como, por exemplo: (1) à temperatura de 10-12°C a f_H basal dos ciclóstomos é ~15 bpm, enquanto ela varia entre 30 à 50 bpm nos teleósteos (FARREL & JONES, 1992); (2) a f_H basal tem um Q_{10} de ~2,0-2,5, isto é, a f_H basal duplica quando a temperatura aumenta a cada 10°C; (3) truta arco-íris quando aclimatada à 4°C tem uma f_H basal de 61 bpm, mas quando aclimatada a 17°C tem uma f_H basal de 48 bpm (AHO & VORNANEN, 2001). Apesar disso, a taxa que o coração dos peixes normalmente contrai é raramente a f_H basal, pois a f_H também depende do balanço entre a estimulação nervosa parassimpática e simpática, da tensão do miocárdio e dos hormônios circulantes, como, por exemplo, as catecolaminas (FARREL & JONES, 1992). Os sistemas colinérgicos e adrenérgicos possuem efeitos antagonistas no coração, sendo que o primeiro diminui a f_H enquanto o segundo a aumenta. A contribuição destes dois sistemas no ajuste da

f_H é estimado pelo cálculo do tônus adrenérgico e colinérgico do coração realizado através de bloqueadores farmacológicos (ver *item 3.7.*). Entretanto, é difícil comparar os tônus adrenérgicos e colinérgicos, pois eles variam significativamente entre às espécies (desde 10% à 80 %) e também porque são dependentes da temperatura (FARREL & JONES, 1992; SANDBLOM & AXELSSON, 2011). Por exemplo, aclimação ao frio por no mínimo 2 semanas pode aumentar (*Scyliorhinus canicula*, TAYLOR et al., 1977; truta arco-íris, WOOD et al., 1979) ou diminuir (*Anguilla anguilla*, SIEBERT, 1979) o tônus colinérgico, enquanto o tônus adrenérgico demonstrou sempre diminuir (WOOD et al., 1979).

Diante disto, e pela falta de dados que comparem os tônus autonômicos do coração de espécies de respiradores bimodais, o presente trabalho estudou os tônus colinérgico e adrenérgico no bagre-africano, *C. gariepinus*, um respirador aéreo facultativo de ambiente tropical.

1.6. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO CIANETO

O cianeto [ácido hidrociânico (HCN) ou ácido prússico] é um dos venenos com ação mais rápida levando as vítimas a óbito após alguns minutos de exposição (WEGER, 1983; KLAASSEN, 2001). Na pesquisa científica, o cianeto de sódio (NaCN) tem sido utilizado em estudos nos diversos grupos de vertebrados. Ele é conhecido por estimular todos os quimiorreceptores de O_2 , incluindo os quimiorreceptores dos corpos carotídeos em mamíferos (MILLIGAN & LAHIRI, 1981; FRANCHINI & KRIEGER, 1993) e os quimiorreceptores de O_2 branquiais de peixes (BURLESON & MILSOM, 1990; McKENZIE et al., 1991a). Ele atua bloqueando a fosforilação oxidativa (BURLESON et al., 1992), mais especificamente o Complexo IV (citocromo *c* oxidase) da cadeia respiratória, que encontra-se na membrana interna da mitocôndria. Este bloqueio é devido o NaCN possuir grande afinidade pela forma férrica (Fe^{3+} ; citocromo a_3), mas não a forma ferrosa (Fe^{2+} ; citocromo a_2) deste complexo. Desta forma, o cianeto liga-se rapidamente ao íon férrico, impedindo seu retorno ao estado ferroso. Com isso, ele bloqueia toda a cadeia respiratória e impede que os elétrons sejam transferidos para seu receptor final, um átomo de oxigênio, que captaria dois prótons H^+ para formar água. Apesar da existência de O_2 dentro da célula, o NaCN bloqueia sua utilização, o que inibe a respiração celular resultando e promove uma acidose láctica e hipóxia citotóxica (Fig. 9) (KLAASSEN, 2001).

No caso do presente trabalho, o NaCN foi utilizado no bagre-africano a fim de identificar a orientação dos quimiorreceptores de O_2 branquiais, se estão orientados

externamente, monitorando as alterações da PO_2 da água inspirada possivelmente através de quimiorreceptores de O_2 presentes na extremidade das lamelas secundárias (Fig. 3), ou internamente, monitorando a PO_2 do sangue arterial possivelmente presentes nas artérias aferentes e eferentes e no seio venoso central (Fig. 3).

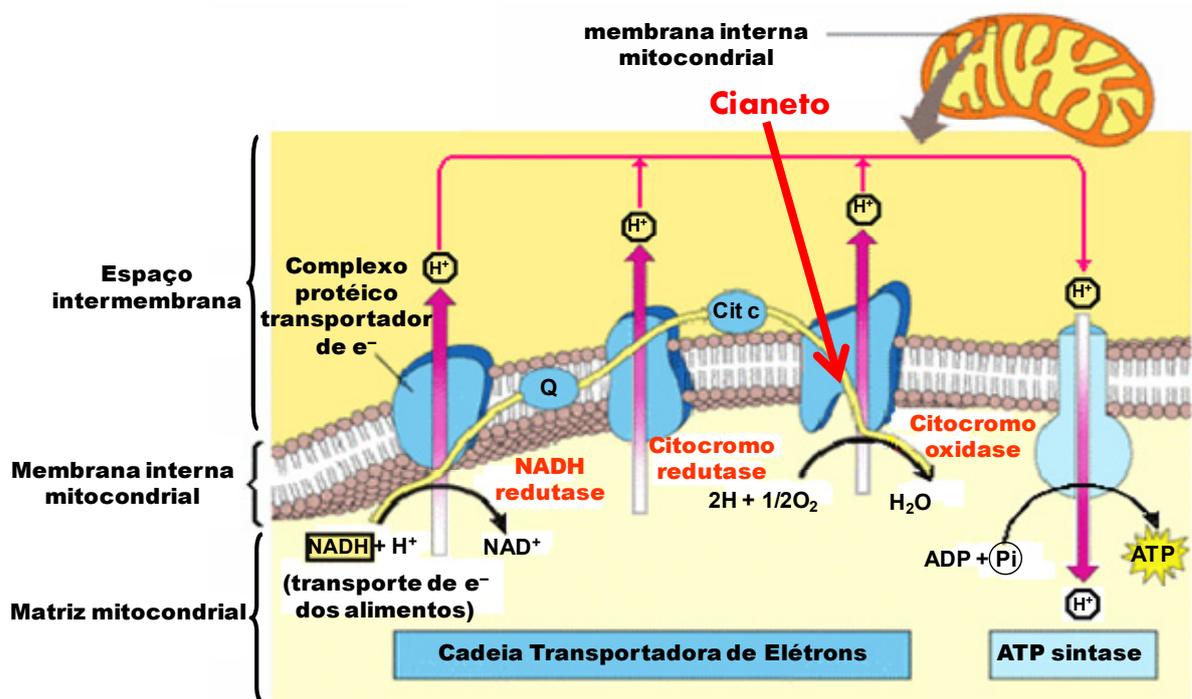


Figura 9. Ilustração do sítio de ligação do cianeto inibindo o transporte de elétrons (e^-) na membrana interna da mitocôndria, impedindo a utilização do O_2 e produção de ATP.

1. OBJETIVOS

1.1. PRINCIPAL

Entender e analisar a origem dos finos ajustes respiratórios e cardíacos de *Clarias gariepinus* frente a simulações de hipóxia ambiental em laboratório.

2.1 DEMAIS OBJETIVOS

O presente projeto teve por objetivos:

I. Determinar a localização dos quimiorreceptores de O₂ branquiais de *C. gariepinus*, verificando se estão restritos aos 1^{os} arcos branquiais ou distribuídos pelos quatro pares de arcos branquiais;

II. Determinar a orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais de *C. gariepinus*, verificando se estão orientados internamente (monitorando as variações da PO₂ no sangue) ou externamente (monitorando a PO₂ na água que passa pela corrente ventilatória);

III. Avaliar como esses quimiorreceptores de O₂ branquiais medeiam às alterações das variáveis cardiorrespiratórias (taxa metabólica - $\dot{V}O_2$ e extração da corrente ventilatória - EO_2 ; f_H ; \dot{V}_G ; V_T e f_R) em resposta à hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico;

IV. Avaliar como esses quimiorreceptores de O₂ branquiais medeiam às alterações das variáveis cardiorrespiratórias (f_H ; V_{AMP} ; f_{RA} e f_R) em resposta à hipóxia gradual *com* acesso ao ar atmosférico;

V. Verificar a ocorrência de alterações na f_H associadas a RA e o seu controle pelo sistema nervoso autônomo (tônus colinérgico e adrenérgico).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

Exemplares de bagre africano, *Clarias gariepinus* ($Wt \sim 200 - 350$ g) foram obtidos em criações comerciais no município de São José do Rio Preto, SP. Os exemplares foram mantidos no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar, em tanques de 1.000 L, com fluxo contínuo de água normóxica ($PwO_2 \sim 140$ mmHg) não clorada e a temperatura de 25 ± 1 °C. Ao chegarem ao laboratório os animais foram tratados, durante 1 semana, com antibiótico (cloridrato de tetraciclina 250 mg em 500 L) e fungicida (cetoconazol 200 mg em 500L) para se evitar mortes por infecções. Os animais foram mantidos neste tratamento durante toda a noite e parte da manhã, sendo a água trocada no período da tarde, onde novo tratamento era realizado. Após este período, os animais foram alimentados *ad libitum* com ração com 32% de proteína. Antes dos protocolos experimentais, os peixes foram mantidos em jejum por 48 h para se evitar a eliminação de produtos de excreção dentro dos respirometros ou do sistema de RA (descrito nos item 3.4 e 3.5, respectivamente).

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

A anatomia de *C. gariepinus* não permite o acesso para a secção dos nervos cranianos como realizado em outras espécies já estudadas em nosso laboratório, tais como traíra, *Hoplias malabaricus* (SUNDIN et al., 1999), trairão, *Hoplias lacerdae* (MICHELI-CAMPBELL et al., 2009), tambaqui, *Colossoma macropomum* (SUNDIN et al., 2000, FLORINDO et al., 2004; 2006), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (LEITE et al., 2007), e jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (LOPES et al., 2010). No caso do bagre africano, os ramos dos nervos cranianos IX e X estão cobertos por músculos da ventilação os quais impedem o acesso para secção seriada. Assim sendo, para verificar se os quimiorreceptores branquiais de O_2 estão restritos ao 1º par de arcos branquiais, optou-se pelo método de PERRY & REID (2002).

Para realizar este método (PERRY & REID, 2002), Os animais foram previamente anestesiados (ver o item 3.3.1) e os 1ºs arcos branquiais de cada lado do animal foram firmemente prendidos com linha de sutura e tesoura hemostática tanto na parte anterior quanto na posterior. Após isto, realizou-se a remoção do 1º par de arcos branquiais com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Em seguida, os cotos foram cauterizados para evitar

hemorragias durante a recuperação pós-operatória. Este procedimento remove toda a superfície funcional respiratória dos 1^{os} arcos branquiais e, conseqüentemente, os quimiorreceptores de O₂ ali presentes, impedindo que as aferências nervosas destes arcos levem informações ao SNC, nos centros cardíacos e respiratórios.

De acordo com DAVIS (1971), a extirpação do primeiro par de arcos branquiais causaria uma redução aproximada de 30% da superfície de área branquial. Embora a redução de 30% da área branquial, *per se*, tenha pouco impacto nos níveis de gases do sangue arterial em peixes em repouso (DAVIS, 1971; JULIO et al., 2000), a ablação bilateral dos primeiros arcos branquiais demonstrou uma significativa diminuição da PaO₂ em truta (DAVIS, 1971). No entanto, este efeito foi atribuído principalmente à destruição da pseudobrânquia seguida da interrupção de seu suprimento de sangue do que pela perda da superfície de área branquial (DAVIS, 1971). Assim, devido *Clarias gariepinus* não apresentar pseudobrânquia e seus ABOs serem extensões dos 2^{os} e 4^{os} arcos branquiais, a ablação dos 1^{os} pares de arcos branquiais não alterariam a PaO₂ destes animais durante hipóxia e em repouso.

Diante disso, dois grupos experimentais foram testados: **a)** um grupo controle, denominado grupo GC, possuindo as brânquias totalmente intactas e **b)** um grupo com os 1^o par de arcos branquiais removidos cirurgicamente, denominado como grupo desbranquiado (grupo GD).

Os dois grupos experimentais (GC e GD) foram submetidos aos posteriores procedimentos cirúrgicos, sendo que o grupo GD ficou em repouso por 72 h após a ablação dos 1^{os} arcos branquiais. Os dois grupos experimentais foram submetidos aos seguintes protocolos experimentais:

a. Protocolo Experimental I: Determinação dos parâmetros cardiorrespiratórios durante hipóxia gradual e *sem* acesso ao ar atmosférico (respirometria; $n = 10$, para cada grupo experimental);

b. Protocolo Experimental II: Determinação dos parâmetros cardiorrespiratórios durante hipóxia gradual *com* acesso ao ar atmosférico (sistema de RA, $n = 9$, para cada grupo experimental);

c. Protocolo Experimental III: Identificação e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais (sistema de RA, $n = 12$, para cada grupo experimental);

d. Protocolo Experimental IV: Relação entre o controle autonômico e a frequência cardíaca pré- e pós-respiração aérea (câmaras de contenção; $n = 10$, cada grupo experimental).

3.3. PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS

3.3.1. Procedimentos Cirúrgicos

Os peixes foram previamente anestesiados em solução de benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) até seus movimentos ventilatórios cessarem, cerca de 3 a 5 minutos. Após isto, os animais foram pesados e transferidos para uma mesa cirúrgica, onde suas brânquias foram ventiladas artificialmente com uma solução diluída de benzocaína ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$) (Fig. 9). Uma cânula de polietileno (PE 90) foi implantada dentro da cavidade bucal (Protocolos Experimentais I a III) através de uma perfuração na região dorsal no palato. Outras duas cânulas foram implantadas em cada borda dos opérculos (PE 60 - Protocolo Experimental I), e mais uma outra cânula (PE 10) foi introduzida na veia caudal (Protocolos Experimentais III e IV).

A cânula bucal foi conectada primeiramente a uma torneira de três vias que possibilitou os seguintes procedimentos: **(a)** a formação de uma coluna d'água para os registros das ondas ventilatórias, posteriormente utilizadas para medição da frequência respiratória (f_R - Protocolo I à III), da ventilação branquial (\dot{V}_G - Protocolo I) e da amplitude ventilatória (V_{AMP} - Protocolo II e III) ao se conectar esta cânula bucal à um transdutor de pressão; **(b)** a coleta de amostras de água do interior da cavidade bucal, antes de passar pelas brânquias, para as medidas da PO_2 da água inspirada ($P_{insp}O_2$ - Protocolo I à III) e **(c)** a injeção da droga estimuladora dos quimiorreceptores de O_2 branquiais na corrente ventilatória (Protocolo III). Assim, para a obtenção dos registros das variações de pressão intrabucal, uma das saídas da torneira de três vias foi conectada a um transdutor de pressão (Utah Medical Products), acoplado a um amplificador de pressão (AECAD 0804 - AVS, São Paulo) e este, por sua vez, enviou sinais para uma placa de aquisição de dados (WinDaq - WinDaq/Lite Waveform Recording Software® - DATAQ DI-194 Serial Port Data Acquisition Module) instalada em um microcomputador compatível.

As cânulas operculares serviram para coletar amostras da água que passaram pelas brânquias (água expirada, $P_{exp}O_2$ - Protocolo Experimental I).

A cânula introduzida na veia caudal e preenchida com solução salina heparinizada ($\text{NaCl } 0,9 \%$, 100 UI.mL^{-1} de heparina) teve por objetivo introduzir diretamente na corrente sanguínea a droga estimuladora dos quimiorreceptores de O_2 branquiais (injeções internas de NaCN , Protocolo III) e injeção de drogas agonistas e antagonistas muscarínicas e β -adrenérgicas (Protocolo IV) (SUNDIN et al., 2000; FLORINDO et al., 2004; 2006; LEITE et al., 2007). Para isto, a cânula caudal foi conectada a uma torneira de três vias onde em uma das saídas encontrava-se uma seringa com uma solução determinada por cada protocolo

experimental, e a outra saída com uma seringa contendo salina heparizada (ver detalhes no item 3.6 e 3.7).

Para as medidas da frequência cardíaca por eletrocardiografia (ECG), foram implantados dois eletrodos de ECG (Protocolos Experimentais I à IV) na musculatura ventral dos peixes, sendo: **a)** um eletrodo principal (+) inserido ventralmente entre as brânquias e o coração e **b)** um segundo eletrodo (-) inserido na musculatura acima da linha lateral e na extremidade da nadadeira pélvica (Fig. 9) (GLASS et al., 1991; RANTIN et al., 1993). Um terceiro eletrodo (referência) foi preso a uma grade de aço inoxidável e mantido dentro da água do sistema experimental durante os experimentos. Esta preparação resultou em um eletrocardiograma típico da derivação DI da eletrocardiografia padrão.

Após os procedimentos cirúrgicos, os peixes foram transferidos para em seus respectivos sistemas experimentais ou o de respirometria *sem* acesso ao ar atmosférico (Protocolo Experimental I – Fig. 10) ou o sistema de RA (Protocolos Experimentais II à IV – Fig. 11) (ver detalhes em RANTIN et al., 1996; 1998). Os animais foram mantidos nestes sistemas com água normóxica ($PwO_2 > 130$ mmHg) e com temperatura controlada em cerca de 25 ± 1 °C para recuperação pós-cirúrgica de no mínimo 12 horas (“overnight”).

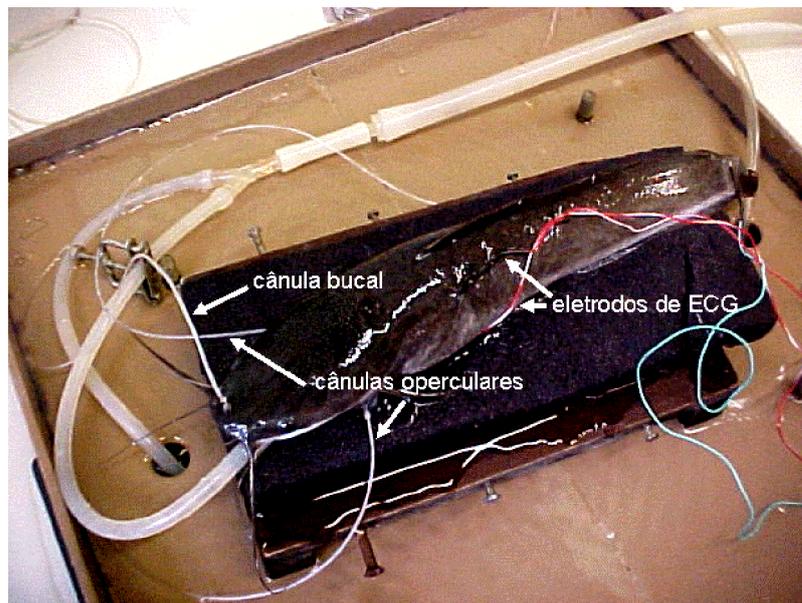


Figura 10. Exemplar de bagre-africano, *C. gariepinus*, anestesiado sobre a mesa cirúrgica com cânuas de polietileno implantadas na boca e nas bordas de ambos os opérculos e os eletrodos de ECG implantados próximo à cavidade cardíaca e na musculatura acima da linha lateral.

3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL I – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DURANTE HIPÓXIA GRADUAL E SEM ACESSO AO AR ATMOSFÉRICO

Após os procedimentos cirúrgicos, os peixes ($n = 10$) foram colocados dentro de um respirômetro de fluxo constante (~ 3 L; ver detalhes em RANTIN & JOHANSEN, 1984; RANTIN et al., 1993) e este posicionado dentro de um tanque experimental (30 L). Após recuperação pós-operatória, medidas da PO_2 da água de entrada do respirômetro (P_eO_2 – mmHg) e saída do respirômetro (P_sO_2 – mmHg) foram monitoradas constantemente através de um analisador de O_2 FAC-204A (FAC, São Carlos, SP) que teve seu eletrodo calibrado com solução de Borax saturada com sulfito de sódio (solução para calibração de $PO_2 = 0$ mmHg, correspondente à 0% de saturação de O_2) e com água aerada até sua total saturação com O_2 atmosférico ($P_wO_2 = 140$ mmHg). O fluxo constante de água através do respirômetro foi regulado em função da manutenção adequada de uma diferença de aproximadamente 10 20 % entre a P_eO_2 e a P_sO_2 (Fig. 10).

Neste protocolo experimental foram calculados as medidas da taxa metabólica ($\dot{V}O_2$), da extração de oxigênio da corrente ventilatória (EO_2), da frequência de respiração (f_R), da ventilação branquial (\dot{V}_G), do volume ventilatório (V_T) e da frequência cardíaca (f_H).

A taxa metabólica ou tomada de O_2 - $\dot{V}O_2$ - foi calculada como:

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

sendo α = coeficiente de solubilidade do O_2 na temperatura experimental e pressão barométrica local; V_R = fluxo através do respirômetro ($mLH_2O \cdot min^{-1}$) e W_T = peso do animal (kg). Os valores de $\dot{V}O_2$ foram expressos em $mLO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$.

A frequência respiratória - f_R - foi medida pelos registros do mesmo sistema “transdutor-amplificador-microcomputador”, anteriormente descrito, através da contagem direta dos picos de pressão positiva durante o ciclo respiratório. A f_R foi expressa em $resp \cdot min^{-1}$.

A ventilação branquial - \dot{V}_G - foi calculada como:

$$\dot{V}_G = \frac{(P_eO_2 - P_sO_2) \cdot V_R}{W_T}$$

onde: $P_{\text{insp}}\text{O}_2 = PO_2$ (mmHg) da água inspirada, registrada pela água advinda da cânula bucal conectada ao eletrodo do analisador de O_2 e $P_{\text{exp}}\text{O}_2 = PO_2$ (mmHg) da água expirada, registrada pela água advinda da cânula opercular conectada ao eletrodo do analisador de O_2 . Os valores de \dot{V}_G foram expressos em $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

O volume ventilatório - V_T - foi calculado dividindo-se a \dot{V}_G pela f_R e expresso em $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{resp}^{-1}$.

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

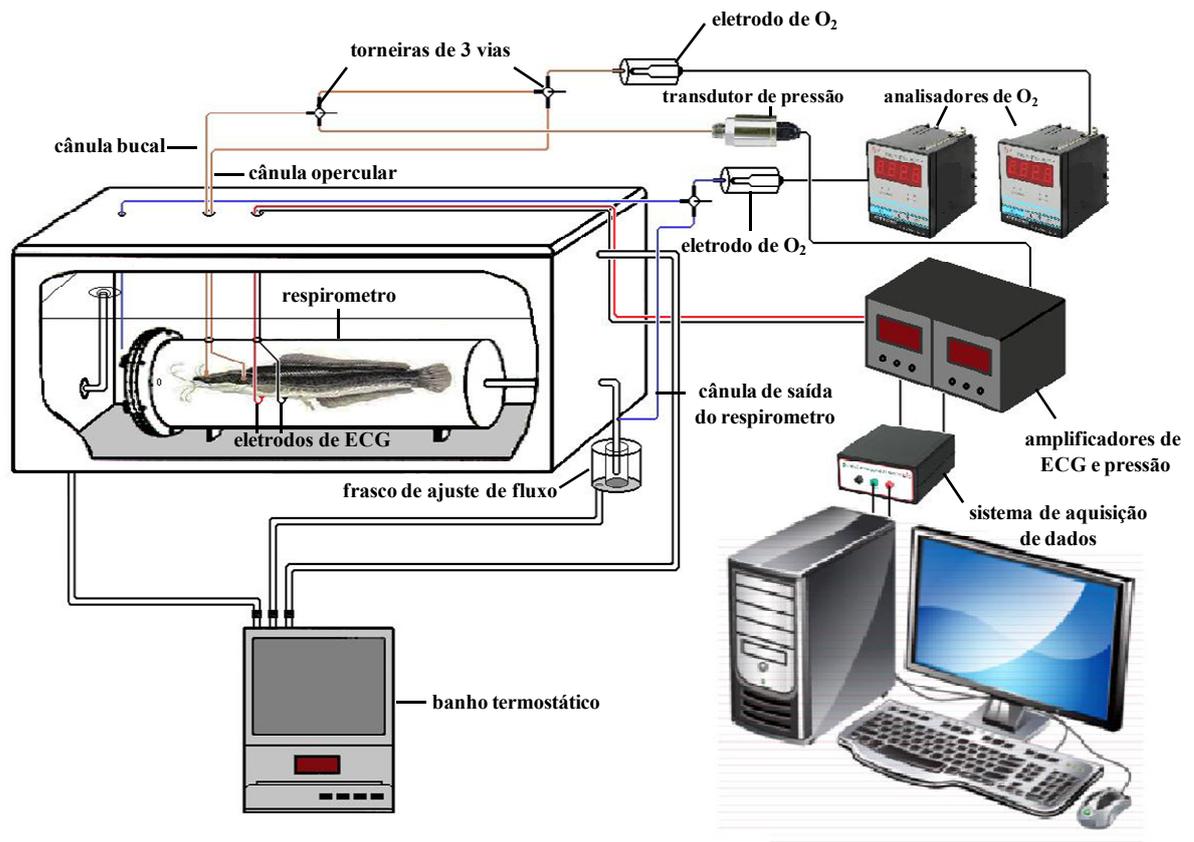


Figura 11. Ilustração do sistema de respirometria utilizado na obtenção dos dados de $\dot{V}O_2$, \dot{V}_G , f_R , V_T e f_H .

3.4.1. Respostas Cardiorrespiratórias à Hipóxia Gradual

Após o ajuste do fluxo de água através do respirômetro e calibração do analisador de O_2 , iniciou-se o protocolo experimental, cujos registros cardiorrespiratórios foram continuamente gravados até o término do experimento.

Primeiramente, foram tomados os dados das variáveis cardiorrespiratórias ($\dot{V}O_2$, EO_2 , f_R , V_T , \dot{V}_G e f_H) durante normóxia ($PwO_2 = 140$ mmHg) e, a seguir, os peixes foram submetidos à hipóxia gradual nas seguintes PwO_2 : 100, 70, 50 e 30 mmHg por 30 min em cada P_eO_2 experimental. As diferentes PO_2 hipóxicas foram obtidas borbulhando-se N_2 na água do tanque experimental. Estas PwO_2 foram monitoradas constantemente por sifonamento ininterrupto da água advinda do sistema de respirometria, que percorria uma cânula de polietileno até uma cuveta contendo o eletrodo do analisador de O_2 FAC 204A, citado anteriormente. Este procedimento serviu para monitorar as diferentes PwO_2 e foi utilizado nos Protocolos Experimentais de hipóxia gradual (Protocolos I à II).

Este protocolo experimental teve por objetivo comparar os dados dos parâmetros cardiorrespiratório dos grupos GC e GD e calcular suas respectivas tensões/pressões parciais crítica de O_2 (PcO_2 - mmHg).

3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL II: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DURANTE HIPÓXIA GRADUAL E COM ACESSO AO AR ATMOSFÉRICO

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais ($n = 9$) foram levados a um sistema projetado e construído para medição, principalmente, da frequência de respiração aérea (f_{RA}). O sistema dispõe de duas câmaras superpostas, a superior, onde o peixe foi mantido durante o experimento, e a inferior, utilizada para ajustar os diferentes níveis de PwO_2 através de borbulhamento de N_2 na água (Fig. 11). A água da câmara inferior foi continuamente bombeada para a câmara superior e drenada novamente para a inferior através de um sifão, a fim de manter o nível de água. As variações da PwO_2 (normóxia e hipóxia) foram monitoradas continuamente como descrito no *item 3.4.1*.

O formato da câmara superior permitiu os animais permanecerem no fundo e realizar movimentos de forrageamento, além dos comportamentos de respiração aérea. Este compartimento é dotado de dois ventiladores na superfície aquática, os quais mantêm um fluxo de ar unidirecional que forma “túnel de ar”. Este “túnel de ar” é necessário para remover todo o excesso de N_2 difundido da água para o ar e, por conseguinte, manter uma composição

constante de ar atmosférico semelhante ao da natureza sobre a superfície aquática para respiração aérea efetuada pelo bagre-africano.

As subidas dos peixes à superfície aquática para a tomada de O_2 do ar atmosférico foram constantemente monitoradas. Devido este sistema possuir a parte frontal em acrílico transparente, foi possível quantificar a frequência de tomada de ar atmosférico/frequência de respiração aérea ($f_{RA} - RA \cdot h^{-1}$). A f_{RA} foi registrada pela contagem direta das subidas do animal, para tomadas do ar atmosférico, monitoradas por meio de uma câmera Fujika® – FK-586 C/B acoplada a um monitor de vídeo Broksonic® - CERTC- 2808 UL (Fig. 11). Tanto o monitor de vídeo quanto o computador utilizado para os registros cardiorrespiratórios estavam localizados atrás do sistema experimental, sendo que o animal não foi perturbado pela presença do experimentador, o que poderia inibir seus comportamentos naturais.

Neste protocolo experimental foram calculadas as medidas da f_R , da amplitude ventilatória (V_{AMP}), da f_{RA} e da f_H . Os parâmetros f_R e f_H foram medidos do mesmo modo como anteriormente descrito no *item 3.4* e a f_{RA} está descrita no parágrafo anterior.

A V_{AMP} foi medida pelos registros do mesmo sistema “transdutor-amplificador-microcomputador), acima descrito, através do cálculo da variação do pico e vale dos dados controle (em normóxia), padronizados como sendo 100%, comparados com os dados experimentais (em hipóxia). A V_{AMP} foi expressa em porcentagem (%).

Os registros foram continuamente gravados durante todo o experimento, porém a análise para medição da f_R , V_{AMP} e f_H foi realizada apenas no primeiro minuto anterior e posterior as RAs. Esta padronização foi feita com o objetivo de determinar como os comportamentos de RA atuam nestes parâmetros cardiorrespiratórios e comparar se existe alguma resposta efetuada diferentemente do grupo GC para o GD, devido à ablação do 1º par de arcos branquiais. Além disso, este protocolo experimental avaliou como os comportamentos de RA estão relacionados à PcO_2 , calculada pelo Protocolo I, e se a quantificação dos comportamentos de RA são alteradas nos diferentes grupos experimentais.

Desta forma, os registros cardiorrespiratórios foram gravados durante as seguintes PwO_2 : 140 (normóxia), 100, 70, 50, 30, 20 e 10 mmHg e os peixes foram expostos por 1 h em cada tensão de P_wO_2 .

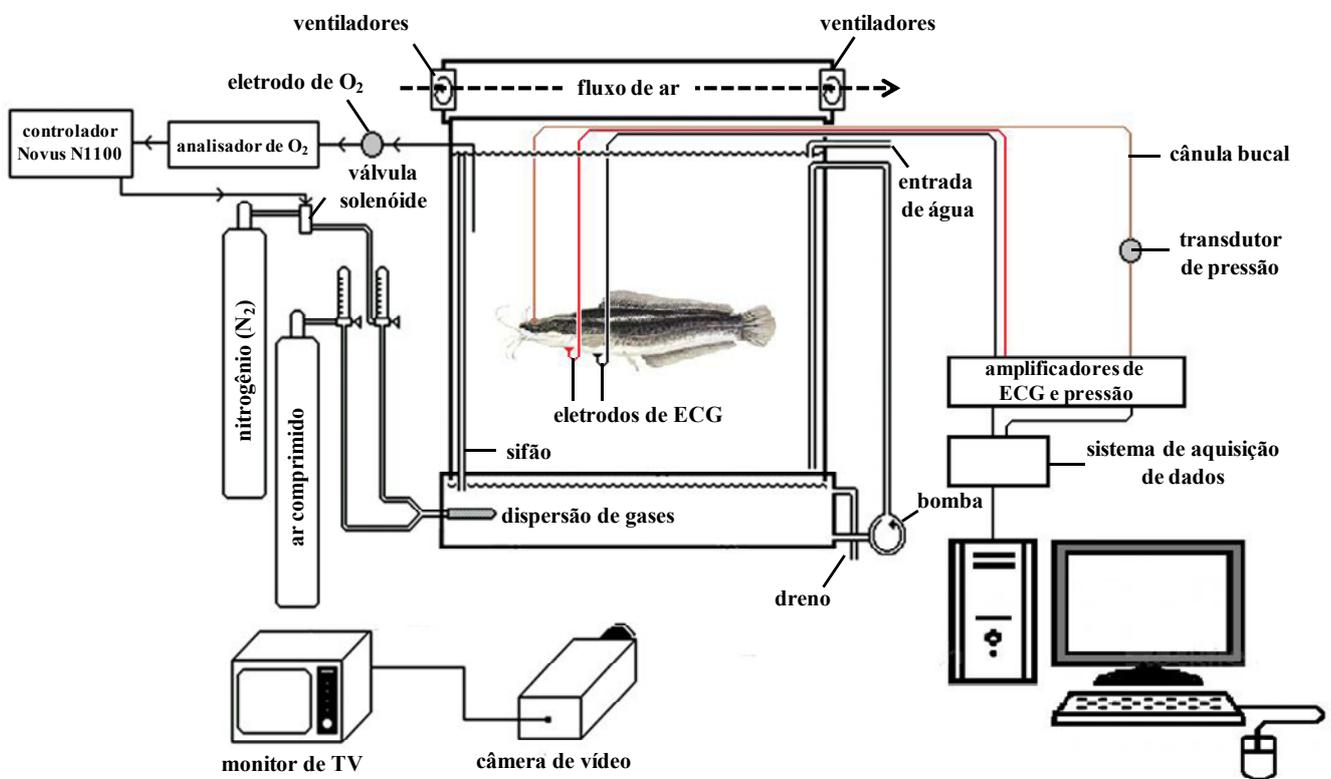


Figura 12. Ilustração do sistema experimental desenvolvido para animais de respiração aérea e utilizado na obtenção de dados de f_R , V_{AMP} , f_{RA} e f_H do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, exposto à hipóxia gradual.

3.6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL III: IDENTIFICAÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES DE O₂ BRANQUIAIS

Após os procedimentos cirúrgicos, os peixes foram levados ao mesmo sistema de RA (descrito no *item 3.6*), para recuperação pós-operatória durante toda noite (“overnight”), e mantidos em normóxia ($PwO_2 \sim 140$ mmHg). Na manhã seguinte, os cabos de ECG foram conectados aos seus respectivos equipamentos para gravação dos registros de ECG que foram utilizados, posteriormente, para medição da f_H . A cânula bucal foi conectada a uma torneirinha de três vias que deu acesso a gravação dos registros de respiração utilizados, posteriormente, para medição da f_R e da V_{AMP} a cânula caudal foi conectada a uma torneirinha de três vias para injeções internas de solução salina e NaCN.

A identificação e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquiais foram determinadas de acordo com o método de SUNDIN et al. (1999). Primeiramente, para determinar a concentração padrão a ser utilizada, foram realizadas injeções internas e externas crescentes de NaCN em *C. gariepinus* intactos ($n = 4$) para construção da curva dose-resposta. Iniciou-se a curva com as injeções externas devido os registros gravados retornarem mais rapidamente aos valores basais.

Desta forma, foram injetadas na cânula bucal 1,0 mL de solução controle (água) e 1,0 mL de soluções crescentes e subsequentes de NaCN (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0 mg.mL⁻¹). Estas injeções tiveram intervalos que variaram entre 5 à 15 min para que ocorresse o retorno dos registros gravados aos seus respectivos valores basais.

Após isto, foram injetadas na veia caudal 0,3 mL de uma solução salina/controlada (0,9 % de NaCl e 0,5 mL de heparina dissolvida em 100 mL de salina) e, posteriormente, soluções crescentes e subsequentes de NaCN (0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 e 2,0 mg.mL⁻¹ de NaCN em salina heparinizada). Estas injeções tiveram intervalos que variaram entre 15 à 30 min para que ocorresse o retorno dos registros gravados aos seus respectivos valores basais. É importante salientar que para realizar quaisquer injeções internas, primeiramente foi retirada toda a salina da cânula caudal e, então, injetado a solução determinada, seja salina ou de NaCN. Após isto, para limpar o volume da solução determinada e restante na cânula caudal, foi injetado o mesmo volume de salina retirado anteriormente.

Logo após a padronização da melhor concentração de NaCN a ser utilizada tanto nas injeções externas como nas internas, outros animais ($n = 12$ para cada grupo experimental, GC e GD), após passarem pelos devidos procedimentos cirúrgicos, foram levados à mesma ao

sistema de respiração aérea (Fig. 11) para recuperação pós-operatória durante toda noite (“overnight”) e mantidos em normóxia ($PwO_2 = 140$ mmHg). Na manhã seguinte, os cabos de ECG, cânula bucal e a cânula caudal foram conectados como descrito anteriormente. Os registros dos movimentos ventilatórios foram utilizados também para cálculo da V_{AMP} , como descrito no *item 3.5*. Além disso, os comportamentos dos animais foram continuamente monitorados para verificar as tomadas de ar atmosférico e medir a f_{RA} (como já descrito no *item 3.5*) durante as injeções externas e internas de NaCN.

Para o início deste protocolo experimental, as injeções externas e internas foram escolhidas de forma aleatória para cada animal, isto é, em alguns animais iniciou-se o protocolo experimental com as injeções internas e em outros com as injeções externas, sempre aguardando um período de cerca de 30 min entre cada injeção aplicada. Desta forma, foi possível verificar se a inversão das injeções produzia respostas fisiológicas diferentes em ambos os grupos experimentais (GC e GD), dando assim maior validade e confiabilidade dos resultados finais. Os parâmetros cardiorrespiratórios (f_R , V_{AMP} e f_H) foram analisados nos primeiros 4 min (10, 20, 30, 40, 50 e 60s; 120, 180 e 240s) e comparado com os valores pré-injeção e entre os grupos experimentais.

3.7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV: RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE AUTONÔMICO E A FREQUÊNCIA CARDÍACA PRÉ- E PÓS-RESPIRAÇÃO AÉREA

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram transferidos para o sistema de RA (Fig. 11) e mantidos em recuperação pós-operatória durante toda noite (“overnight”) em normóxia (~ 140 mmHg). Na manhã seguinte, os cabos de ECG foram conectados aos equipamentos já descritos para gravação dos registros de ECG a serem utilizados, posteriormente, para medição da f_H e cânula caudal foi conectada a uma torneirinha de três vias para injeções de drogas na corrente sanguínea.

Para relacionar o controle autonômico e a f_H pré- e pós-RA, realizou-se o mesmo protocolo experimental do respirador aéreo facultativo jeju, *Hoplerythrinus unitaenitatus* (McKENZIE et al., 2007). Primeiramente, a fim de assegurar que os efeitos das drogas antagonistas β -adrenérgica (propranolol) e muscarínica (atropina) estariam realmente bloqueando, respectivamente, o controle autonômico adrenérgico e colinérgico de *C. gariepinus*, realizou-se os seguintes suportes farmacológicos no bagre-africano ($n = 4$, para cada suporte farmacológico):

1.1) injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de adrenalina (agonista adrenérgico) e gravação dos registros de ECG durante 1 h;

1.2) injeção de 0,5 mL de 3,0 mg.Kg⁻¹ de propranolol dissolvido em salina heparinizada e, após 1 h de registro do ECG, injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de adrenalina e gravação dos registros de ECG por mais 1 h;

2.1) injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de acetilcolina (agonista muscarínico/colinérgico) e gravação dos registros de ECG durante 1 h;

2.2) injeção de 0,5 mL de 1,2 mg.Kg⁻¹ de atropina dissolvido em salina heparinizada e, após 1 h de registro do ECG, injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L⁻¹ de acetilcolina e gravação dos registros de ECG por mais 1 h.

Após assegurar que os efeitos das concentrações das drogas antagonistas β -adrenérgicas e muscarínicas estariam bloqueando os sistemas autonômicos adrenérgico e colinérgico de *C. gariepinus*, outros animais ($n = 10$) passaram pelos devidos procedimentos cirúrgicos e foram transferidos para o mesmo sistema de RA (Fig. 11) para recuperação pós-operatória durante toda noite (“overnight”) em normóxia ($P_wO_2 = 140$ mmHg). Na manhã seguinte, os cabos de ECG e a cânula caudal foram conectados aos seus respectivos equipamentos, como anteriormente descritos.

Após cerca de 1 h de gravação dos registros ECG contendo pelo menos uma RA, a qual serviu como f_H basal (valores pré-tratamento = **PT**), os animais foram infundidos primeiramente com 0,5 mL de 3,0 mg.Kg⁻¹ de propranolol (**prop**) dissolvido em salina heparinizada e seus registros foram gravados por cerca de 1 h.

Após este período, com os registros de ECG demonstrando ainda os efeitos do bloqueio autonômico adrenérgico, os animais foram infundidos com 0,5 mL de 1,2 mg.Kg⁻¹ de atropina (**P&A**) dissolvido em salina heparinizada, e seus registros foram novamente gravados por cerca de 1 h.

Para a padronização do cálculo do tônus colinérgico relativo (**Chol** - %) e do tônus adrenérgico relativo (**Adr** - %) utilizou-se as seguintes equações (ALTIMIRAS et al., 1997):

$$\text{Chol} = \frac{(\text{R-R})_{\text{prop}} - (\text{R-R})_{\text{P\&A}}}{(\text{R-R})_{\text{P\&A}}} \times 100, \quad (1)$$

$$\text{Adr} = \frac{(\text{R-R})_{\text{prop}} - (\text{R-R})_{\text{PT}}}{(\text{R-R})_{\text{P\&A}}} \times 100, \quad (2)$$

sendo R–R = tempo (em segundos) do intervalo de 10 R–R consecutivos do QRS do eletrocardiograma; PT = pré-tratamento/controle, prop = bloqueio com propranolol, bloqueador β -adrenérgico; P&A = completo bloqueio do sistema nervoso autônomo.

Os tónus colinérgico e adrenérgico foram calculados a partir dos 10 últimos picos do R–R pré-RA e dos 10 primeiros picos R–R pós-RA para cada animal dos grupos GC e GD. Após isto, foram calculadas as médias de ambos os tónus autonômicos dos grupos GC e GD.

3.8. ANÁLISE DOS DADOS

Primeiramente, os dados coletados (expressos em média \pm erro padrão) de todos os protocolos experimentais passaram por análises exploratórias através do teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a distribuição dos dados era normal e se apresentava uma distribuição Gaussiana (teste de normalidade). Na etapa seguinte, foram realizadas análises de variância de dois fatores para medidas repetidas ou “Two-way” ANOVA, a fim de verificar a variação dos dados coletados. Foi utilizada esta análise “Two-way” ANOVA devido os experimentos apresentarem dois fatores, sendo a ablação do 1º par de arcos branquiais uma das variáveis, e os respectivos protocolos experimentais (hipóxia gradual; injeção internas e externas de NaCN ou injeções de antagonistas muscarínicos e β -adrenérgicos) o segundo fator. Para se verificar a existência de diferença significativa entre as médias dentro de um mesmo grupo experimental (GC ou GD) com o seu controle (normóxia – Protocolo I e II, valores basais pré-injeção de NaCN interna e externa – Protocolo III, e valores basais pré-injeção de antagonistas colinérgicos e β -adrenérgicos, Protocolo IV) foi utilizado teste de *Dunnnett*. Além disso, foi utilizado o teste de hipótese de médias *Tukey* para verificar a existência de diferença significativa entre os valores dentro de um mesmo grupo, além de solidificar o teste *Dunnnett*.

Ainda, para se verificar a existência de diferença significativa das médias dos valores pré e pós-RA de um mesmo parâmetro (f_H , V_{AMP} e f_R), da mesma tensão de O_2 e de um mesmo grupo (GC ou GD) do Protocolo II (hipóxia *com* acesso ao ar atmosférico), foi utilizado o teste *t pareado* de Student.

Todos os testes citados foram realizados através do software para análise estatística **GraphPad InStat versão 3.0** (GraphPad software, San Diego, CA – EUA) e os resultados foram considerados significativos considerando $p < 0,05$.

Finalmente, para estimar os valores da tensão crítica de oxigênio (PcO_2) de *Clarias gariepinus* para ambos os grupos experimentais, GC e GD, foi plotada uma regressão

linear ($y = a + bx$) com os valores significativamente diferentes dos valores normóxicos. Esta regressão linear, por sua vez, ao ser projetada até a intersecção com a reta contendo a média dos valores que não diferenciam entre si, resultou no valor da PcO_2 (para mais detalhes, ver KALININ et al., 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL I: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DURANTE HIPÓXIA GRADUAL E SEM ACESSO AO AR ATMOSFÉRICO

Nestes experimentos, a PwO_2 foi reduzida de 140 mmHg para 100, 70, 50 e 30 mmHg para o GC e até 50 mmHg para o GD, pois neste grupo os animais demonstraram grande nível de estresse e hiperatividade. Os dados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, e nas Figuras 12 à 15 em função da PO_2 da água inspirada ($P_{insp}O_2$ – mmHg).

4.1.1. Taxa Metabólica, Tensão Crítica de O_2 e Extração de O_2

Os valores de $\dot{V}O_2$ dos grupos GC e GD frente à hipóxia gradual estão representados individualmente na Figura 12, enquanto que os dados de EO_2 estão apresentados na Figura 13. Durante normóxia, *C. gariepinus* apresentou médias de $\dot{V}O_2$ de $76,0 \pm 14,2$ e $44,6 \pm 2,8$ mL O_2 .kg $^{-1}$.h $^{-1}$, e de EO_2 de $48,9 \pm 3,0$ e $16,7 \pm 3,9\%$ para os grupos GC e GD, respectivamente.

A PcO_2 foi estimada para ambos os grupos GC e GD através da intersecção da reta das abscissas, que passa por entre os pontos compreendidos entre as $P_{insp}O_2$ de 123,6 e 62,7 mmHg para o GC e entre 129,1 e 65,7 mmHg para o GD (valores não significativos, cujas $\dot{V}O_2$ tiveram médias de 69,0 e 42,1 mL O_2 .kg $^{-1}$.h $^{-1}$ para os grupos GC e GD, respectivamente) e a reta de regressão ($y = a + bx$) que passa pelos pontos de valores estatisticamente diferentes, plotados abaixo da $P_{insp}O_2$ de 28 e 45 mmHg para os grupos GC e GD, respectivamente. A intersecção destas duas retas representa o ponto de inflexão abaixo do qual a espécie torna-se incapaz de acionar eficientemente os mecanismos homeostáticos cardiorrespiratórios, sendo denominado como tensão crítica de oxigênio (PcO_2).

Em normóxia, o GC de *C. gariepinus* apresentou $\dot{V}O_2$ média de $76,1 \pm 0,6$ mL O_2 .kg $^{-1}$.h $^{-1}$ a qual encontra-se entre os valores de outros teleósteos tanto de respiração exclusivamente aquática quanto os de respiração bimodal (Tab. 3). Ao contrário, sua PcO_2 (61 mmHg) é a mais elevada quando comparada tanto com os teleósteos de respiração exclusivamente aquática como com os de respiração bimodal de dentro e fora da ordem Silurimorfes (teleósteos que possuem barbilhões). Desta forma, pode-se afirmar que *C. gariepinus* não consegue manter as demandas de oxigênio necessárias para os tecidos quando o ambiente apresentar-se com saturações de O_2 abaixo de 43,6 % ($PcO_2 = 61$ mmHg). Isto é

observado através da diminuição linear da $\dot{V}O_2$ (Fig. 12), a qual chega a uma média de $27,5 \pm 1,1 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ na última $P_{\text{insp}}O_2$ (28,0 mmHg). Nesta hipóxia severa, os animais do GC apresentaram comportamentos de estresse e hiperatividade, provavelmente pelas tentativas de alcançar a superfície da água à procura de ar atmosférico para respirar, o que impediu a continuação do protocolo experimental. Segundo HOCHACHKA (1980), a primeira escolha de um teleósteo frente à hipóxia ambiental é sempre tentar sair desta situação ou, no caso de respiradores bimodais como o bagre-africano, subir a superfície respiratória para tomada de ar atmosférico. Porém, como tal escolha era inviável neste protocolo experimental de respirometria *sem* acesso ao ar, o bagre-africano respondeu semelhantemente aos teleósteos de respiração exclusivamente aquática, demonstrando uma segunda estratégia comportamental a de *esperar para ver*, isto é, reduzir ao máximo sua atividade comportamental e, conseqüentemente, sua taxa metabólica/consumo de O_2 . Desta forma, a presença de um comportamento de hiperatividade em busca de O_2 atmosférico, durante hipóxia moderada, concomitantemente a uma elevada PcO_2 , indicam que *C. gariepinus* é uma espécie mais dependente do O_2 atmosférico do que a maioria dos outros teleósteos de respiração bimodal acessória (Tab. 3).

Esta situação fisiológica é observada mais claramente no GD em que os animais apresentaram, em normóxia, $\dot{V}O_2$ de $43,6 \pm 2,8 \text{ mL}O_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, isto é, cerca de 42% menor que a $\dot{V}O_2$ do GC (Fig. 12). Esta baixa $\dot{V}O_2$ inicial impossibilitou *C. gariepinus* de ser submetido à última tensão de O_2 ($PeO_2 = 30 \text{ mmHg}$) quando comparado com o GC, o que foi observado através da hiperatividade dos animais manifestada na $P_{\text{insp}}O_2$ de 65,7 mmHg, provavelmente em busca do O_2 atmosférico, o que também determinou sua elevada PcO_2 (79 mmHg). Desta forma, estes animais não conseguem manter a demanda de O_2 para os tecidos quando a saturação de O_2 estiver abaixo de 56,5 % ($\sim 79 \text{ mmHg}$) devido a ausência do 1º par de arcos branquiais.

Durante normóxia, o GC mostrou uma EO_2 considerada baixa ($\sim 49\%$) em relação aos teleósteos de respiração exclusivamente aquática (ver Tabela 3). Estudos de FERNANDES et al. (1994) atribuem uma elevada EO_2 dos respiradores exclusivamente aquáticos às suas grandes áreas superficiais de troca-gasosa como, por exemplo, *Hoplias malabaricus* ($EO_2 = 83\%$; $331,38 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), *Hoplias lacerdae* ($EO_2 = 78\%$; $132,34 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) e *Piaractus mesopotamicus* ($EO_2 = 78\%$; $114,5 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) (RANTIN et al., 1992; FERNANDES et al., 1994; SEVERI et al., 1997; AGUIAR et al., 2001). Contrariamente, peixes de respiração bimodal, por possuírem ABO para tomada de O_2 do ar atmosférico, geralmente

apresentam reduzidas áreas branquiais de troca-gasosa. Como consequência, a EO_2 dessas espécies é geralmente muito menor, como, por exemplo, *Hoplerythrinus unitaeniatus* ($EO_2 = 71\%$; $56,38 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) e *Arapaima gigas* ($EO_2 = ; 77 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) que possuem áreas branquiais menos amplas do que as espécies citadas acima (FERNANDES et al., 1994; PERNA & FERNANDES, 1996; COSTA et al., 2007). Além disso, dois clariídeos já estudados, *C. batrachus* e *C. mossambicus* (= *C. gariepinus*) possuem área branquial similar à de *H. regani* e *H. unitaeniatus* (TAMURA & MORIYAMA 1976) o que sugere que o bagre-africano, *C. gariepinus*, também tenha uma reduzida área branquial. Ao considerarmos os princípios físicos relacionados na lei de Fick, o qual estabelece que a quantidade de O_2 que atravessa as superfícies de troca gasosa ($\dot{M}O_2$ em moles $O_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ de tecido) é determinada pela constante de difusão de Krogh (K) para a superfície de troca sendo área superficial (A), sua espessura (x) e o gradiente de difusão (expresso em pressão parcial - ΔPO_2), formulado na seguinte equação:

$$\dot{M}O_2 = (K \cdot A \cdot \Delta PO_2) \cdot x^{-1}$$

era esperado uma menor quantidade de O_2 atravessasse o aparato branquial de *C. gariepinus* e, conseqüentemente, apresentasse menor EO_2 que os peixes de respiração exclusivamente aquática. Apesar disto, suas brânquias foram suficientemente eficientes para manter uma adequada $\dot{V}O_2$ em normóxia e hipóxia moderada o que permite classificar *C. gariepinus* como uma espécie de respiração aérea oxirreguladora, segundo a definição de GRAHAM (1997).

Já o GD mostrou, desde normóxia, uma diminuição significativa na EO_2 ($22,1 \pm 3,2 \%$) quando comparada com GC, devido à ablação do 1º par de arcos branquiais. Como exposto acima sobre os princípios da lei de Fick, uma maior redução da área de superfície de troca gasosa (A) irá reduzir a quantidade de O_2 difundido entre os dois meios, no caso da água para o sangue arterial. Contudo, apesar desta baixa EO_2 , *C. gariepinus* parece manter um suprimento adequado de O_2 aos tecidos em normóxia. Estudos sobre morfometria nas brânquias do loricariídeo de respiração aérea facultativa, *Hypostomus plecostomus*, mostrou maior quantidade no número de filamentos branquiais nos 1ºs arcos e que esta quantidade diminui ao longo dos arcos branquiais mais posteriores (PERNA & FERNANDES, 1995). Estudos com outras espécies como outro respirador aéreo jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, e teleósteos de respiração exclusivamente aquática, como o pacu, *P. mesopotamicus*, a traíra, *H. malabaricus*, e o trairão, *H. lacerdae*, mostraram que os filamentos branquiais também

possuem seus comprimentos diminuídos a partir dos 1^{os} arcos branquiais para os 4^{os} arcos (FERNANDES et al., 1994; SEVERI et al., 1997). Assim, apesar de não haver informações sobre a morfometria branquial do bagre-africano, pode-se sugerir que os animais do grupo GD perderam o maior arco branquial em área de troca gasosa o que é visto pela grande diminuição da EO_2 desses animais de cerca de 66 % quando comparado a EO_2 do grupo GC, durante normóxia.

Durante hipóxia gradual, ocorreu uma diminuição progressiva da EO_2 no GC, a qual alcançou valores significativos antes da PcO_2 . Em hipóxia mais severa ($P_iO_2 = 28$ mmHg) a EO_2 alcançou os valores menores, sendo de $19,6 \pm 1,9$ %. Esses valores de EO_2 e PcO_2 sugerem que a presença do 1^o par de arcos branquiais é de vital importância para a extração de oxigênio do ambiente aquático durante hipóxia ambiental.

Contrariamente, o grupo GD mostrou uma manutenção da EO_2 durante a hipóxia gradual que ficou entre 18,5 e 24,2 %. Estudo com o respirador bimodal *Hypostomus regani* demonstrou um aumento da EO_2 passando de 20%, em normóxia, para mais de 40% durante hipóxia severa de 10 mmHg (MATIAS et al., 1998). Segundo os autores, este aumento da EO_2 provavelmente ocorre pelo recrutamento de lamelas secundárias que não possuíam um fluxo contínuo sanguíneo. Estudos com truta arco-íris através da remoção do 1^o par de arcos branquiais confirmam esta hipótese (DUTHIE & HUGHES, 1987). Durante normóxia e em repouso, os pesquisadores constataram que a espécie não apresentava a totalidade da superfície de troca gasosa preenchida com sangue. Entretanto, durante a exposição dos animais à natação forçada, truta arco-íris apresentou recrutamento de áreas lamelares ainda não utilizadas, sendo este fato comprovado pelo aumento da $\dot{V}O_2$ num patamar máximo. Assim sendo, a manutenção da EO_2 de *C. gariepinus* do grupo GD durante hipóxia gradual, mesmo em valores bem mais baixos que o grupo GC, pode estar relacionada ao contínuo recrutamento de lamelas secundárias dos arcos branquiais remanescentes os quais possivelmente não estariam totalmente preenchidos com sangue antes da ablação do 1^o par de arcos branquiais. No entanto, esta hipótese necessita ser comprovada experimentalmente.

Tabela 1. Valores médios (\pm S.E.M.) da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ e dos parâmetros cardiorrespiratórios obtidos do grupo controle (GC) de *Clarias gariepinus* ($n = 10$) em hipóxia gradual ($P_{\text{wO}_2} = 140, 100, 70, 50$ e 30 mmHg) sem acesso ao ar atmosférico.

$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	$\dot{V}\text{O}_2$ (mLO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹)	f_{R} (resp.min ⁻¹)	V_{T} (mLH ₂ O.kg ⁻¹ .resp ⁻¹)	\dot{V}_{G} (mLH ₂ O.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	EO_2 (%)	f_{H} (bpm)
123,6 \pm 1,6	76,1 \pm 0,6	38,8 \pm 1,0	11,7 \pm 0,9	768,8 \pm 25,3	48,9 \pm 3,0	43,4 \pm 1,4
88,6 \pm 1,3	69,6 \pm 0,7	42,5 \pm 1,6	24,3 \pm 0,6	1157,5 \pm 30,7	37,8 \pm 3,5	37,7 \pm 1,2
62,7 \pm 1,3	62,8 \pm 0,8	49,5 \pm 1,3	26,6 \pm 1,1	1425,0 \pm 53,0	33,6 \pm 3,4	32,5 \pm 1,3
45,0 \pm 1,5	57,7 \pm 1,1	51,2 \pm 1,0	29,6 \pm 0,3	1456,3 \pm 58,1	25,8 \pm 4,8	23,7 \pm 0,8
28,0 \pm 0,5	27,5 \pm 1,1	57,2 \pm 1,4	33,9 \pm 0,8	1545,7 \pm 63,5	19,6 \pm 1,9	19,2 \pm 2,0

Tabela 2. Valores médios (\pm S.E.M.) da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ e dos parâmetros cardiorrespiratórios obtidos do grupo desbranquiado (GD) de *Clarias gariepinus* ($n = 10$) durante hipóxia gradual ($P_{\text{wO}_2} = 140, 100, 70$ e 50 mmHg) sem acesso ao ar atmosférico.

$P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg)	$\dot{V}\text{O}_2$ (mLO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹)	f_{R} (resp.min ⁻¹)	V_{T} (mLH ₂ O.kg ⁻¹ .resp ⁻¹)	\dot{V}_{G} (mLH ₂ O.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	EO_2 (%)	f_{H} (bpm)
129,1 \pm 1,2	43,6 \pm 2,8	50,7 \pm 0,6	26,5 \pm 1,3	1316,1 \pm 60,8	22,1 \pm 3,2	47,7 \pm 2,7
95,2 \pm 2,3	40,5 \pm 3,2	51,7 \pm 0,6	29,8 \pm 2,2	2355,7 \pm 71,7	18,5 \pm 3,5	46,0 \pm 3,2
65,7 \pm 2,2	29,8 \pm 3,1	45,8 \pm 1,1	31,4 \pm 3,1	2524,2 \pm 112,9	20,4 \pm 1,9	38,0 \pm 4,8
49,5 \pm 2,2	16,9 \pm 4,6	48,0 \pm 1,7	31,5 \pm 5,5	884,3 \pm 244,2	24,2 \pm 2,8	38,1 \pm 5,3

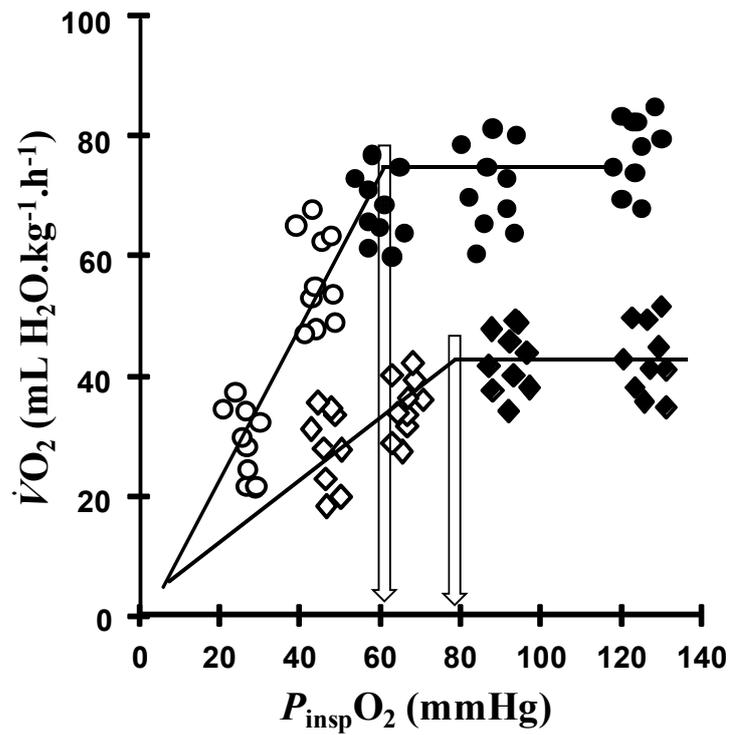


Figura 13. Efeito da redução das $P_{\text{insp}}O_2$ na tomada de oxigênio ($\dot{V}O_2$ - mL O_2 .kg⁻¹.h⁻¹) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico nos grupos GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$). As setas indicam a P_{CO_2} de ambos grupos (61 mmHg e 79 mmHg, respectivamente). Símbolos abertos indicam valores que tiveram diferença significativa com relação ao controle ($p \leq 0,05$). Pontos são apresentados individualmente.

Tabela 3. Comparação dos valores de P_{CO_2} , $\dot{V}\text{O}_2$, e EO_2 de *Clarias gariepinus* ($n = 10$) com os valores de outros respiradores bimodais siluriformes e não-siluriformes, e teleósteos de respiração exclusivamente aquática durante normóxia.

		Espécies	P_{CO_2} (mmHg)	$\dot{V}\text{O}_2$ ($\text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	EO_2 (%)	Autor	
Respiração bimodal	Siluriformes	Tamoatá, <i>Hoplosternum littorale</i>	50	77	-	Affonso & Rantin, 2005	
		Cascudo pintado, <i>Hypostomus regani</i>	34	~ 40	~ 20	Mattias et al., 1998	
		Cascudo preto, <i>Rhinelepis strigosa</i>	24	22	42	Takasusuki, 1998	
		Acari, <i>Hypostomus plecostomus</i>	33	~ 53	-	Perna & Fernandes, 1996	
		Walking catfish, <i>Clarias lazera</i> (~1,8kg)	-	-	83	Ar & Zacks, 1989	
			Ancistrus chagresi	-	84	Graham, 1983	
			Stinging catfish, <i>Heteropneustes fossilis</i>	50	63	-	Hughes & Singh, 1971
			Bagre-africano, <i>Clarias gariepinus</i>	61	76	49	presente estudo
	Não - siluriforme	Jeju, <i>Hoplerthrinus unitaeniatus</i>	40	~ 109	71	Oliveira et al., 2004	
		Blotched snakehead, <i>Channa maculata</i>	40	-	-	Yu & Woo, 1985	
Pirambóia, <i>Synbranchus marmoratus</i>		40	~ 27	67	Bicudo & Johansen, 1979		
Saltuna, <i>Piabucina festae</i>		25	-	-	Graham et. al., 1977		
Respiração exclusivamente aquática	Dourado, <i>Salminus maxillosus</i>	42	69	75	Souza et al., 2001		
	Pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i>	34	73	78	Rantin et al., 1998		
	Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	18	56	83	Fernandes & Rantin, 1994		
	Traíra, <i>Hoplias malabaricus</i>	20	38	83	Rantin et al., 1992		
	Trairão, <i>Hoplias lacerdae</i>	35	58	78	Rantin et al., 1992		
	Carpa, <i>Cyprinus carpio</i>	-	-	90	Lomholt & Johansen, 1979		

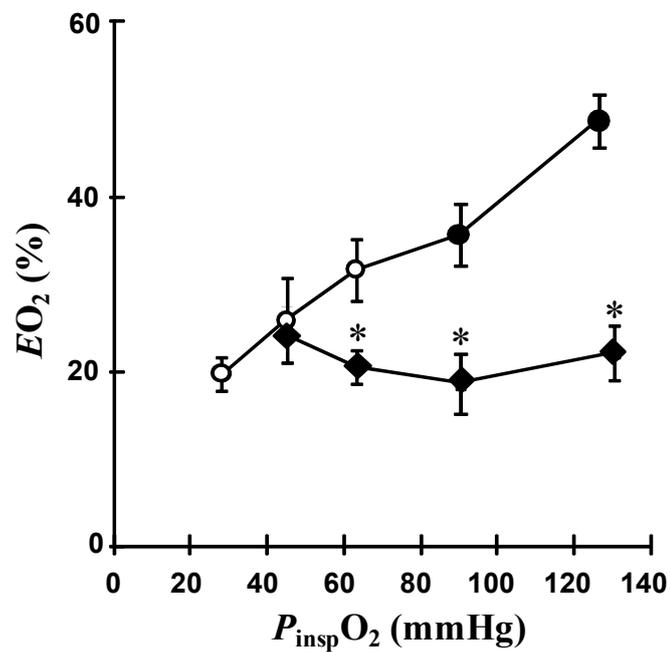


Figura 14. Efeito da redução das $P_{\text{insp}} \text{O}_2$ na extração de oxigênio da corrente ventilatória (EO_2 - %) de *Clarias gariepinus* em hipóxia gradual sem acesso ao ar atmosférico nos grupos GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$). Símbolos abertos indicam valores diferentes significativamente de valores iniciais (normóxia). * - indica valores significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p \leq 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M.

4.1.2. Ventilação Branquial, Volume Ventilatório e Frequência Respiratória

Os valores da f_R , do V_T e da \dot{V}_G de ambos os grupos, GC e GD, estão representados na Figura 14.

Os animais do grupo GC, desde a primeira tensão de hipóxia ($P_{\text{insp}}\text{O}_2 = 88,6$ mmHg), aumentaram a \dot{V}_G predominantemente por um maior aumento do V_T do que da f_R , sendo estes valores cerca de 107,7 e 9,6 %, respectivamente, com relação aos valores normóxicos. Em hipóxia severa ($P_{\text{insp}}\text{O}_2 = 28$ mmHg), o V_T e a f_R chegaram a valores máximos cerca de 189,7 % e 47,2 %, respectivamente, comparando-se com os valores normóxicos. Segundo RANTIN et al. (1992), este comportamento respiratório, em condições hipóxicas, pode ser considerado uma estratégia de redução do custo energético. Por sua vez, esta estratégia está relacionada a uma velocidade constante de contração da musculatura ventilatória, sendo considerada energeticamente menos dispendiosa quando comparada com uma alta frequência de contração muscular, como no caso de uma elevada f_R , a qual exerceria um trabalho muito maior contra a alta viscosidade interna dos músculos operculares e da água (RANTIN et al., 1992).

Durante condições hipóxicas, a maioria dos peixes de respiração exclusivamente aquática aumenta tanto a \dot{V}_G quanto a f_R (HUGHES, 1973; HOLENTON, 1980; RANDALL, 1982). Ao contrário, em peixes bimodal, tais condições podem afetar a \dot{V}_G de vários modos: a) mantendo a \dot{V}_G constante (*Neoceratodus*, *Synbranchus* e *Lepisosteus*), b) diminuindo a \dot{V}_G (*Erpitoichthys*, *Misgurnus*, *Hoplosternum*, *Brochis*, *Piabucina*) ou c) aumentando a \dot{V}_G (*Potopterus*, *Polypterus*, *Heteropneustes*, *Umbra*, e *Amia*). Neste último caso, a hiperventilação das brânquias ocorre até um limiar da P_{wO_2} onde inicia-se a tomada de ar atmosférico, o que facilita a captação de O_2 através dos órgãos de respiração acessória (GRAHAM et al., 1977). Comparando-se o bagre-africano com o jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (LOPES et al., 2010), cujos estudos utilizaram a mesma metodologia experimental, observou-se que jeju aumentou a \dot{V}_G de 447 mLH₂O.Kg⁻¹.h⁻¹, em normóxia, para 4.427 mLH₂O.Kg⁻¹.h⁻¹, em hipóxia severa ($P_{\text{eO}_2} = 20$ mmHg), enquanto *C. gariepinus* apresentou apenas um aumento de 768,8 ± 25,3 para 1545,7 ± 63,5 mLH₂O.Kg⁻¹.h⁻¹. Segundo McCRIMMOM et al. (1997) este aumento hiperbólico da \dot{V}_G representa os efeitos das mudanças dos *inputs* aferentes dos quimiorreceptores de O_2 periféricos sobre o SNC. Sendo assim, ambas as espécies executaram a terceira condição acima citada de hiperventilação durante hipóxia. Todavia, como o bagre-africano apresenta menor capacidade de elevar a \dot{V}_G

que o jeju, isto lhe confere uma desvantagem na sobrevivência apenas pela respiração aquática em hipóxia severa, situação que pode ocorrer em períodos de estiagem somada com algum impedimento para a RA como, por exemplo, a presença de predadores.

Já o grupo GD demonstrou, desde o início do experimento, valores mais elevados nos parâmetros respiratórios de f_R , V_T e \dot{V}_G . Tais valores iniciais são significativamente diferentes dos valores iniciais do grupo GC (Fig. 14). No caso da f_R , os valores iniciais do GD só foram alcançados pelo GC quando este experimento atingiu a hipóxia próxima de $PwO_2 = 70$ mmHg, enquanto que nos outros parâmetros respiratórios, V_T e \dot{V}_G , os valores iniciais do GD foram muito superiores aos do GC e só foram alcançados por este grupo na penúltima hipóxia, de $PwO_2 = 50$ mmHg. Além disso, ao contrário do GC, o GD demonstrou aumento significativo dos valores V_T e \dot{V}_G já na primeira tensão hipóxia de $P_{insp}O_2 = 95,2 \pm 2,3$ mmHg, os quais se mantiveram elevados durante as demais tensões hipóxicas.

Essa manutenção elevada a f_R e o V_T , desde normóxia até a hipóxia é muito importante para compensar a diminuição da superfície funcional respiratória removida do grupo GD, pois tenta assegurar que, pelo maior volume de água corrente pelas branquiais, uma maior quantidade de O_2 seja absorvido e transportado aos tecidos para suprir suas necessidades metabólicas. Em teleósteos de respiração exclusivamente aquática, SUNDIN et al. (1999) observaram uma acentuação nas respostas das variáveis respiratórias de traíra, *Hoplias malabaricus*, após deservação do 1º par de arcos branquiais e em exposição à hipóxia. No entanto, foi observado uma atenuação nestes parâmetros tanto em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, quanto no respirador facultativo jeju, *H. unitaenitatus*, durante hipóxia gradual e deservação do 1º par de arcos branquiais (LEITE et al., 2007; LOPES et al., 2010). Isto indica que a modulação das respostas dos quimiorreceptores de O_2 do 1º par de arcos branquiais é espécie-específica para os parâmetros respiratórios e que, no caso do bagre-africano, eles não estão confinados apenas no 1º par de arcos branquiais, mas presentes nos outros três pares de arcos branquiais remanescentes.

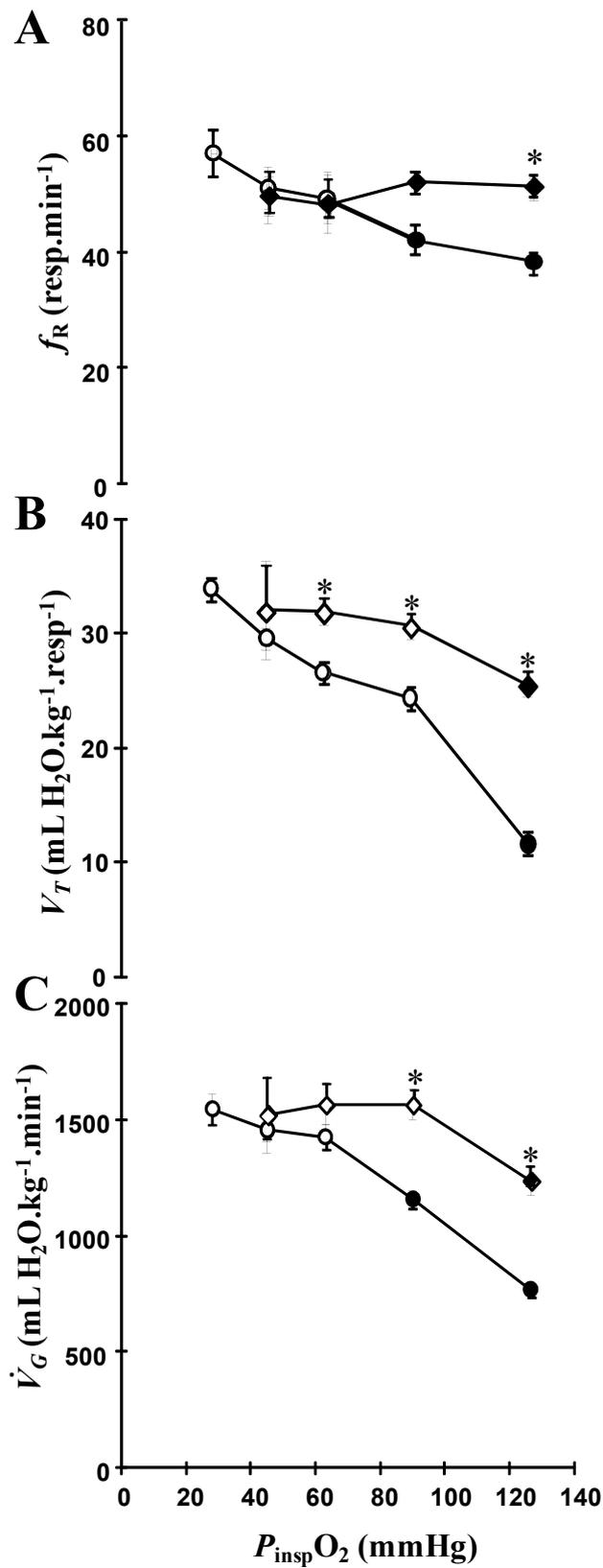


Figura 15. Relações entre o V_T (A), a f_R (B) e a \dot{V}_G (C) e as $P_{\text{insp}} \text{O}_2$ (mmHg) dos grupos GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$) de *C. gariepinus* em hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico. Símbolos abertos indicam diferença significativa dos valores iniciais (normóxia). * - indica significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p \leq 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M.

4.1.3. Frequência Cardíaca

Os valores da f_H de ambos os grupos experimentais (GC e GD) estão representados na Figura 15.

Os animais do grupo GC apresentaram uma manutenção constante da f_H de aproximadamente 37-44 bpm, até a $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de 88 mmHg, abaixo da qual demonstraram uma resposta bradicárdica significativa alcançando valores de $19,2 \pm 2,0$ bpm na menor $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (28 mmHg). Esta bradicardia hipóxica geralmente é desenvolvida pela maioria dos teleósteos já estudados. No entanto, seu significado fisiológico ainda não foi compreendido totalmente. Segundo autores (FARREL, 1984; DAVIE & FARREL, 1991), uma resposta bradicárdica permite um maior tempo de permanência do sangue dentro do ventrículo, proporcionando uma maior EO_2 pelo interior do próprio miocárdio através de seus tecidos esponjosos. Estudos morfológicos de *C. gariepinus* demonstraram que seu coração possui um tecido esponjoso, com fibras sem uma organização definida, muito maior que seu tecido compacto contendo unicamente fibras arranjadas na direção longitudinal (SIMÕES et al., 2002a,b), o que facilitaria esta absorção do O_2 pelo miocárdio. Desta forma, segundo TAYLOR et al. (1999), a bradicardia hipóxica atuaria como uma resposta protetora do miocárdio, pois uma elevada f_H durante hipóxia provavelmente conduziria este órgão a uma atividade anaeróbia que, conseqüentemente, traria uma diminuição da eficiência de seu trabalho mecânico.

Além disso, a bradicardia tem sido considerada uma importante estratégia para aumentar a eficiência na transferência de O_2 da água para as próprias brânquias. Segundo TAYLOR (1987) e MILSON et al. (1999), isto é devido a um maior volume sanguíneo ser ejetado durante sístole ventricular (lei de Frank-Starling) e se distribuir de maneira mais eficaz nos espaços vasculares branquiais normalmente fechados durante normóxia (TAYLOR, 1987; MILSON et al., 1999). No entanto, SUNTI (2013) demonstrou que as alterações na f_H , como a bradicardia, não melhoraram a transferência de O_2 pelas brânquias em normóxia, hipóxia ou durante a recuperação subsequente à hipóxia em tambaqui, *Colossoma macropomum*.

Muitos estudos correlacionaram a P_{CO_2} e o desenvolvimento da bradicardia como, por exemplo, a traíra, *H. malabaricus*, o trairão, *H. lacerdae* (RANTIN et al., 1993), o pacu, *P. mesopotamicus* (RANTIN et al., 1998) e o dourado, *Salminus maxillosus* (SOUZA et al., 2001), além do respirador aéreo facultativo, o jeju, *H. unitaeniatus* (OLIVEIRA et al., 2004). Esta relação foi observada também no presente estudo, pois o GC desenvolveu uma

bradicardia significativa abaixo da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ de 62,7 mmHg, uma tensão de O_2 próxima à sua P_{cO_2} .

No grupo GD, os animais demonstraram uma elevada f_{H} durante normóxia (~ 48 bpm), a qual foi diminuindo progressivamente até atingir valores significativos na hipóxia mais severa, chegando à $38,1 \pm 5,3$ bpm. Ao comparar-se os valores dos dois grupos entre si, apesar dos dados demonstrarem diferença significativa em todas as $P_{\text{insp}}\text{O}_2$, o grupo GD demonstrou a mesma resposta bradicárdica que o GC. Estudos com o respirador aéreo facultativo jeju, *H. unitaeniatus*, e o respirador exclusivamente aquático traíra, *H. malabaricus*, demonstraram respostas semelhantes de aumento da f_{H} , durante normóxia, porém, após deservação seriada e em resposta a hipóxia gradual, tais espécies demonstraram, respectivamente, total eliminação ou atenuação da resposta bradicárdica (SUNDIN et al., 1999; LOPES et al., 2010). Uma recente revisão de MILSOM (2012) mostrou uma grande diversidade na localização dos quimiorreceptores de O_2 que respondem a bradicardia hipóxica, sendo que nalgumas espécies esta resposta encontra-se apenas associada ao 1º arco branquial, enquanto em outras espécies esta resposta está relacionada com todos os arcos branquiais, e, especificamente, no dogfish, *Scyliorhinus caniculata*, esta resposta é encontrada tanto em todos os arcos branquiais como na cavidade orobranquial (BUTLER & TAYLOR, 1971). Sendo assim, pode-se concluir que a resposta à bradicardia hipóxica é espécie-específica também, e no caso do bagre-africano, os quimiorreceptores de O_2 que respondem à bradicardia hipóxica estão localizados em todos os arcos branquiais.

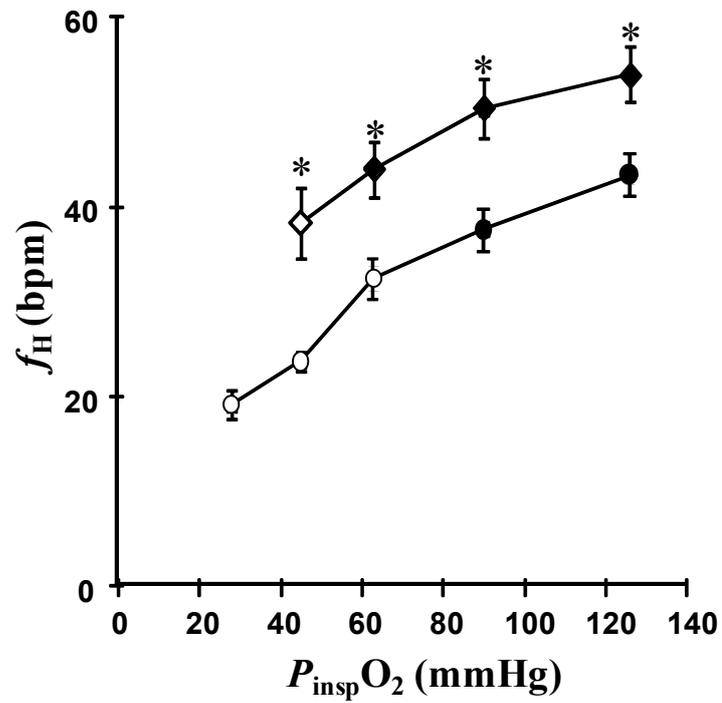


Figura16. Relações entre a frequência cardíaca (f_H – bpm) e as $P_{insp}O_2$ (mmHg) de *C. gariepinus* do GC (●, $n = 10$) e GD (◆, $n = 10$) durante hipóxia gradual *sem* acesso ao ar atmosférico. Símbolos abertos indicam diferença significativa dos valores iniciais (normóxia). * - indica valores significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p \leq 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M.

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL II: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DURANTE HIPÓXIA GRADUAL E COM ACESSO AO AR ATMOSFÉRICO

Para os experimentos de hipóxia *com* acesso ao ar atmosférico foi utilizada a câmara experimental de RA (ver Fig. 11) na qual os bagres-africanos ficavam livres para forrageamento e para tomarem bolhas de ar atmosférico quando necessitassem. Os dados dos grupos GC e GD estão apresentados nas Tabelas 4 à 8 e também graficamente na Figura 16 como médias \pm S.E.M. e em função da PO_2 da água da câmara experimental (PwO_2) que, neste caso, é igual à PO_2 da água inspirada ($P_{insp}O_2$).

Quando *C. gariepinus*, de ambos os grupos, foi colocado dentro do sistema de RA, ele demonstrou um longo período de inatividade no fundo da câmara, em normóxia e hipóxia. Após apresentar movimentos de forrageamento e subida à superfície aquática para tomada de ar atmosférico, logo retornava ao fundo da câmara por mais um período longo de inatividade. Isto também já foi observado nos tanques de manutenção onde os animais são aclimatados. Nestes tanques, os bagres-africanos também alternam longos períodos de inatividade, principalmente os animais maiores, e breves períodos de forrageamento, exceto quando estão sendo alimentados. Estes comportamentos de RAs sempre são realizados em grupo, isto é, por todos os indivíduos do tanque. Tais comportamentos geralmente são iniciados por um ou dois animais do tanque, sendo que os outros do grupo seguem seus movimentos. Tal conduta parece ser comum em peixes de respiração aérea e tem como objetivo evitar a predação aérea (GRAHAM, 1997).

O período de inatividade de *C. gariepinus* no sistema experimental de RA foi menor quando expostos à hipóxia. Nessas condições os peixes passam a explorar mais o local e, simultaneamente, subir à superfície aquática para tomada de ar atmosférico, no intuito de obter O_2 necessário à manutenção adequada de seu metabolismo.

4.2.1. Parâmetros Ventilatórios

4.2.1.1. Frequência de Respiração Aquática

Os valores de f_R em função da exposição à hipóxia gradual de ambos os grupos experimentais (GC e GD) de *C. gariepinus* estão apresentados na Figura 16A.

Durante normóxia, os grupos GC e GD apresentaram suas respectivas f_R pré- e pós-RA praticamente constantes (~ 34 e 38 resp. min^{-1} , respectivamente) as quais apresentaram pequenas oscilações durante hipóxia gradual, porém sem diferença significativa

entre os grupos controle e experimental. No entanto, ao se comparar os valores da hipóxia gradual com os valores normóxicos do mesmo grupo, apenas o GC apresentou diminuição significativa tanto da f_R pré- quanto da pós-RA nas duas últimas tensões ($PO_2 = 20$ e 10 mmHg), sendo cerca de 35% menor. A tendência à redução deste parâmetro respiratório é considerado uma estratégia de supra importância nos teleósteos, pois pode levar a uma queda no custo energético do animal, como já discutido (SHELTON et al., 1986; PERRY & WOOD, 1989; RANTIN et al., 1992; GILMOUR, 2001).

Existe uma grande variedade de respostas da f_R relacionada com os quimiorreceptores de O_2 branquiais e extra-branquiais quando diferentes espécies são expostas à hipóxia (MILSOM, 2012). Por exemplo, espécies exclusivamente aquáticas podem ter: a) completa eliminação das respostas f_R apenas com a deservação do 1º par de arcos branquiais (trairão, *Hoplias lacerda*; MICHELI-CAMPBELL et al., 2009); b) atenuação das respostas da f_R com completa deservação dos nervos cranianos IX e X de todos os arcos branquiais (pacu, *P. mesopotamicus*, a qual espécie possui pseudobrânquia; LEITE et al., 2007) e c) atenuação das respostas da f_R com completa deservação nervos cranianos IX e X de todos os arcos branquiais somado com a deservação da pseudobrânquia (“searaven”, *Hemipterus americanus*; SAUNDERS & SUTTERLIN, 1971). Da mesma forma, espécies respiradoras bimodais podem apresentar respostas da f_R de diferentes formas, como: a) completa eliminação do aumento da f_R com total deservação dos nervos cranianos IX e X de todos arcos branquiais (jeju, *H. unitaeniatus*; LOPES 2010); b) inibição do aumento da f_R após total deservação dos nervos cranianos IX e X de todos arcos branquiais (longnose gar, *L. osseus*; SMATRESK, 1989) e c) atenuação das respostas de aumento da f_R com completa deservação nervos cranianos IX e X de todos os arcos branquiais somado com a deservação da pseudobrânquia (bowfin, *Amia calva*; MCKENZIE et al., 1991a,b).

Sendo assim, pode-se concluir que a resposta à f_R também é espécie-específica, e que *C. gariiepinus* possui os quimiorreceptores de O_2 , que modulam as respostas para f_R , confinados nos 1ºs arcos branquiais.

4.2.1.2. Amplitude Ventilatória

As respostas das V_{AMP} dos grupos GC e GD em resposta à hipóxia gradual estão apresentadas na Figura 16B. Ambos os grupos demonstraram diminuição gradual de suas respectivas V_{AMP} tanto para os valores pré- quanto para os valores pós-RA. Estas reduções das V_{AMP} tornaram-se significativas durante as três últimas tensões de O_2 , a partir de 30 mmHg.

O declínio da V_{AMP} é comum em respiradores bimodais, quando expostos à hipóxia, por aumentarem sua confiança nos comportamentos de respiração aérea ((HUGHES & SHELTON, 1962; SHELTON et al., 1986; PERRY, 2009; PERRY et al., 2009; ver Figura 16C). Porém há espécies de respiradores bimodais, como *Ancistrus chagresi* e *Misgurnus anguillicaudatus*, que não alteraram a V_{AMP} (GRAHAM, 1983; McMAHON & BURGGREN, 1987) e outros que até aumentaram a V_{AMP} mesmo com o aumento da f_{RA} em hipóxia, como *Amphipnous cuchia* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (LOMHOLT & JOHANSEN, 1974; LOPES et al., 2010). De qualquer forma, a estratégia fisiológica em *C. gariepinus* sugere que a tomada de O_2 atmosférico conseguido através dos comportamentos de RAs sobrepe-se à do O_2 obtido por difusão através das brânquias, ainda mais em virtude da concentração de O_2 atmosférico ser 30 vezes maior que sua concentração na água, num mesmo volume de cada ambiente (DEJOURS, 1988; SCHIMIDT-NIELSEN, 2002). Desta forma, pode-se afirmar que, em hipóxia severa, o bagre-africano possui uma maior dependência da EO_2 pelo ABO do que pelas brânquias.

Respostas semelhantes aos grupos GC e GD de *C. gariepinus* foram encontradas tanto no grupo intacto quanto no grupo com 1º par de arcos desbranquiados do respirador aéreo facultativo “longnose gar” (SMATRESK, 1989). Esta espécie diminuiu a V_{AMP} durante a transição de normóxia para hipóxia. Porém, ao realizar transições de um ambiente hiperóxico para normóxico, “longnose gar” apresentou aumento da V_{AMP} . Contrariamente, o respirador bimodal jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, demonstrou aumento da V_{AMP} , quando exposto à hipóxia gradual. No entanto, este aumento da V_{AMP} do jeju foi sendo eliminado em decorrência da secção seriada dos grupos experimentais até ser completamente abolida (LOPES et al., 2010). De acordo com MILSOM (2012), estas diferentes respostas da V_{AMP} sugerem a existência de uma complexa interação entre os quimiorreceptores de O_2 do 1º par de arcos branquiais em termos de inervação (tanto pelo nervo IX quanto pelo nervo X) e suas projeções centrais (centros de controle cardiovascular *versus* respiratório) que necessitam ser exploradas.

A resposta fisiológica de hipoventilar, durante hipóxia severa, foi descrita em espécies de respiração exclusivamente aquática, como a traíra, *H. malabaricus*, e o trairão, *H. lacerdae*, como uma possível estratégia que evitaria a difusão do O_2 do sangue arterial para a água que banha as lamelas secundárias (RANTIN et al., 1992). Isto ocorre pela possibilidade do sangue arterial estar com uma PO_2 mais elevada que a da água hipóxia circulante, e, por conseguinte, o O_2 difundiria da circulação sanguínea para a água da cavidade branquial por diferença de tensão de O_2 . Portanto, esta estratégia fisiológica, de hipoventilar, é de grande

relevância em *C. gariepinus* que, muito provavelmente, teria a PO_2 de seu sangue arterial mais elevada que a água circulante na cavidade branquial que os respiradores exclusivamente aquáticos, devido à absorção de grande quantidade de O_2 pelo ABO através das tomadas de ar atmosférico.

No respirador aéreo facultativo jeju, outra estratégia fisiológica foi observada e que evitaria a perda de O_2 do animal para o ambiente hipóxico. Ela consiste na vasoconstrição capaz de efetuar desvios (“shunts”), a fim de reduzir ou eliminar a circulação sanguínea pela superfície branquial, direcionando o sangue para os 3^{os} e 4^{os} arcos branquiais, onde os filamentos branquiais e lamelas secundárias são menores que os dos primeiros arcos branquiais (FARREL, 1978; WHITE & HICKS, 1987). No entanto, devido *C. gariepinus* possuir os pares de ABOs na região posterior dos 2^{os} e 4^{os} arcos branquiais, a existência destes “shunts” provavelmente ocorreriam nos 1^{os} e 3^{os} arcos branquiais evitando a perda de O_2 do sangue arterial para a água hipóxica circulante. Contudo, esta estratégia fisiológica necessita ainda ser comprovada experimentalmente.

Por fim, devido a diminuição da V_{AMP} ocorrer de forma semelhante nos dois grupos experimentais, GC e GD, pode-se afirmar que os quimiorreceptores de O_2 branquiais que modulam a V_{AMP} não estão confinados apenas nos 1^{os} pares de arcos branquiais, mas localizados nos outros pares de arcos branquiais remanescentes ou até em locais extra-branquiais como, por exemplo, o ABO.

4.2.1.3. Frequência de Respiração Aérea

A f_{RA} de ambos os grupos experimentais em resposta a hipóxia gradual estão apresentadas na Figura 16C. Os dois grupos apresentaram RAs em todas as PwO_2 , porém nem todos os peixes subiram à superfície aquática para a tomada de ar atmosférico em normóxia. Este comportamento de RA em normóxia é observado também nos tanques de manutenção, como já discutido, e permite classificar *Clarias gariepinus* como um respirador aéreo facultativo *contínuo*, segundo a definição de GRAHAM (1997).

No grupo GC, a f_{RA} aumentou progressivamente com a diminuição da PwO_2 . Abaixo da PcO_2 (61 mmHg) o bagre-africano apresentou RAs significativamente mais elevadas do que em normóxia. Na hipóxia mais severa ($PwO_2 = 10$ mmHg), a f_{RA} do *C. gariepinus* atingiu valores máximos, da ordem de $11,50 \pm 2,3$ RA.h⁻¹, o que significa aproximadamente uma RA durante um período entre 4 à 7 min. Esta resposta de aumento da f_{RA} é comum em respiradores aéreos facultativos (JOHANSEN et al., 1970; GRAHAM et al.,

1977; GRAHAM & BAIRD, 1982; SMATRESK, 1986; McMAHON & BURGGREN, 1987; MATTIAS et al., 1998; TAKASUSUKI et al., 1998; PERRY et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; AFFONSO & RANTIN, 2005; RANDLE & CHAPMAN, 2005) e seu início geralmente coincide com a PcO_2 e/ou com a PO_2 que eleva ao máximo a V_{AMP} . Este aumento da f_{RA} de *C. gariepinus* indica que a EO_2 pelas brânquias não estava sendo suficiente para a manutenção de seu metabolismo aeróbico e, portanto, quimiorreceptores de O_2 branquiais estimularam os centros respiratórios que induziram os comportamentos de RA para maior absorção de O_2 atmosférico via ABO.

O mecanismo de controle do SNC para a tomada de ar atmosférico nos peixes de respiração bimodal tem sido pouco estudado. Estudos demonstram uma similaridade no controle do SNC sobre a \dot{V}_G ou V_{AMP} entre os teleósteos de respiração exclusivamente aquática e os de respiração bimodal (BALLINTIJN, 1987). Entretanto, em “bowfin” a infusão de catecolaminas induziu apenas o aumento da \dot{V}_G e não da f_{RA} indicando que seus respectivos núcleos centrais são farmacologicamente e provavelmente espacialmente diferentes (McKENZIE et al., 1991a,b). Ainda, alguns autores sugerem que o comportamento de subida à superfície aquática é uma resposta influenciada por mudanças na PaO_2 durante os intervalos entre as RAs e que a tomada do ar atmosférico é simplesmente uma reorganização dos movimentos de tosse e de alimentação os quais requerem pouca organização neural (SHELTON et al., 1986; LIEM, 1989; SMATRESK, 1990, 1994). Desta forma, sugere-se que o conjunto do comportamento de deslocamento à superfície aquática e de RA *C. gariepinus* seja modulado por alterações da PaO_2 principalmente quando é alcançado a PcO_2 da espécie (61 mmHg).

Os dados de f_{RA} do GD durante hipóxia gradual demonstraram que a ablação do 1º par de arcos branquiais de *C. gariepinus* não gerou um completo bloqueio nos comportamentos de RA durante hipóxia gradual. Estes valores foram máximos em hipóxia moderada de 50 mmHg ($\sim 4,0 \text{ RA.h}^{-1}$), sendo equivalente a uma RA a cada 15 min, e permaneceu praticamente constante até a hipóxia mais severa.

Outros respiradores bimodais, tais como os “gar” (*Lepisosteus osseus* L. *oculatus*), “marbled” pulmonado (*Protopterus aethiopicus*), “bowfin” (*Amia calva*) e o jeju (*H. unitaeniatus*) também possuem os quimiorreceptores de O_2 responsáveis pela RA distribuídos nos quatro arcos branquiais e que são inervados pelos nervos craniais X e IX (LAHIRI et al., 1970; SMATRESK et al., 1986; SMATRESK, 1988; LOPES et al., 2010) e apenas a deservação total das branquiais aboliu esta resposta. No entanto, no caso do “bowfin” a existência da pseudobrânquia também pode estar relacionada com este

comportamento de RA, pois ela está inervada pelos nervos cranianos VII e IX (McKENZIE et al., 1991a).

Enfim, através dos dados sobre a f_{RA} pode-se afirmar que, em *C. gariepinus*, os quimiorreceptores de O_2 que modulam a f_{RA} estão localizados principalmente no 1^o arco branquial, mas estão presentes no demais arcos branquiais também. Além disso, há possibilidade da presença destes quimiorreceptores de O_2 em sítios extra-branquiais, embora esta hipótese necessite ser comprovada experimentalmente.

Tabela 4. Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros respiratórios do GC de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual ($P_wO_2 = 140, 100, 70, 50, 30, 20$ e 10 mmHg) e a percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-respiração aérea em cada P_wO_2 .

P_wO_2 (mmHg)	f_{RA} (RA.h ⁻¹)	f_R (resp.min ⁻¹)			V_{AMP} (%)		
		pré-RA	pós-RA	%	pré-RA	pós-RA	%
140	2,0 \pm 0,7	34,4 \pm 1,7	36,9 \pm 1,7	+ 7,2	100,0	91,2 \pm 5,1	- 9,8
100	3,1 \pm 0,8	33,8 \pm 1,4	37,9 \pm 1,3	+ 12,1	95,2 \pm 2,1	83,1 \pm 3,2	- 12,7
70	5,0 \pm 0,8	33,2 \pm 1,0	35,8 \pm 1,2	+ 7,8	86,2 \pm 2,7	81,6 \pm 4,1	- 5,3
50	5,9 \pm 0,7	31,3 \pm 1,2	35,2 \pm 1,0	+ 12,4	85,9 \pm 3,1	81,5 \pm 2,8	- 5,1
30	8,0 \pm 1,0	30,2 \pm 1,1	33,8 \pm 1,2	+ 11,9	79,1 \pm 2,2	68,9 \pm 4,1	- 12,9
20	9,1 \pm 1,6	23,1 \pm 1,5	29,2 \pm 1,6	+ 26,4	64,9 \pm 5,2	67,3 \pm 5,4	3,7
10	11,5 \pm 2,3	23,0 \pm 1,2	29,9 \pm 1,0	+ 30,0	61,6 \pm 3,6	59,8 \pm 3,3	-2,9

Tabela 5. Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros cardiopulmonares do GD de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual ($P_wO_2 = 140, 100, 70, 50, 30, 20$ e 10 mmHg) e a percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-respiração aérea em cada P_wO_2 .

P_wO_2 (mmHg)	f_{RA} (RA.h ⁻¹)	f_R (resp.min ⁻¹)			V_{AMP} (%)		
		pré-RA	pós-RA	%	pré-RA	pós-RA	%
140	2,3 \pm 0,63	38,0 \pm 4,20	37,9 \pm 3,57	- 0,3	110,2 \pm 2,8	90,7 \pm 5,3	- 17,6
100	2,9 \pm 0,59	40,7 \pm 1,85	40,3 \pm 3,52	- 0,9	103,7 \pm 4,2	87,5 \pm 3,8	- 15,6
70	3,5 \pm 0,65	41,7 \pm 1,30	42,0 \pm 3,46	+ 0,7	96,8 \pm 5,4	82,8 \pm 6,0	- 14,5
50	4,6 \pm 0,69	40,3 \pm 1,62	42,2 \pm 2,05	+ 4,7	92,9 \pm 6,1	82,3 \pm 6,3	- 11,4
30	4,6 \pm 0,72	40,0 \pm 1,48	43,3 \pm 2,73	+ 8,2	86,7 \pm 6,9	76,6 \pm 5,2	- 11,6
20	4,0 \pm 0,68	37,8 \pm 3,14	39,2 \pm 0,86	+ 3,7	74,1 \pm 4,3	69,4 \pm 4,4	- 6,2
10	4,2 \pm 0,72	35,5 \pm 3,52	39,0 \pm 2,31	+ 9,8	73,4 \pm 4,1	67,2 \pm 4,0	-8,5

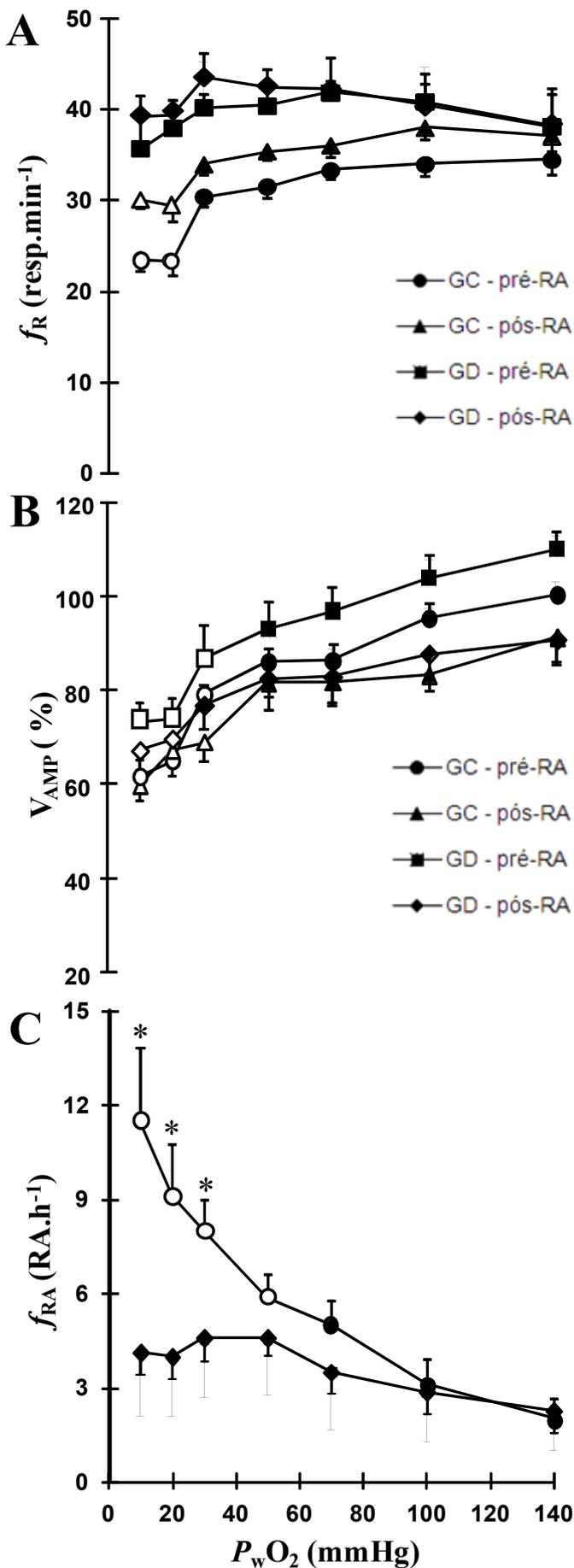


Figura 17. **A** – Frequência respiratória (f_R – resp.min⁻¹) e **B** – Amplitude ventilatória (V_{AMP} - %) de *C. gariepinus* com acesso ao ar atmosférico em resposta a hipóxia gradual. ● – peixe com os arcos branquiais intactos (GC) pré-RA e ▲ - pós-RA. ■ – peixe com os arcos branquiais extirpados (GD) pré-RA e ◆ - pós-RA. **B** – frequência de respiração aérea (f_{RA} - resp.h⁻¹) de *C. gariepinus* com acesso ao ar atmosférico em resposta à hipóxia gradual. ● – peixe com os arcos branquiais intactos (GC), ◆ - peixe com os arcos branquiais extirpados (GD). Símbolos abertos indicam valores significativamente diferentes dos valores em normóxia. * - indica valores significativamente diferentes em relação ao grupo intacto ($p < 0,05$). Média \pm S.E.M. ($n = 9$).

4.2.2. Frequência Cardíaca

A f_H de *C. gariepinus* de ambos os grupos experimentais, GC e GD, em resposta à hipóxia gradual com acesso ao ar atmosférico está apresentada nas Tabelas 6 e 7 e os registros de ECG estão apresentados na Figura 17.

Quando exposto à hipóxia gradual com acesso ao ar atmosférico, *C. gariepinus* de ambos os grupos experimentais, GC e GD, apresentaram bradicardia anterior às RAs, semelhante aos respiradores exclusivamente aquáticos, e taquicardia logo após as RAs, característica de vertebrados respiradores aéreos quando expostos à hipóxia aérea, com diferença significativa em todas as PwO_2 . Esta taquicardia não demonstrou ser persistente, durando aproximadamente entre 1 à 2 min. Após este período, a f_H retornou lentamente aos níveis bradicárdicos até a seguinte RA.

Diversas espécies respiradoras bimodais demonstraram este comportamento fisiológico de ciclo cardíaco (Tab. 8). O primeiro relato foi observado no muçum, *Synbranchus marmoratus*, por JOHANSEN (1966). Estudos com esta espécie indicaram que a bradicardia estava associada à expiração do ar hipóxico/hipercárbico de dentro da câmara bucal para o ar atmosférico, enquanto a taquicardia subsequente ocorreria devido à inspiração de novo ar oxigenado. Este movimento da câmara bucal induziria os mecanorreceptores ali presentes a enviar impulsos nervosos ao tronco encefálico os quais conduziriam a uma inibição do tônus vagal colinérgico do miocárdio, elevando a f_H (JOHANSEN, 1966; GRAHAM et al., 1995; SKAALS et al., 2006). Esta taquicardia pronunciada estaria intimamente associada a um aumento significativo no débito cardíaco e à perfusão do ABO (JOHANSEN, 1966; AXELSSON et al., 1989; SKAALS et al., 2006; McKENZIE et al., 2007; BELÃO et al., 2011), o que melhora a absorção do O_2 atmosférico e, por conseguinte, libera mais O_2 aos tecidos para manutenção do metabolismo aeróbico (GRAHAM et al., 1995).

Outros estudos comprovaram esta hipótese e acrescentaram que a diminuição da atividade vagal no miocárdio ocorre devido tanto à redução do estímulo respiratório (gerado centralmente pelo “Gerador de Ritmo Respiratório” na medula) quanto pela redução das atividades reflexas dos mecanorreceptores durante os movimentos ventilatórios. Desta forma, logo após uma RA, a retirada do estímulo vagal colinérgico desencadearia um aumento da f_H e, eventualmente, a recuperação da ventilação branquial, seja pela f_R e/ou pela V_{AMP} , aumentaria a atividade vagal tornando a reduzir a f_H novamente (LEITE et al., 2009; TAYLOR et al., 2009).

Em peixes de respiração exclusivamente aquática, como o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*; FRITSCHÉ & NILSSON, 1989), truta (*Salmo gairdneri* ou *Onchorhynchus mykiss*; DAXBOECK & HOLETON, 1978; SMITH & JONES, 1978), salmão (*Oncorhynchus kisutch*; SMITH & DAVIE, 1984) e traíra (*Hoplias malabaricus*; SUNDIN et al., 1999) a deservação de todos os nervos cranianos que chegam ao 1º arco branquial (IX e X) aboliram a bradicardia hipóxica. Em espécies que possuem pseudobrânquia, não houve alteração desta resposta (RANDALL & JONES, 1973; SMITH & JONES, 1978; DAXBOECK & HOLETON, 1978). Já em espécies que tiveram a deservação apenas do nervo X do 1º par de arcos branquiais houve eliminação suficientemente de respostas da bradicardia hipóxica (truta arco-íris, SMITH & JONES, 1978; bacalhau do Atlântico, FRITSCHÉ & NILSSON, 1989; traíra, SUNDIN et al., 1999). Por outro lado, em salmão apenas a deservação do nervo IX do 1º par de arcos branquiais quase eliminou completamente a bradicardia hipóxica e a completa deservação deste arco não produziu uma redução adicional na f_H (SMITH & DAVIE, 1984).

Contrariamente, em espécies exclusivamente aquáticas como o catfish (*Ictalurus punctatus*; BURLESON & SMATRESK, 1990a), o tambaqui (*Colossoma mesopotamicus*, SUNDIN et al., 2000), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*; LEITE et al., 2007) e o trairão (*Hoplias lacerdae*; MICHELI-CAMPBELL et al., 2009), os quimiorreceptores de O_2 envolvidos na exibição da bradicardia hipóxica parecem estar distribuídos através de todos os arcos branquiais. Isto indica que o principal controle da f_H é realizado pelo Nervo Vago, porém não exclui um papel parcial do Nervo Glossofaringeo (SUNDIN et al., 2000). No caso dos elasmobrânquios, os quimiorreceptores de O_2 que modulam a bradicardia hipóxica não estão confinados aos arcos branquiais, mas estão distribuídos por toda a cavidade orobranquial, sendo inervados pelos nervos cranianos V, VII IX e X (dogfish, *Scyliorhinus caniculata*; BUTLER et al., 1977).

Ainda, estudos com respiradores aéreos facultativos, jeju (*H. unitaeniatus*; LOPES et al., 2010) e “bowfin” (*Amia calva*; MCKENZIE et al., 1991a,b) demonstraram que a completa deservação de todos os arcos branquiais eliminou a bradicardia hipóxica. Porém, no caso do “bowfin”, devido os autores não realizarem deservação seriada, pode-se supor que os quimiorreceptores de O_2 branquiais que medeiam a hipóxia bradicárdica estejam também no localizados no 1º par de arcos branquiais.

Desta forma, MILSOM (2012) concluiu que, apesar de algumas espécies não necessitarem de respostas cardíacas frente à hipóxia como o peixe-bruxa (*Myxine glutinosa*; AXELSSON et al., 1990), “sea raven” (*Hemipterus americanus*; SAUNDERS &

SUTTERLIN, 1971), o “fivebeard rockling” (*Ciliata mustela*; FRITSCHÉ & NILSSON, 1990), “rockpool goby”, o gobião (*Gobius cobitus*; BERSCHICK et al., 1987), o “longnose gar” (*Lepisosteus osseus*; SMATRESK et al., 1986), e os três gêneros de peixes pulmonados (*Neoceratodus*, FRITSCHÉ et al., 1993; *Lepidosiren*, SANCHEZ et al., 2001), a maioria dos teleósteos respondem à hipóxia com uma profunda bradicardia, porém a distribuição dos quimiorreceptores de O₂ responsáveis por esta resposta não é uniforme entre as espécies.

Assim, no caso do bagre-africano, *C. gariepinus*, pode-se concluir que os quimiorreceptores de O₂ branquiais que modulam a f_H estão distribuídos ao longo de todos os arcos branquiais devido sua resposta bradicárdica no grupo GD.

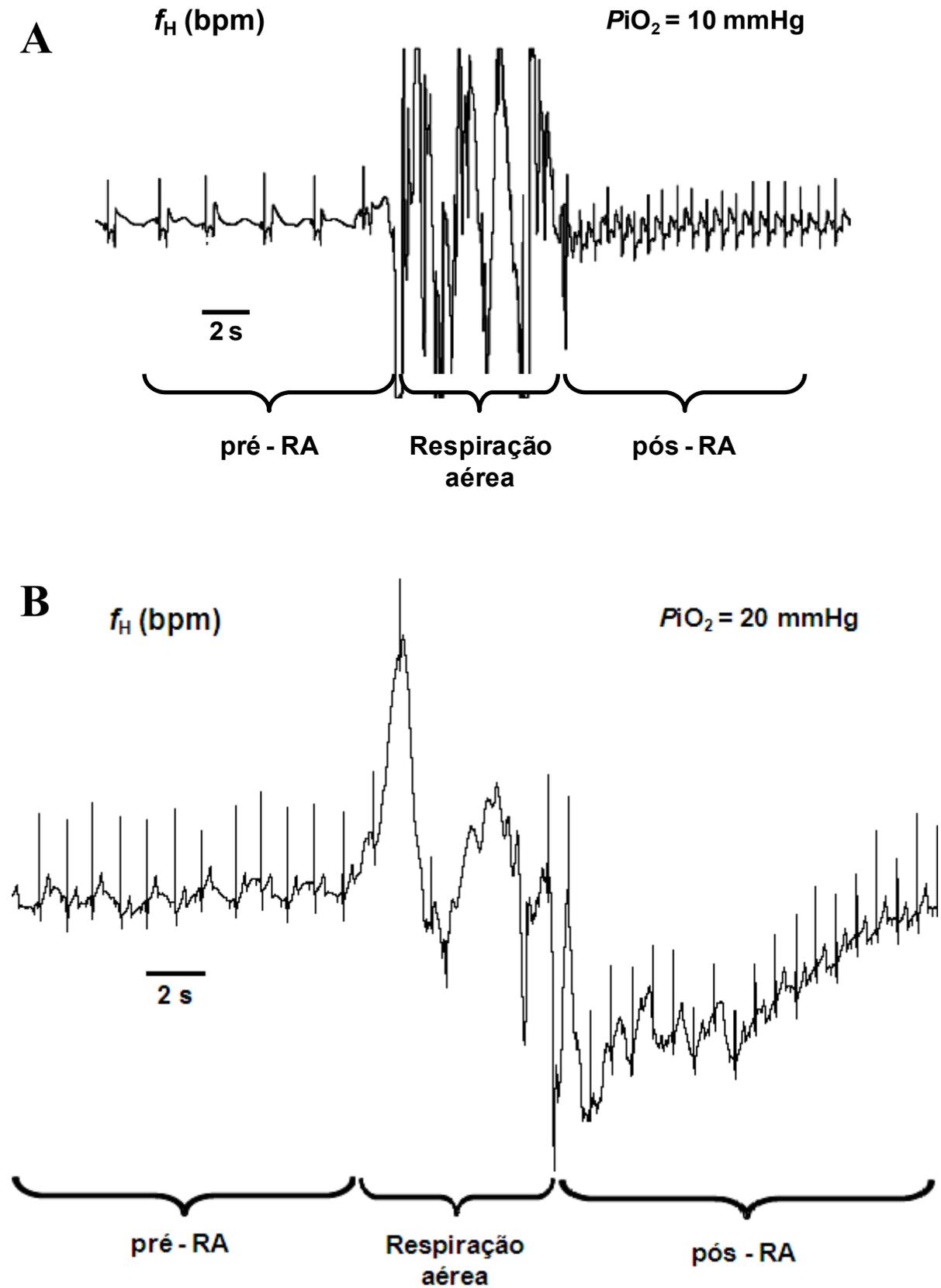


Figura 18. Registro dos complexos QRS do ECG do grupo GC (A) e GD (B) de *Clarias gariepinus* em hipóxia severa com acesso ao ar atmosférico ($P_wO_2 = 20$ mmHg), mostrando a atenuação dos valores da f_H tanto pré- como pós-RA.

Tabela 6. Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros cardíacos do GC de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual, percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-RA e aumento nos batimentos-por-minuto pós-RA de cada P_wO_2 . * - indica valores significativamente diferentes em relação aos valores de f_H pré-RA ($p < 0,05$).

P_wO_2 (mmHg)	f_H (bpm)			
	pré-RA	pós-RA	% de diferença da f_H pré e pós RA	Aumento em bpm da f_H pós-RA
140	42,9 \pm 1,7	61,8 \pm 3,2*	+ 44,1	~ 18,9
100	39,6 \pm 3,9	58,0 \pm 3,3*	+ 46,5	~ 18,4
70	34,7 \pm 2,4	53,8 \pm 2,3*	+ 55,0	~ 19,1
50	35,1 \pm 2,5	53,8 \pm 2,2*	+ 53,3	~ 18,7
30	38,3 \pm 3,3	58,3 \pm 3,23*	+ 52,2	~ 20,0
20	29,2 \pm 3,8	49,7 \pm 4,8*	+ 70,2	~ 20,5
10	30,4 \pm 3,2	52,1 \pm 2,9*	+ 71,4	~ 21,7

Tabela 7. Valores médios (\pm S.E.M.) dos parâmetros cardíacos do GD de *Clarias gariepinus* ($n = 9$) durante hipóxia gradual, percentagem da diferença entre os valores de pré- e pós-RA e aumento nos batimentos-por-minuto pós-RA de cada P_wO_2 . * - indica valores significativamente diferentes em relação aos valores de f_H pré-RA. ^a - indica valores significativamente diferente dos respectivos valores do grupo GC da Tabela 7 ($p < 0,05$)

P_wO_2 (mmHg)	f_H (bpm)			
	pré-RA	pós-RA	% de diferença da f_H pré- e pós-RA	Aumento em bpm da f_H pós-RA
140	71,7 \pm 10,4 ^a	84,7 \pm 15,0* ^a	+ 18,1	~ 13,0
100	66,1 \pm 5,9 ^a	86,1 \pm 3,3* ^a	+ 30,3	~ 20,0
70	66,5 \pm 7,7 ^a	89,4 \pm 6,6* ^a	+ 34,4	~ 22,9
50	65,7 \pm 5,1 ^a	85,9 \pm 6,1* ^a	+ 30,8	~ 20,2
30	59,9 \pm 7,5 ^a	85,2 \pm 5,9* ^a	+ 42,2	~ 25,3
20	63,7 \pm 5,9 ^a	78,0 \pm 6,8* ^a	+ 22,4	~ 14,3
10	49,9 \pm 4,7	78,8 \pm 5,5* ^a	+ 57,9	~ 28,9

Tabela 8. Comparação dos valores de f_H (bpm) pré- e pós-RA de *Clarias gariepinus* do grupo GC com os valores de f_H (bpm) pré- e pós-RA de outros teleósteos de respiração aérea durante hipóxia severa.

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

4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL III: IDENTIFICAÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES DE O₂ BRANQUIAIS

4.3.1. Curva Dose-Resposta

Os valores da curva dose-resposta das injeções externas e internas de NaCN sobre as respostas cardiorrespiratórias (f_H e f_R) de *C. gariepinus* ($n = 4$) estão representadas nas Figuras 18 e 19. Não foram realizadas análises estatísticas nestes dados devido a quantidade amostral não ser suficiente.

A Figura 18A mostra uma queda na f_H na injeção externa de NaCN na concentração de 1,25 mg.mL⁻¹, cuja alteração foi de -25% comparada com a injeção de água. Além disso, houve uma tendência crescente nos valores da f_R (Fig. 18B) com o aumento das concentrações de NaCN, sendo que os animais alcançaram valores elevados da f_R após a injeção externa de 1,25 mg.mL⁻¹ de NaCN ultrapassando 20% da injeção controle (água). Ainda, os animais exibiram poucos comportamentos de forrageamento e um deles apresentou tomada de O₂ atmosférico. Assim sendo, a concentração de 1,25 mg.mL⁻¹ de NaCN foi escolhida como padrão para injeção externa a fim de avaliar quais parâmetros cardiorrespiratórios estão sendo mediados por quimiorreceptores de O₂ orientados externamente, isto é, que monitoram a PO_2 da água inspirada.

A Figura 19A mostra que os efeitos das injeções internas de NaCN reduziram a f_H , sendo que o menor valor de f_H foi encontrado na concentração de 0,75 mg.mL⁻¹ de NaCN que alterou a f_H em -31,3%. Nesta mesma concentração, as médias da f_R (Fig. 19B) demonstram um vagaroso aumento nos seus valores acompanhada de exhibições de comportamentos de forrageamento e subidas para respiração aérea por todos animais. Portanto, esta concentração de 0,75 mg.mL⁻¹ de NaCN foi escolhida como a injeção interna padrão para se avaliar quais parâmetros cardiorrespiratórios estão sendo mediados por quimiorreceptores de O₂ orientados internamente, ou seja, que monitoram a PO_2 do sangue arterial.

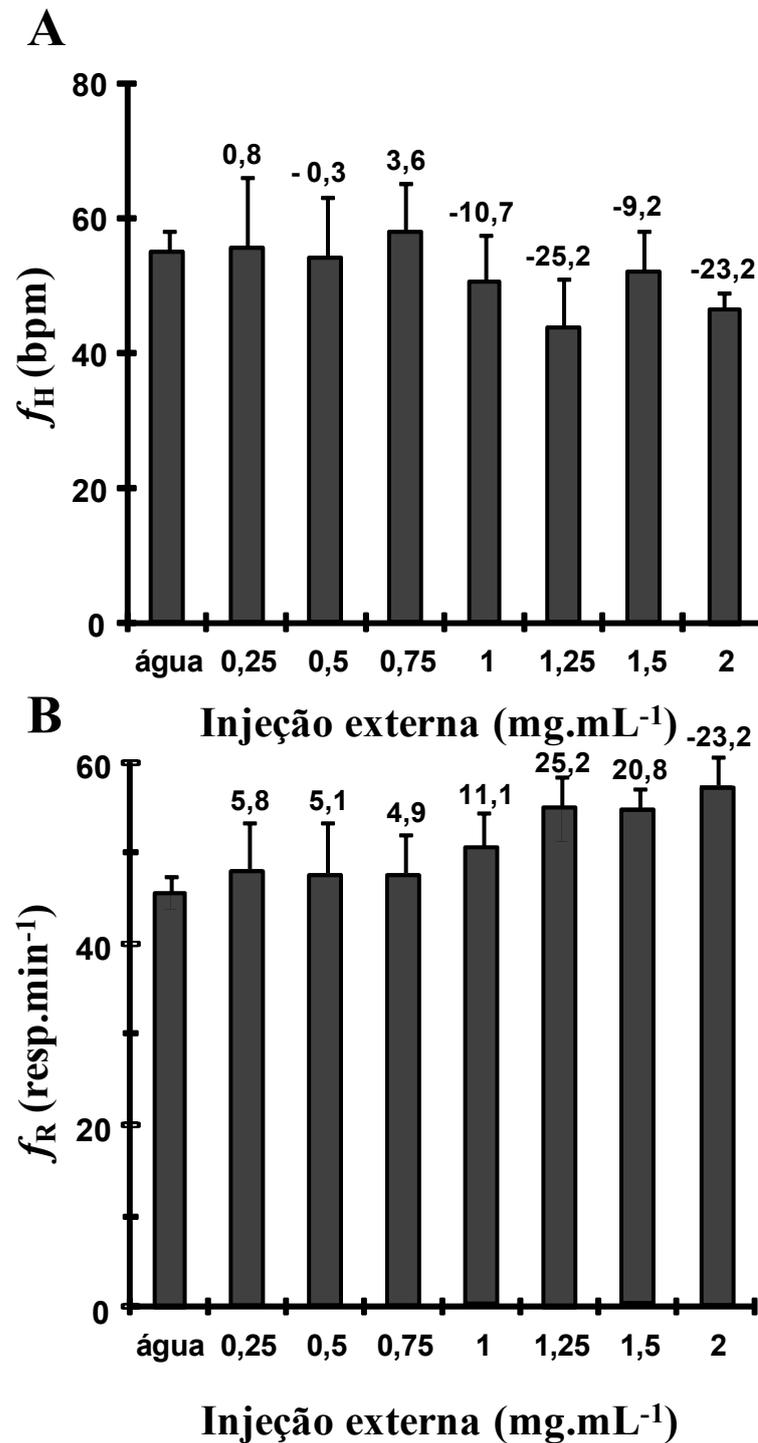


Figura 19. Curva dose-resposta das injeções externas de água e de concentrações crescentes de NaCN sobre a frequência cardíaca (A) e a frequência respiratória (B) de *C. gariepinus* intactos ($n = 4$), com acesso ao ar atmosférico. As barras representam as médias \pm S.E.M. Os números acima das barras indicam a variação, em porcentagem, dos valores médios das injeções externas de NaCN comparado com a injeção controle (água).

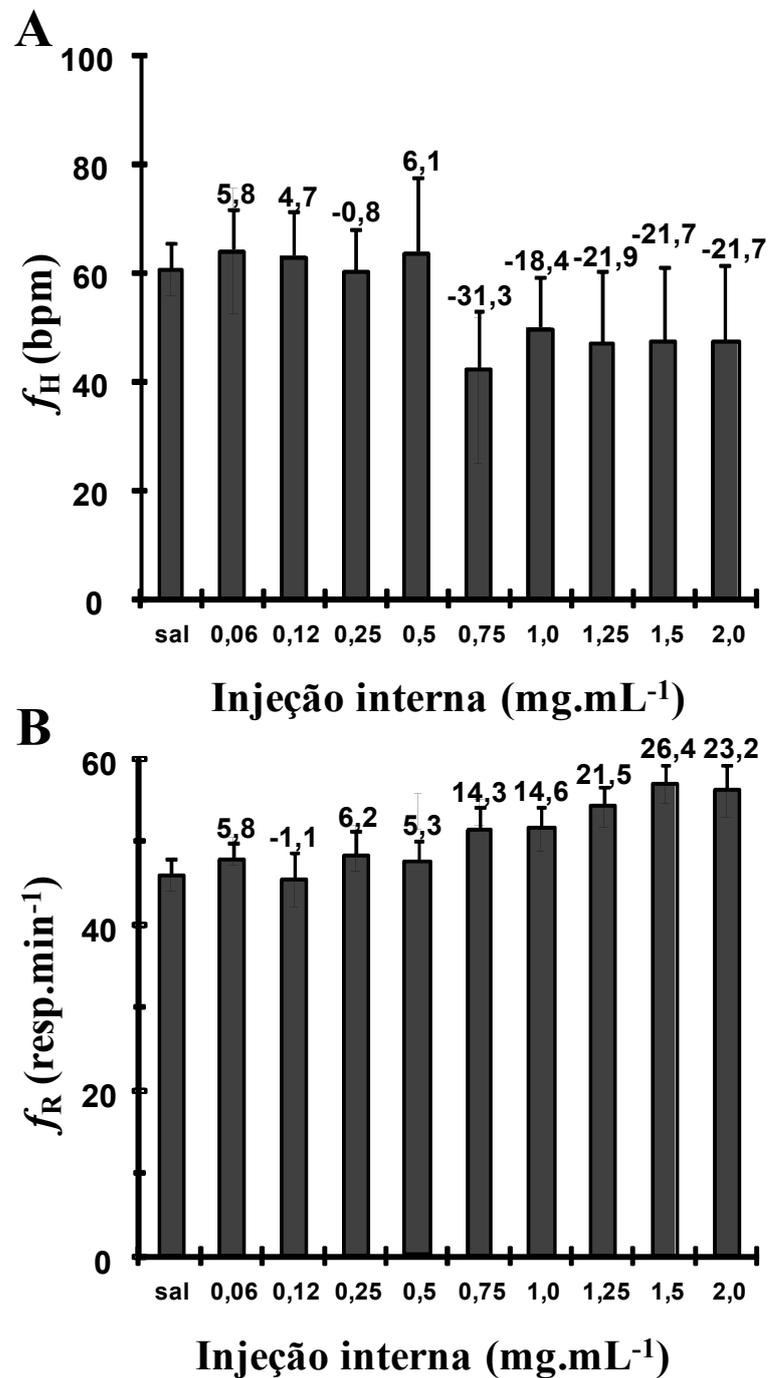


Figura 20. Curva dose-resposta das injeções internas de salina e de concentrações crescentes de NaCN sobre a frequência cardíaca (A) e a frequência respiratória (B) de *C. gariepinus* intactos ($n = 4$), com acesso ao ar atmosférico. As barras representam as médias \pm S.E.M. Os números acima das barras indicam a variação, em porcentagem, dos valores médios das injeções internas de NaCN comparado com a injeção controle (salina).

4.3.2. Análise da orientação dos quimiorreceptores de O_2 através das injeções externas e internas de NaCN

Os efeitos das injeções controle e de NaCN externas e internas sobre os parâmetros cardiorrespiratórios de ambos os grupos experimentais (GC e GD) de *C. gariepinus* ($n = 12$) estão apresentados nos gráficos das Figuras 20 à 23.

No grupo GC, as injeções externas de NaCN não causaram alterações nos valores de f_R , porém as injeções internas causaram um aumento nos seus valores após 20 s da injeção (Fig. 20A, B). Esta taquipnéia persistiu durante o primeiro minuto de monitoramento. No grupo GD, ambas as injeções, externa e interna, não tiveram efeito sobre as respostas de f_R (Fig. 20C, D). Estes resultados indicam que, nesta espécie, os quimiorreceptores de O_2 branquiais que modulam alterações na f_R estão localizados exclusivamente nos 1^{os} arcos branquiais e estão orientados internamente, monitorando a PO_2 do sangue arterial. Provavelmente o nervo Glossofaríngeo (Nervo IX) seja o responsável por enviar as informações de mudanças da PO_2 do sangue arterial ao tronco encefálico. Contrariamente, “bowfin” e jeju exibiram aumentos na f_R após estimulação interna e externa dos quimiorreceptores de O_2 (McKENZIE et al., 1991a,b; LOPES et al., 2010). Interessantemente, o “longnose gar” (*Lepisosteus osseus*), teve a f_R diminuída durante hipóxia aquática, enquanto esta variável aumentou em resposta a injeções internas de NaCN (SMATRESK, 1989). Tais dados indicam que a orientação dos quimiorreceptores de O_2 envolvidos na modulação da f_R em resposta à hipóxia ou à hipoxemia é espécie-específica.

De acordo com os dados obtidos da V_{AMP} (Fig. 21), apenas as injeções internas de NaCN tiveram efeito sobre este parâmetro respiratório. No grupo GC houve aumento em cerca de 20% da V_{AMP} e no grupo GD o aumento foi cerca de 22%. Estes aumentos da V_{AMP} ocorreram a partir de 30 s pós-infusão da solução, tempo necessário para que a solução estimulasse os quimiorreceptores de O_2 branquiais. Além disso, este aumento da V_{AMP} perdurou significativo apenas no primeiro minuto voltando aos parâmetros basais logo em seguida. Respiradores aéreos facultativos como jeju, *Hoplerytinus unitaeniatus*, e “bowfin”, *Amia calva* demonstraram aumento da V_{AMP} tanto para injeções internas como externas de NaCN (bowfin, MCKENZIE et al., 1991a,b; jeju, LOPES et al., 2010). Da mesma forma, teleósteos de respiração exclusivamente aquática como catfish (BURLESON & SMATRESK, 1990a), esturjão do Mar Adriático (McKENZIE et al., 1995), truta arco-íris (BURLESON & MILSOM, 1995; REID & PERRY, 2003) traíra (SUNDIN et al., 1999), tambaqui (SUNDIN et al., 2000), curimã (SHINGLES et al., 2005), pacu (LEITE et al., 2007), trairão (MICHELI-

CAMPBELL et al., 2009) “gulf toadfish”, *Opsanus beta* (PERRY et al., 2009a; McDONALD et al., 2010), também respondem com um aumento da V_{AMP} em resposta às estimulações de NaCN tanto interna quanto externamente. No entanto, espécies como pacu, *Piaractus mesopotamicus*, também possui um sítio extra-branquial sensível ao O_2 , a pseudobrânquia, a qual responde a estímulos tanto interna quanto externamente (LEITE et al., 2007).

Diferentemente, *C. gariepinus* respondeu apenas às estimulações internas de NaCN e, portanto, pode-se concluir que o bagre-africano possui os quimiorreceptores de O_2 branquiais que modulam alterações na V_{AMP} localizados em todos os arcos branquiais e orientados exclusivamente para monitoramento da PO_2 arterial.

Ambos os grupos (GC e GD) de *C. gariepinus* exibiram bradicardia em resposta às injeções externas e internas de NaCN. Esta diminuição da f_H foi mais discreta no GC, provavelmente devido aos diversos comportamentos de RA apresentados (Fig. 22), o que será discutido adiante. A bradicardia apresentada com ambas as injeções indicam que ela é mediada por receptores de O_2 orientados tanto externamente (monitorando a PO_2 da água inspirada) quanto internamente (monitorando a PO_2 do sangue arterial). Na maioria dos teleósteos de respiração exclusivamente aquática já estudados, os quimiorreceptores de O_2 branquiais que medeiam a hipóxia bradicárdica parecem identificar apenas as mudanças da PO_2 da água inspirada (MILSOM, 2012). Semelhantemente, no respirador aéreo facultativo “bowfin”, a bradicardia reflexa é mediada por receptores de O_2 orientados externamente (McKENZIE et al., 1991a,b). Por outro lado, em jeju, a hipóxia bradicárdica é desencadeada por quimiorreceptores de O_2 branquiais orientados tanto interna quanto externamente (LOPES et al., 2010). Desta forma, pode-se concluir que a modulação da f_H em resposta às injeções de NaCN em *C. gariepinus* é realizada por quimiorreceptores de O_2 distribuídos por todos os arcos branquiais, considerando-se que o grupo GD apresentou bradicardia.

O grupo GC exibiu maiores valores de f_{RA} após injeções internas de NaCN do que nas injeções externas (Fig. 23). Respostas similares foram observadas em jeju (LOPES et al., 2010) e “longnose gar” (SMATRESK et al., 1986). No entanto, injeções internas de NaCN não tiveram efeito na f_{RA} de “bowfin” (McKENZIE et al., 1991 a,b). Em todas estas espécies, a f_{RA} foi estimulada através de injeções externas de NaCN. A ablação do 1º par de arcos branquiais em *C. gariepinus* atenuou as respostas da f_{RA} , porém não as aboliu completamente. Isto indica que, no bagre-africano, os quimiorreceptores de O_2 que medeiam a f_{RA} são orientados tanto externa quanto internamente, com predominância da orientação interna. Estes

receptores estão também distribuídos ao longo de todos os arcos branquiais e possivelmente localizados em estruturas extra-branquiais, como, por exemplo, no ABO.

Estudos com marcação neuronal em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (TAYLOR et al., 2009) demonstraram a existência de sobreposição dos núcleos respiratórios e cardíacos no tronco encefálico, na região do IV ventrículo, cujas aferências advêm dos nervos cranianos IX e X. *Clarias gariepinus* também possui estes núcleos respiratórios e cardíacos (dados ainda não publicados por TAYLOR E. W.) e a ablação do 1^o par de arcos branquiais possivelmente tenha bloqueado a aferência dos impulsos nervosos dos quimiorreceptores de O₂ branquiais para estes núcleos respiratórios, ocasionada pela extirpação do nervo IX. Desta forma, os núcleos encefálicos que emitem os impulsos para a musculatura opercular, a fim de elevar a f_R , deixaram de fazê-lo devido à falta de informações provenientes dos receptores que detectam as alterações PO_2 aquática (~ injeções externas de NaCN), porém não da PO_2 sanguínea (~ injeções internas de NaCN) (Fig. 20). Ao contrário, os núcleos encefálicos responsáveis por gerar modificações na f_H ou induzir o comportamento de subida à superfície aquática para a tomada do ar atmosférico, também tiveram perda de informações vindas das PO_2 aquática e sanguínea. Porém tais informações continuaram a ser enviadas através dos arcos remanescentes pelos ramos do nervo X, mantendo as respostas da f_H e um bloqueio parcial no comportamento de RA. No caso da V_{AMP} , devido seu aumento ser semelhante em ambos os grupos (20 e 22 % no GC e GD, respectivamente), supõe-se que não houve alteração no envio de informações de seus quimiorreceptores de O₂ aos centros respiratórios. Isto sugere a possibilidade dos quimiorreceptores de O₂ que modulam alterações da V_{AMP} estarem presentes em todos os arcos branquiais ou até mesmo de estarem restritos aos arcos branquiais remanescentes e serem monitorados apenas pelos nervo X (exceto o ramo trigêmio que inerva os 1^{os} arcos branquiais) e não pelo nervo craniano IX. Todavia, tal suposição necessita ser comprovada experimentalmente.

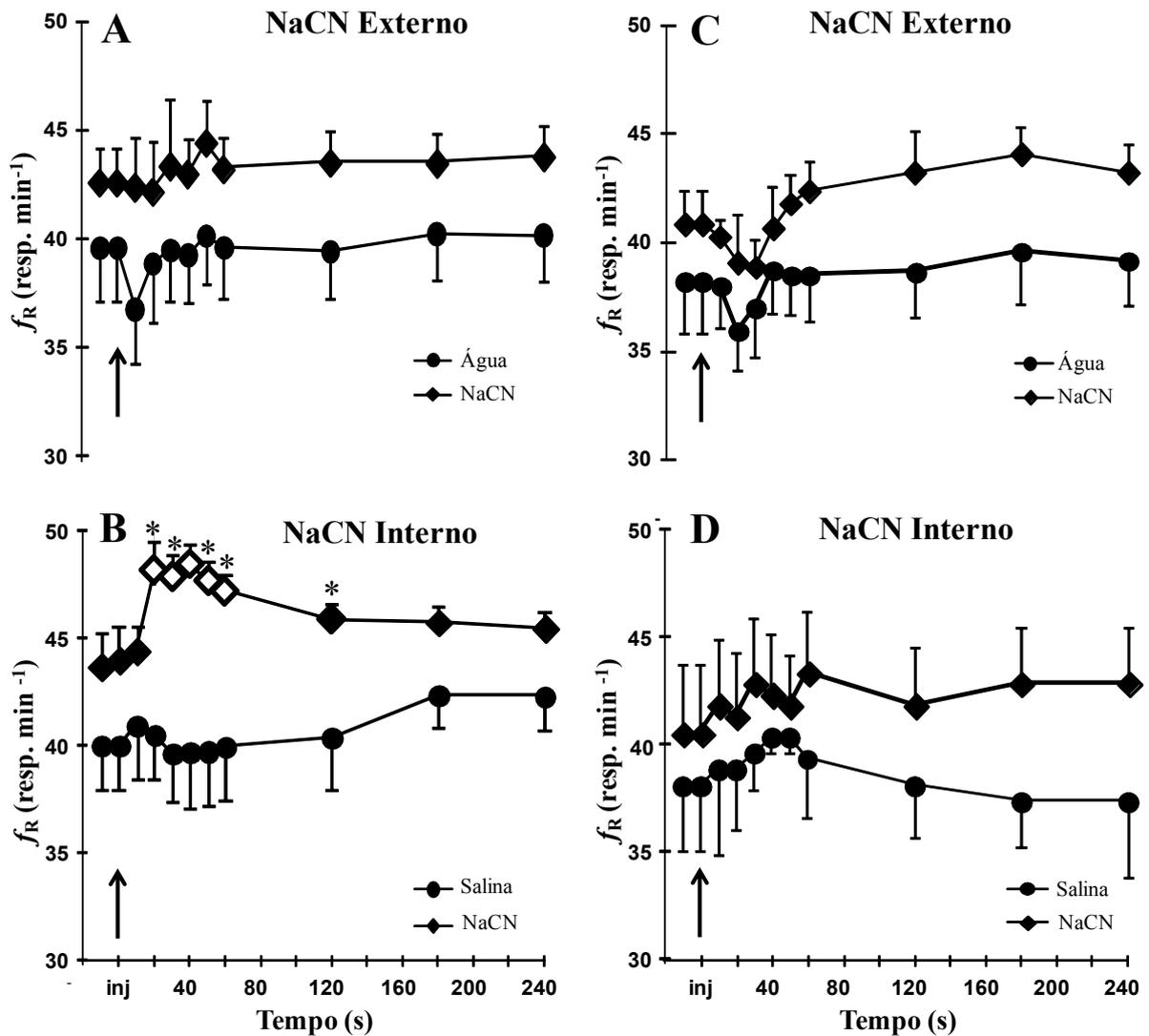


Figura 21. Mudanças na frequência respiratória (f_R – resp. min^{-1}) de *C. gariepinus* após a sequência de injeções externas de H_2O (1,0 mL), NaCN (1,0 mL de $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) e injeções internas de salina (0,5 mL) e NaCN (0,5 mL de $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$). A e B – peixes com os arcos branquiais intactos (GC; $n = 12$), C e D – peixes com os primeiros arcos branquiais extirpados (GD; $n = 12$). As setas indicam o momento das injeções. Símbolos abertos representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). * - indica valores que são significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M.

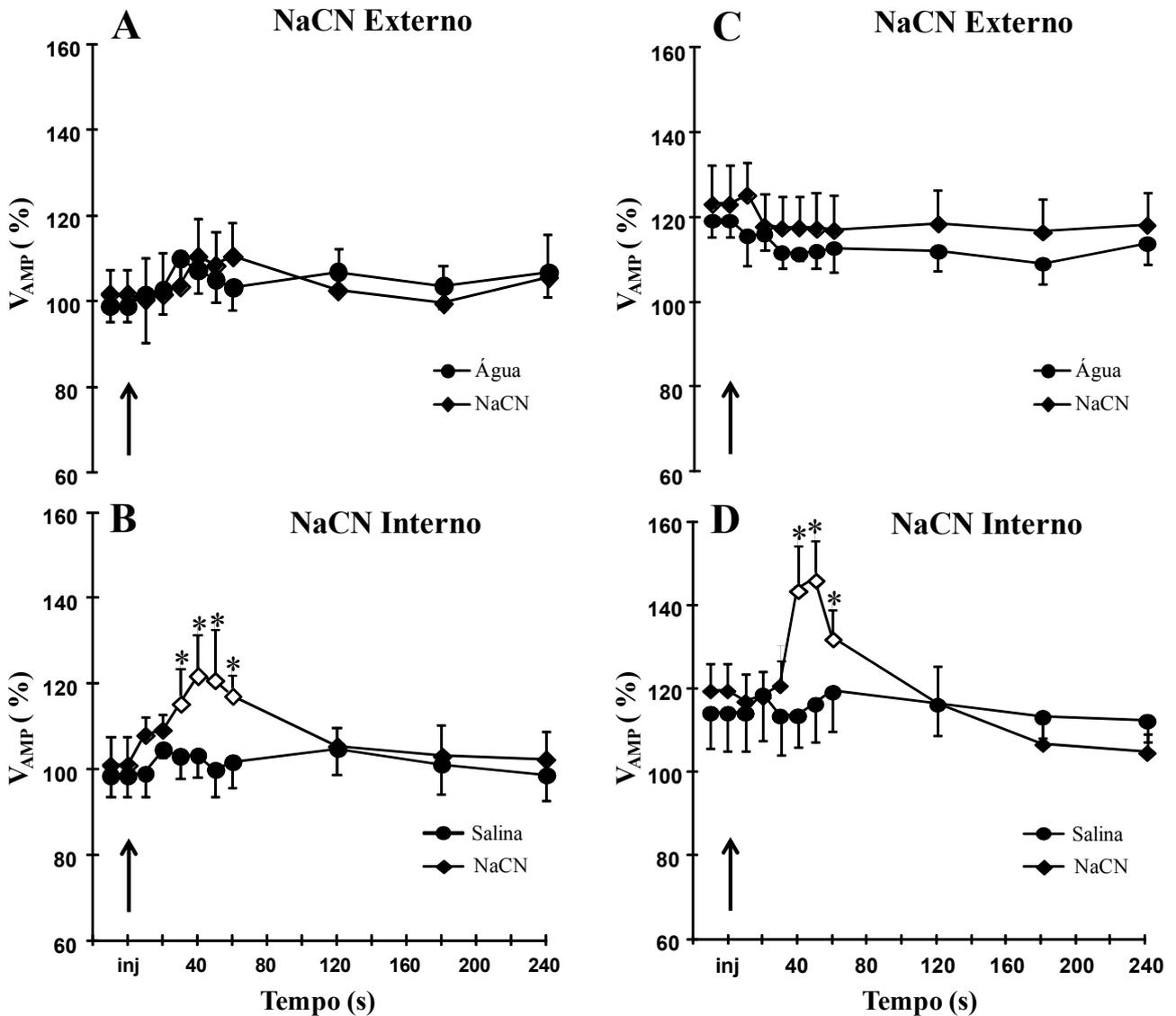


Figura 22. Mudanças na amplitude ventilatória (V_{AMP} - %) de *C. gariepinus* após a sequência de injeções externas de H₂O (1,0 mL), NaCN (1,0 mL de 1,25 mg.mL⁻¹) e injeções internas de salina (0,5 mL) e NaCN (0,5 mL de 0,75 mg.mL⁻¹). **A** e **B** – peixes com os arcos branquiais intactos (GC; n =12), **C** e **D** – peixes com os primeiros arcos branquiais extirpados (GD; n =12). As setas indicam o momento das injeções. Símbolos abertos representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). * - indica valores que são significativamente diferentes entre os grupos (p < 0,05). Pontos são médias ± S.E.M.

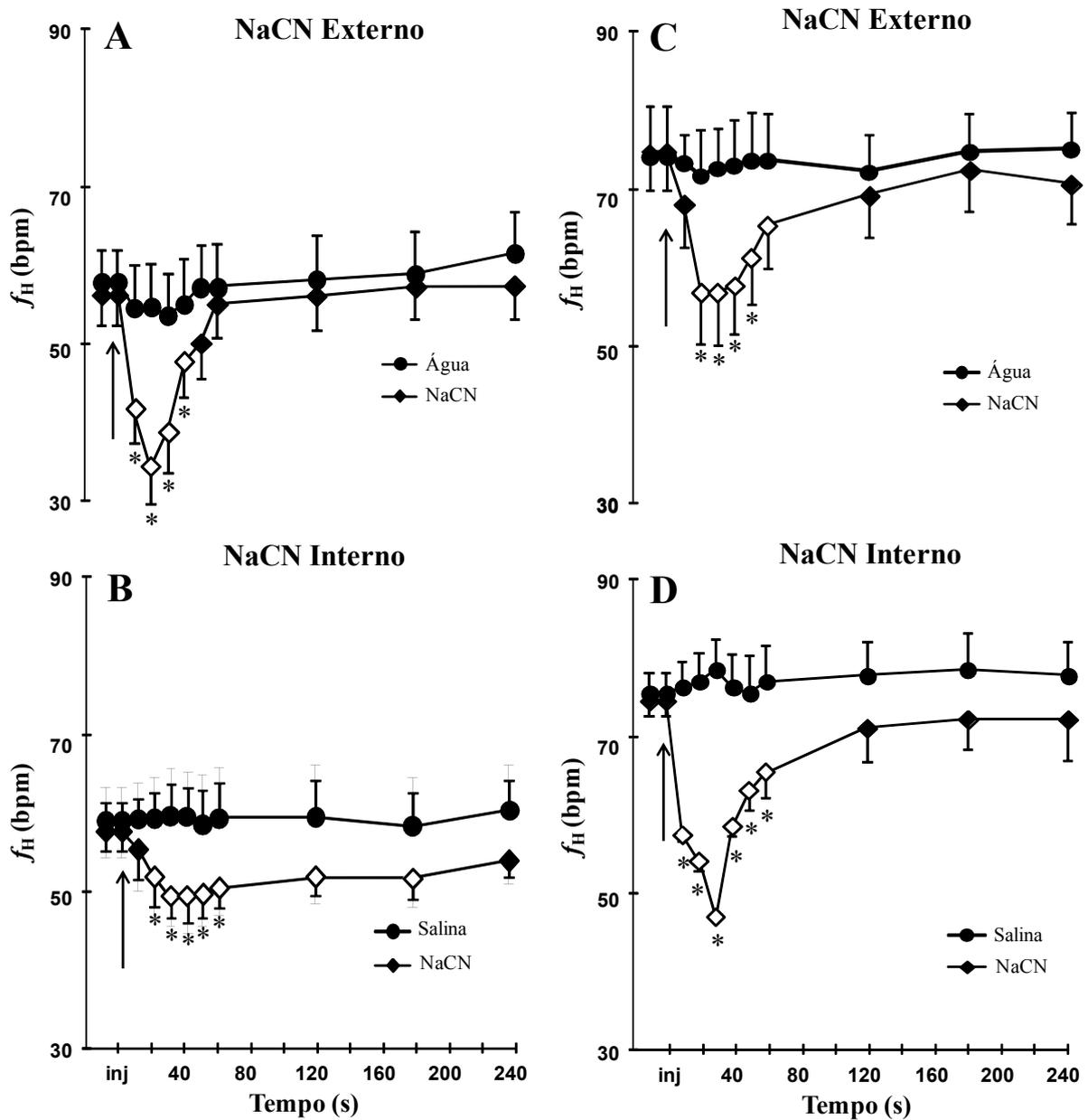


Figura 23. Mudanças na frequência cardíaca (f_H – bpm) de *C. gariepinus* após a sequência de injeções externas de H_2O (1,0 mL), NaCN (1,0 mL de $1,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e injeções internas de salina (0,5 mL) e NaCN (0,5 mL de $0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). **A e B** – peixes com os arcos branquiais intactos (GC; $n = 12$), **C e D** – peixes com os primeiros arcos branquiais extirpados (GD; $n = 12$). As setas indicam o momento das injeções. Símbolos abertos representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). * - indica valores que são significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Pontos são médias \pm S.E.M.

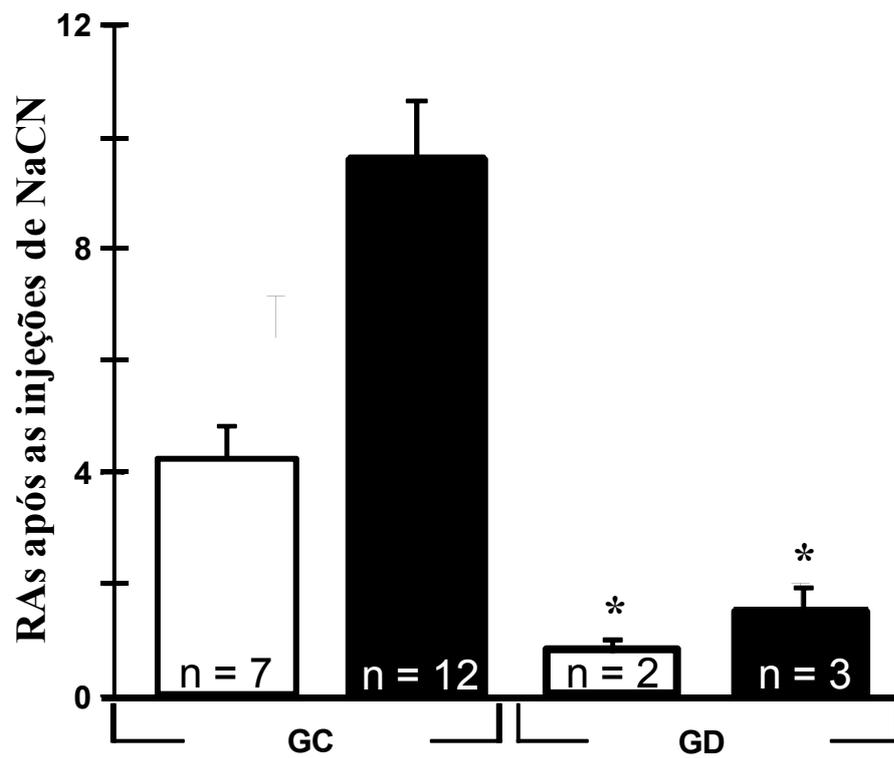


Figura 24. Números de respirações aéreas após injeções de NaCN externas (barras brancas) e internas (barras pretas) do grupo controle (GC) e do grupo com ablação do 1º par de arcos branquiais (GD) do bagre-africano, *Clarias gariepinus*. O número de peixes que demonstraram o comportamento de respiração aérea (*n*) aparece dentro das barras. * - indicam valores que são significativamente diferentes entre os grupos ($p \leq 0,05$). Valores são médias \pm S.E.M.

4.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV: RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE AUTÔNOMICO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA PRÉ- E PÓS-RESPIRAÇÃO AÉREA

4.4.1. Suporte Farmacológico

Os efeitos das injeções do suporte farmacológico sobre a f_H de *C. gariepinus* intacto ($n = 4$) está apresentado na Figura 24. Não foram realizadas análises estatísticas nestes dados devido a quantidade amostral não ser suficiente.

O gráfico mostra que após a injeção de adrenalina houve aumento de aproximadamente 75 % na f_H dos animais, chegando à $86,2 \pm 8,3$ bpm. Esta taquicardia era esperada e perdurou cerca de 3 a 5 min. Com a injeção de propranolol (antagonista β -adrenérgico), houve queda da f_H em aproximadamente 14%, chegando a valores de $43,3 \pm 2,3$ bpm. Esta leve diminuição da f_H não foi abolida pela injeção de adrenalina, injetada após 1 h da injeção do propranolol, o que indica que houve completo bloqueio do sistema autônomo simpático (adrenérgico) por este volume e concentração de propranolol (0,5 mL de 3,0 mg.Kg⁻¹ de propranolol). Sendo assim, esta concentração foi escolhida como o padrão para os experimentos posteriores. Além disso, a leve bradicardia apresentada perdurou entre 6 a 8 h, retornando lentamente aos valores basais de **PT**.

A Figura 24 mostra também que após a injeção de acetilcolina (agonista colinérgico) os animais diminuíram em cerca de 20% a f_H , chegando à $39,5 \pm 5,2$ bpm. Esta bradicardia era esperada e perdurou cerca de 4 a 6 min. Com a injeção de atropina (antagonista muscarínico), houve aumento da f_H em aproximadamente 65 %, chegando a valores de $81,4 \pm 3,1$. Este aumento da f_H não foi eliminado pela injeção de acetilcolina, injetada após 1 h da injeção de atropina, o que indica que houve total bloqueio do sistema nervoso autônomo parassimpático (colinérgico) pelo volume e concentração de atropina (0,5 mL de 1,2 mg.Kg⁻¹ de atropina). Desta forma, esta concentração foi escolhida como o padrão para os experimentos posteriores. Ainda mais, este aumento da f_H perdurou por cerca de 2 a 3 h.

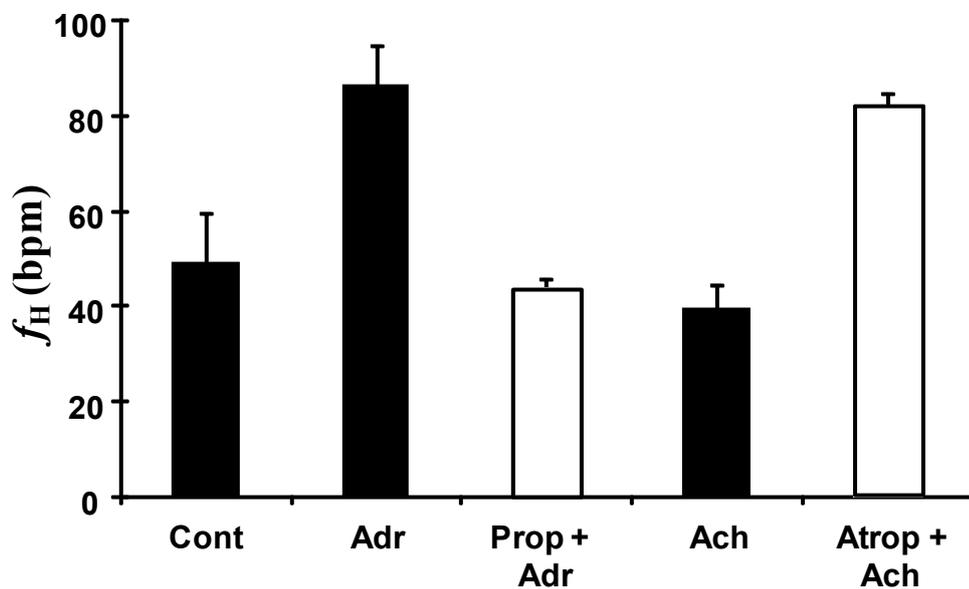


Figura 25. Efeitos das injeções internas (veia caudal) do suporte farmacológico sobre a frequência cardíaca (f_H – bpm) de *C. gariepinus* ($n = 4$) durante normóxia. **Cont** – controle; **Adr** – injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L $^{-1}$ de adrenalina; **Prop + Adr** - injeção de 0,5 mL de 3,0 mg.Kg $^{-1}$ de propranolol seguido, após 1 h, da injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L $^{-1}$ de adrenalina; **Ach** - injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L $^{-1}$ de acetilcolina; **Atrop + Ach** – injeção de 0,5 mL de 1,2 mg.Kg $^{-1}$ de atropina seguido, após 1 h, da injeção de 0,5 mL de 10^{-5} mol.L $^{-1}$ de acetilcolina. Valores são médias \pm S.E.M.

4.4.2. Relação entre os Tônus Adrenérgico e Colinérgico e a f_H Pré- e Pós-respiração aérea

Os efeitos das injeções de propranolol e atropina para bloqueio do controle autonômico colinérgico e adrenérgico, respectivamente, de ambos os grupos experimentais (GC e GD) de *C. gariepinus* ($n = 10$), durante normóxia, estão apresentados na Tabela 9 e na Figura 25.

No grupo GC, os tratamentos PT e prop aumentaram a f_H pós-RA de ~33 e ~40%, respectivamente. No entanto, os valores da f_H pré-RA de prop foram significativamente menores do que no PT devido o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos. Contrariamente, no P&A, a frequência de despolarização das células do marca-passo elevaram f_H pré-RA o qual se manteve constante pós-RA em cerca de ~92 bpm (Tab. 9). Estes dados foram semelhantes aos do respirador facultativo jeju (*Hoplerythrimus unitaeniatus*, McKENZIE et al., 2007) em hipóxia severa. Em jeju, o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos (prop) não também impediu a taquicardia pós-RA. Além disso, o bloqueio colinérgico, efetuado pela injeção de atropina, apesar de elevar a f_H para valores máximos tanto no bagre-africano (Fig. 25) como em jeju (McKENZIE et al., 2007), falharam em demonstrar taquicardia pós-RA. Desta forma, é possível concluir que a modulação dos ajustes cardíacos em *C. gariepinus* não é efetuada mediante despolarização adrenérgica no miocárdio, isto é, o tônus adrenérgico não é o responsável pela taquicardia pós-RA.

Através do cálculo dos tônus autonômicos do coração do bagre-africano, verificou-se uma diminuição do tônus colinérgico pós-RA (de 57,5 para 17,2 %; Fig. 25). Esta redução também foi observada no jeju (de 304,3 para 81,5%; McKENZIE et al., 2007). Estudos sobre o controle nervoso autonômico do coração de bacalhau (*Gadus morhua*; FRITSCHÉ & NILSSON, 1990) demonstraram um aumento do tônus colinérgico durante hipóxia severa (~35 mmHg). Este aumento, por sua vez, foi relacionado ao desenvolvimento da bradicardia hipóxica reflexa. Assim sendo, jeju demonstrou um tônus colinérgico muito mais elevado que o bagre-africano devido sua exposição à hipóxia severa, resultando, conseqüentemente, na bradicardia reflexa (de 32,1 bpm, em normóxia, para 26,2 bpm em hipóxia de ~7,5 mmHg). Ainda mais, esta exacerbação do tônus colinérgico foi determinante para que o jeju desenvolvesse também uma f_H pós-RA muito mais elevada que a taquicardia do bagre-africano, tanto no PT como no prop, sendo ~ 81 % (de 26,2 para 47,6 bpm) e ~115% (de 19,8 para 42,7 bpm), respectivamente (ver McKenzie et al., 2007). Diversos estudos com teleósteos de respiração bimodal, respiração aérea e outros vertebrados comprovam que a inibição vagal é a responsável pela modulação autonômica do coração (JOHANSEN, 1966;

JORDAN & SPYER, 1987; GRAHAM et al., 1995; TAYLOR et al., 1999; CAMPBELL et al., 2004, 2005; SKAALS et al., 2006). Ela é decorrente da liberação de acetilcolina, através do nervo X, nos receptores muscarínicos do marca-passo e musculatura atrial do miocárdio (YOUNG, 1936; RANDALL, 1966; RANDALL & STEPHENS, 1967; GANNON & BURNSTOCK, 1969; HOLMGREN, 1977, 1981; CAMERON, 1979). Assim sendo, apesar do tônus colinérgico de *C. gariepinus* ter sido calculado em normóxia, foi possível verificar que este tônus é o responsável pela modulação autonômica de seu coração, diminuindo sua atuação para promover taquicardia pós-RA e aumentando-a para desenvolver bradicardia pré-RA, principalmente durante hipóxica, como apresentada nos experimentos anteriores.

Os cálculos dos tônus adrenérgicos de *C. gariepinus* demonstraram que este tônus foi menor que o colinérgico e que diminuiu pós-RA (de 35,8 para 20,7%). Diversos estudos demonstraram que a percentagem de atuação dos tônus adrenérgico e colinérgico são diferentes entre os teleósteos (AXELSSON et al., 1987; ALTIMIRAS et al., 1997; AXELSSON, 2005; McKENZIE et al., 2007; LEITE, et al., 2009; PETERSEN & GAMPERL, 2010). Uma recente revisão sobre os tônus autonômicos cardíacos dos teleósteos demonstrou que estes tônus possuem uma relação direta com a temperatura ambiental em que vivem, sendo o tônus colinérgico predominante em espécies de climas temperados (< 5°C) e quentes (> 20°C), enquanto o tônus adrenérgico predomina em espécies de temperaturas mornas (SANDBLOM & AXELSSON, 2011). Sabendo que bagre-africano é encontrado em regiões tropicais da África, sul da Ásia e América (LACHNER et al., 1970; COURTENAY & STAUFFER, 1984), era esperado, tanto do ponto de vista evolutivo como pela sua aclimatação à 25 ± 1 °C, a predominância do seu tônus colinérgico sobre o adrenérgico de acordo com esta revisão.

Contudo, ao comparar os tônus autonômicos do coração do bagre-africano pós-RA, percebe-se que a variação do tônus adrenérgico foi quantitativamente menor que a do colinérgico (42 e 70%, respectivamente) e manteve-se ligeiramente superior a este (Fig. 25). Isto ocorreu também em jeju, cuja variação dos tônus adrenérgico e colinérgico pós-RA foram de, respectivamente, 37 e 73% (McKENZIE et al., 2007). Historicamente, assume-se que os teleósteos geralmente não possuem aceleração cardíaca simpática (RANDALL, 1968). Entretanto, estudos comprovam a existência de cadeias simpáticas prolongando-se de dentro da cabeça de alguns teleósteos, como a truta, onde se unem com nervos cranianos formando um tronco vago-simpático (HOLMGREN, 1977; NILSSON, 1983; GIBBINS, 1994), cujas fibras adrenérgicas inervam seu coração (YAMANOUCJI & BURNSTOCK, 1968; GANNON & BURNSTOCK, 1969). Sendo assim, estudos demonstraram um tônus

adrenérgico no coração de bacalhau (*Gadus*) e douradinho (*Carassius*), porém a relativa importância do controle adrenérgico tanto neural como humoral ainda permanece incerta (NILSSON, 1983). Sabe-se que efeitos cronotrópicos e ionotrópicos positivos são produzidos no coração dos teleósteos por agonistas adrenérgicos e nervos adrenérgicos mediados por receptores β -adrenérgicos associados às células marca-passo e miocárdiais (RANDALL & STEPHENS, 1967; GANNON & BURNSTOCK, 1969; HOLMGREN, 1977; CAMERON & BROWN, 1981; NILSSON, 1983). Contrariamente, existem evidências de que receptores α -adrenérgicos promovam efeitos cronotrópicos negativos no coração de algumas espécies (TIRRI & RIPATTI, 1982; FARREL, 1984, 1991; TEMMA et al., 1989). Sendo assim, são necessários outros experimentos farmacológicos no bagre-africano *in vivo* (normóxia e hipóxia) e *in vitro* que respondam quais receptores, β e/ou α -adrenérgicos, estão presentes em seu coração e promovendo o tônus adrenérgico pré- e pós-RA apresentado. No entanto, é possível concluir que os receptores β -adrenérgicos do coração de *C. gariepinus* não atuam sobre a f_H pós-RA, devido a ausência de taquicardia no tratamento com atropina (Tab. 9). Além disso, pode-se sugerir que os receptores β -adrenérgicos estejam atuando apenas no aumento da força de contração (efeito ionotrópico positivo) pré- e pós-RA, enquanto os receptores α -adrenérgicos atuam na bradicardia pré-RA (efeito cronotrópico negativo) concomitantemente a inervação vagal colinérgica. Desta forma, supõe-se que os resultados do tônus adrenérgico pré-RA (35,8 %) e pós-RA (20,7%) são uma modulação vagal adrenérgica intrínseca sobre os dois grupos de receptores adrenérgicos.

Os dados do P&A do grupo GC apresentaram f_H elevadas tanto pré- quanto pós-RA. O completo bloqueio autonômico em jejum teve efeitos similares (McKENZIE et al., 2007). De acordo com GUYTON & HALL (2006), as fibras presentes no nódulo AS, em mamíferos, possuem alta frequência de despolarização ocasionada por um limiar menos negativo que os das fibras musculares cardíacas de outras regiões e das fibras musculares esqueléticas. Além disso, esta menor negatividade no potencial de repouso de membrana deste grupo (entre -55 e -60 mV, contra -85 à -90 mV das fibras ventriculares) é resultante da maior permeabilidade ao cálcio e sódio. Estes íons, ao cruzarem a membrana, neutralizam boa parte da negatividade celular das fibras sinusais. Assim sendo, a f_H do bagre-africano durante o P&A provavelmente demonstrou, mesmo que de forma indireta, a frequência de despolarização das fibras do nódulo SA (marca-passo), sendo 91-92 bpm. A importância desta alta frequência de despolarização das fibras sinusais é proteger o nódulo SA contra a entrada ou invasão de outros potenciais de ação externos, que poderiam causar extra-sístoles e,

consequentemente, arritmias cardíacas (BLEEKER et al., 1982; BOYETT et al., 1999; BOYETT et al., 2000).

No grupo GD, a ablação do 1º par de arcos branquiais elevou significativamente os valores de f_H pré-RA comparado com o valores PT do grupo GC. Após comportamentos de RA, o aumento da f_H pós-RA, do PT do grupo GD, foi significativamente menor que do grupo GC sendo, respectivamente, de ~16 e 33%. Injeções de **prop** tiveram o mesmo efeito que do GC diminuindo a f_H pré-RA e demonstrando taquicardia pós RA. Ainda mais, injeções de **P&A** do grupo GD demonstraram respostas semelhantes que no grupo GC de elevar a f_H pré-RA e mantê-la pós-RA.

O aumento da f_H do **PT** no GD pré-RA confirma o mesmo padrão apresentando nos experimentos anteriores, de sempre elevar a f_H após a ablação do 1º par de arcos branquiais. Estudos anteriores mostraram que a deservação seriada ou completa dos ramos dos nervos cranianos que inervam os quimiorreceptores de O_2 do aparato respiratório (brânquias, pseudobrânquias ou cavidade orobranquial) eleva a f_H . Isto ocorreu em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; SMITH & JONES 1978), traíra (*H. malabaricus*, SUNDIN et al., 1999), pacu (*Piaractus mesopotamicus*, LEITE et al., 2007), trairão (*H. lacerdae*, MICHELI-CAMPBELL et al., 2009), jeju (*H. unitaeniatus*, LOPES et al., 2010), tambaqui (*Colossoma macropomum*, FLORINDO et al., 2004). Entretanto, tal comportamento fisiológico não foi observado em “channel catfish” (*Ictalurus punctatus*, BURLESON & SMATRESK 1990b) e “bowfin” (*A. calva*, MCKENZIE et al., 1991a). Estudos com salmão, *Oncorhynchus kisutch*, observaram que após a secção do nervo IX os animais apresentaram bradicardia hipóxica. Contudo, após total deservação do 1º par de arcos branquiais, isto é, incluindo o ramo pré-tremático do nervo craniano X, os animais não exibiram bradicardia mais acentuada (SMITH & DAVIE, 1984). Segundo os autores, o ramo pré-tremático do X não faria sinapses com os centros cardíacos do SNC, a fim de modular o controle cardíaco. Assim sendo, pode-se sugerir que o aumento na f_H em *Clarias gariepinus*, no GD de todos experimentos do presente estudo, ocorra devido a perda das aferências para o SNC advindas do nervo IX e não do ramo pré-tremático do X que inerva o 1º par de arcos branquiais. Todavia, esta hipótese necessita ser comprovada experimentalmente.

A ablação do 1º par de arcos branquiais diminuiu o tônus colinérgico do GD pré-RA com relação ao do GC, sendo, respectivamente, 33,5 e 57,5% (Fig. 25). Como discutido anteriormente, o tônus colinérgico é o responsável pela modulação da f_H tanto pré- quanto pós-RA do bagre-africano. Desta forma, a diminuição do tônus colinérgico corrobora o aumento da f_H pré-RA do GD de todos os experimentos deste trabalho. Além disso, ao se

comparar a variação do tônus colinérgico pós-RA do GD (~31,6%) com a do GC (~70%), observa-se uma variação menor deste tônus no GD constatada pela taquicardia menos acentuada do seu PT. Assim sendo, embora a modulação autonômica da f_H do coração de *C. gariepinus* seja originada em quimiorreceptores de O₂ branquiais de todos os arcos, pode-se afirmar que seu maior controle ocorre pelos quimiorreceptores de O₂ dos 1^{os} arcos branquiais que enviam informações sensoriais ao SNC via pelo nervo IX.

A ablação do 1^o par de arcos branquiais também diminuiu o tônus adrenérgico pré-RA com relação ao GC, sendo, respectivamente, de 15,9 e 35,8%. No entanto, o tônus adrenérgico pós-RA no GD aumentou para 21,7% alcançando valores semelhantes ao do GC pós-RA. Este aumento do tônus adrenérgico pode estar relacionado a uma maior força de contração efetuada pelos receptores β -adrenérgicos do miocárdio (efeito cronotrópico positivo; RANDALL & STEPHENS, 1967; GANNON & BURNSTOCK, 1969; HOLMGREN, 1977; CAMERON & BROWN, 1981; NILSSON, 1983). Estudos sugerem que outros fatores estejam promovendo a taquicardia e o tônus adrenérgico pós-RA nos grupos GC e, principalmente, no GD que possui menor área branquial. Um destes fatores seria a vasoconstrição dos seios venosos que é mediada por receptores α -adrenérgicos controlados por inervação adrenérgica em teleósteos (NILSSON, 1994; SANDBLOM & AXELSSON, 2006). Conseqüentemente, esta vasoconstrição promoveria o aumento do retorno venoso e, conseqüentemente, o aumento na força de contração responsável para ejetar um maior volume dentro do ventrículo durante sístole (mecanismo de Frank-Starling) (STEVENS et al., 1972; WOOD & SHELTON, 1980; AXELSSON & FARRELL, 1993). Além disso, foi demonstrado, nos teleósteos, a existência de receptores β -adrenérgicos da vasculatura branquial que suscitam vasodilatação local (SANDBLOM & AXELSSON, 2011). Assim sendo, devido à vasculatura dos ABOs de *C. gariepinus* ser contínua com a vasculatura branquial (GRAHAM, 1997), pode-se sugerir uma maior perfusão do ABO, durante as incursões para tomada de ar atmosférico (JOHANSEN, 1966; AXELSSON et al., 1989; SKAALS et al., 2006; McKENZIE et al., 2007), modulada pela atuação dos receptores β -adrenérgicos tanto na vasculatura branquial quanto na vasculatura do ABO, principalmente durante hipóxia. No entanto, são necessários experimentos farmacológicos e de fluxo sanguíneo a fim de comprovar se tais modulações vasculares ocorrem devido as alterações do tônus adrenérgico no bagre-africano.

Tabela 9. Valores médios (\pm S.E.M.) da frequência cardíaca (f_H) pré e pós-respirações aéreas do GC ($n = 10$) e do GD ($n = 10$) de *Clarias gariepinus* seguido dos bloqueios parassimpático e simpático do coração durante normóxia ($PwO_2 \sim 140$ mmhg).

Tratamentos	f_H (bpm)	
	pré-RA	pós-RA
Controle (PT)	69,3 \pm 3,0	92,4 \pm 4,7 ^b
Propranolol (prop)	57,1 \pm 4,4 ^a	80,5 \pm 2,5 ^b
GC bloqueio completo (P&A)	91,2 \pm 5,9 ^a	92,9 \pm 6,9
Atropina*	98,8 \pm 8,3	101,9 \pm 2,1
Controle (PT)	78,9 \pm 3,1 ^c	92,1 \pm 4,2 ^b
GD Propranolol (prop)	67,5 \pm 2,5 ^a	72,2 \pm 3,9
bloqueio completo (P&A)	85,9 \pm 5,1 ^a	85,6 \pm 5,8 ^c

^a indica diferença significativa entre os valores das injeções e o controle, antes ou após RA.

^b indica diferença significativa, dentro da mesma injeção do mesmo grupo, dos valores pré e pós-RA

^c indica diferença significativa entre os grupos experimentais, GC e GD, com relação as mesmas injeções e valores de pré- e pós-RA.

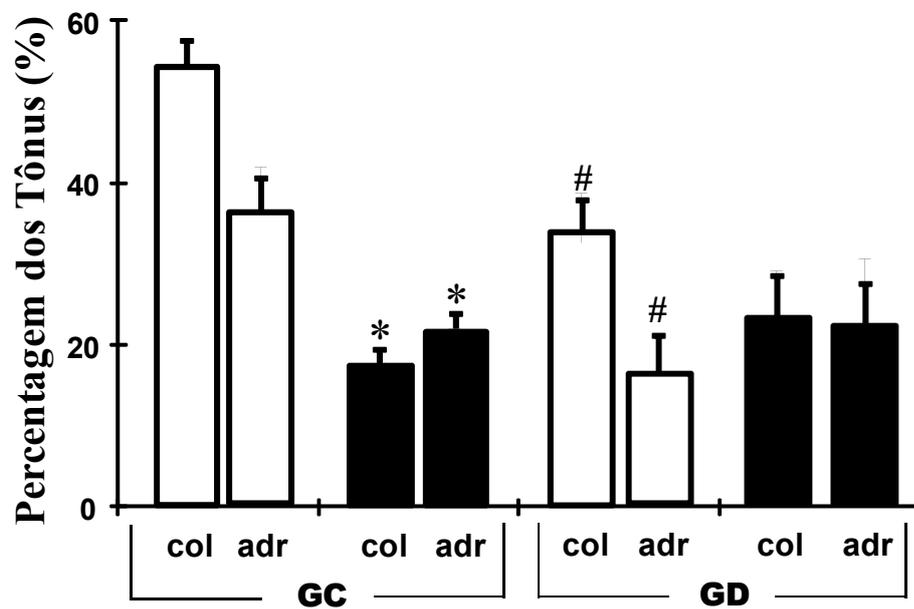


Figura 26. Percentagem dos tónus colinérgico e adrenérgico após bloqueio parassimpático e simpático do coração do grupo controle (GC; $n = 10$) e do grupo com ablação do 1^o par de arcos branquiais (GD; $n = 10$) do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, durante normóxia com acesso ao ar atmosférico. Barras brancas representam valores pré-RAs e barras pretas valores pós-RAs. * - indica valores significativos entre os dados do mesmo grupo experimental. # - indica valores significativos entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$). Valores são médias \pm S.E.M.

5. DISCUSSÃO FINAL

Ao considerarmos o habitat inóspito onde o bagre-africano, *C. gariepinus*, pode ser encontrado aclimatizado, sendo desde hipóxia moderada até hipóxia severa ou anóxia, porém, logicamente, *com* livre acesso ao ar atmosférico, conclui-se que esta espécie demonstra uma sequência de respostas fisiológicas:

Primeiramente, eles demonstram uma resposta bradicárdica à hipóxia moderada, identificada pelos quimiorreceptores de O₂ branquiais orientados externamente. Esta situação fisiológica persiste até que o bagre-africano realize um comportamento de RA. Entretanto, antes da RA, os quimiorreceptores de O₂ branquiais enviam impulsos nervosos ao tronco encefálico, cujos núcleos cardíacos irão estimular colinergicamente o coração para queda da f_H . Secundariamente, quando provavelmente a PaO_2 do animal diminui resultante da PwO_2 alcançar a PcO_2 desta espécie, iniciam-se RAs significativas mediadas por quimiorreceptores de O₂ branquiais orientados internamente. Estas RAs, por sua vez, são acompanhadas da diminuição do tônus colinérgico que, conseqüentemente, eleva a f_H pós-RA. Concomitantemente, o tônus adrenérgico também diminui pós-RA, porém não na mesma proporção o que sugere uma atuação dos receptores β -adrenérgicos sobre a força de contração do ventrículo e o desvio da corrente sanguínea para os 2^{os} e 4^{os} arcos branquiais, a fim de ejetar maior volume sanguíneo para a perfusão do ABO.

Além disso, pode surgir outra resposta frente diminuição da PaO_2 que é o aumento da f_R aquática. Tal situação ocorre principalmente pela inibição das RAs devido presença de predadores aéreos ou outros fatores que possam levar o bagre-africano absorver O₂ apenas da água hipóxica através da respiração branquial (McKENZIE, dados não publicados). Ainda, caso persista a impossibilidade para as incursões aéreas, *C. gariepinus* pode ainda apresentar uma diminuição do metabolismo aeróbico ($\dot{V}O_2$) pela diminuição da atividade de forrageamento (estratégia de “esperar para ver”) e aumentos da \dot{V}_G principalmente devido a aumentos no V_T . Todavia, a diminuição do gasto de energia ou do consumo de O₂ não ocorre indefinidamente. Desta forma, o bagre-africano terá de escolher através de seu instinto intrínseco herdado evolutivamente ou aprendido e percepções sensoriais quimiossensitivas, seja ao O₂, à luz ou outros sentidos, pela sua sobrevivência ou subindo à superfície aquática para realizar a RA, na possibilidade de ser predado, ou forragear à procura de águas mais bem oxigenadas a fim de manter seu metabolismo aeróbico adequado.

6. CONCLUSÕES

1. *Clarias gariepinus*, de ambos os grupos GC e GD, mesmo sem acesso ao ar atmosférico, conseguem manter a $\dot{V}O_2$ constante até a PcO_2 (respectivamente, de 61 e 79 mmHg) por meio de um fino ajuste do sistema cardiorrespiratório (hiperventilação e bradicardia), ou seja, é uma espécie oxirreguladora.

2. Nesta espécie os quimiorreceptores de O_2 localizados no 1º par de arcos branquiais são responsáveis por todo aumento da f_R e parte da bradicardia hipóxica.

3. O aumento das RAs em resposta à hipóxia gradual *com* acesso ao ar atmosférico demonstrou que *C. gariepinus* é mais dependente do O_2 atmosférico do que a maioria dos teleósteos de respiração aérea já estudados.

4. *Clarias gariepinus* é uma espécie de RA facultativa contínua, com ajuste cardíaco típico de respirador aquático (bradicardia - pré-RAs) e aéreo (taquicardia – pós-RAs), mecanismo este que propicia a manutenção do metabolismo aeróbico e, conseqüentemente, na sua sobrevivência em ambientes hipóxicos em que é frequentemente encontrado.

5. *Clarias gariepinus* responde à hipóxia com uma bradicardia mediada primeiramente por quimiorreceptores de O_2 branquiais distribuídos por todos os arcos branquiais e orientados tanto externa quanto internamente. Concomitantemente, aumentos nas f_R são mediados por quimiorreceptores O_2 branquiais distribuídos apenas no 1º par de arcos branquiais e orientados apenas internamente. Ao contrário, a V_{AMP} é modulada por quimiorreceptores de O_2 branquiais distribuídos por todos os arcos e orientada internamente, porém seu aumento foi apenas demonstrado em hipóxia *sem* acesso ao ar (\dot{V}_G), devido aumentos f_{RA} que são mediados por quimiorreceptores de O_2 presentes em todos os arcos e predominantemente orientados internamente.

6. O controle autonômico do coração desta espécie é modulado predominantemente pela atuação vagal colinérgica parassimpática tanto pré- quanto pós-RA. Ainda, os quimiorreceptores de O_2 do 1º par de arcos branquiais são os principais responsáveis por modular o tônus colinérgico do coração de *C. gariepinus* através de impulsos sensoriais do nervo glossofaríngeo (IX) até os núcleos cardíacos do SNC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEYEMO, A. A.; YAKUBU, A. F.; OLADOSU, G. A.; AYINLA, O. A. Predation by aquatic insects on African catfish fry. **Aquat. Int.**, v. 5, p. 101-103, 1997
- AFFONSO E. G.; RANTIN, F. T. Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 141, p. 275-280, 2005.
- AGUIAR, L.H.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of temperature on the cardio-respiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Thermal Biol.**, v. 27, p. 299-308, 2001.
- AHO, E.; VORNANEN, M. Cold acclimation increases basal heart rate but decreases its thermal tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Comp. Physiol.**, v. 171, p. 183-179, 2001.
- AKOLL, P.; Konecny R.; Mwanja W. W.; Nattabi J. K.; Agoe, C.; Schiemer, F. Parasite fauna of farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*) in Uganda. **Parasitol. Res.**, v. 110, p. 315-323, 2012.
- ALMEIDA-VAL, V.M.; VAL, A.L.; HOCHACHKA, P.W. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: Status of an under-explored biological “goldmine”. In: HOCHACHKA, P.W. **Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation**. CRC Press, Boca Raton, 2000, p. 435-445.
- ALTIMIRAS, J., AISSAOUI, A., TORT, L., AXELSSON, M. Cholinergic and adrenergic tones in the control of the heart rate in teleosts. How should they be calculated? **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118, p. 131–139, 1997.
- ALVES, C. B. M.; VONO, V.; VIEIRA, F. Presence of the walking catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) (Siluriformes, Clariidae) in Minas Gerais state hydrographic basins, Brazil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 16, p. 259-263, 1999.
- ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Ed. Da UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, 1997, p. 166.
- AR, A.; ZACKS, D. Alterations in the bimodal gas exchange of the African catfish *Clarias lazera*. In: PAGANELLI, C.V.; FARHI, L.E. **Physiological function in special environments**. Springer-Verlag, New York, 1989, p. 172-190.
- ARRINGTON, D. A.; WINEMILLER, K. O.; LOFTUS, W. F.; AKIN, A. How often do fishes “run on empty”? **Ecology**, v. 83, p. 2145-2151, 2002.
- AXELSSON, M. On the cardiac control in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 93, p. 561-565, 1989.
- AXELSSON, M. The circulatory system and its control. In: Farrell, A. P., Steffensen, J. F. **The Physiology of Polar Fishes**, vol. 22. Academic Press, New York, London, 2005.

- AXELSSON, M.; FARRELL, A.P. Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 963-971, 1993.
- AXELSSON, M.; EHRENSTROM, F.; NILSSON, S. Cholinergic and adrenergic influence on the teleost heart *in vivo*. **Exp. Biol.**, v. 46, p. 179-186, 1987.
- AXELSSON, M., ABE, A.S., BICUDO, J.E., NILSSON, S. On the cardiac control in the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 93, p. 561-56, 1989.
- AXELSSON, M.; FARRELL, A. P.; NILSSON, S. Effects of hypoxia and drugs on the cardiovascular dynamics of the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. **J. Exp. Biol.**, v. 151, p. 297-316, 1990.
- BAILLY, Y.; DUNEL-ERB, S.; LAURENT, P. The neuroepithelial cells of the fish gill filament: Indolamine-immunocytochemistry and innervations. **Anat. Rec.**, v. 233, p. 143-161, 1992.
- BALLINTIYN, C.M.; JUCH, P.J.W. Interactions of respiration with coughing, feeding, vision and oculomotor control in fish. **Brain Behav. Evol.**, v. 25, p. 99-108, 1984.
- BALLINTIYN, C. Evaluation of central nervous control of ventilation in vertebrates. In: TAYLOR, E. W. **The Neurobiology of the Cardiovascular System**. Manchester, UK: Manchester Univ. Press, 1987, p. 3-27.
- BAMFORD, O. Oxygen reception in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 48, p. 69-76, 1974.
- BANCHERO, N.; GROVER, R. F.; WILL, J. A. Oxygen transport in the llama (*Lama glama*). **Respir. Physiol.**, v. 12, p. 201-115, 1971.
- BARRET, D.J.; TAYLOR, E.W. Changes in heart rate during progressive hypoxia in the dogfish, *Scyliorhinus canicula* L.: evidence for a venous oxygen receptor. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 78, p. 697-703, 1984.
- BERKSON, H. Physiological adjustments to prolonged diving in the Pacific green turtle (*Chelonia agassizii*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 18, p. 101, 1966.
- BELÃO, T.C.; LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Cardiorespiratory responses to hypoxia in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), an air-breathing fish. **J. Comp. Physiol.**, v. 181, p. 905-916, 2011.
- BERSCHICK, P.; BRIDGES, C.R.; GRIESHABER, M.K. The influence of hyperoxia, hypoxia and temperature on the respiratory physiology of the intertidal rockpool fish *Gobius cobitis Pallas*. **J. Exp. Biol.**, v. 130, p. 369-387, 1987.
- BIANCHI, A.L.; DENAVIT-SAUBIE, M.; CHAMPAGNAT, J. Central control of breathing in mammals: neural circuitry, membrane properties and neurotransmitters. **Physiol. Rev.**, v. 75, p. 1-45, 1995.
- BICUDO, J. E. P. W.; JOHANSEN, K. Respiratory gas exchange in the air-breathing fish, *Synbranchus marmoratus*. **Environ. Biol. Fishes**, v. 4, p. 1507-1510, 1979.

- BLACK, C. P.; TENNEY, S. M. Oxygen transport during progressive hypoxia in high-altitude and sea-level waterfowl. **Respir. Physiol.**, v. 39, p. 217-239, 1980.
- BLEEKER, W. K.; MACKAAY, A. J. C.; MASSON-PEVET, M.; OP'T HOF, T.; JONGSMA, H. J.; BOUMAN, L. N. Asymmetry of the sino-atrial conduction in the rabbit heart. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 14, p. 633-643, 1982.
- BLESSING, M. H. Studies on the concentration of myoglobin in the sea-cow and porpoise. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 41A, 475-480, 1972.
- BOUTILIER, R. G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. **J. Exp. Biol.**, v. 204, p. 3171-3181, 2001.
- BOUVEROT, P. High Altitudes. In: BOUVEROT, P. (Eds.). **Adaptation to Altitude-Hypoxia in Vertebrates**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1985a, p. 1-11.
- BOUVEROT, P. The respiratory gas exchange system and energy metabolism under altitude hypoxia. In: BOUVEROT, P. (Eds.). **Adaptation to Altitude-Hypoxia in Vertebrates**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1985b, p. 19-34.
- BOUVEROT, P. Difussive Processes. In: BOUVEROT, P. (Eds.). **Adaptation to Altitude-Hypoxia in Vertebrates**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1985c, p. 94-119.
- BOUVEROT, P.; LERAY, C. Biochemical Changes. In: BOUVEROT, P. (Eds.). **Adaptation to Altitude-Hypoxia in Vertebrates**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1985, p. 110-141.
- BOYETT, M. R.; HONJO, H.; YAMAMOTO, M. NIKMARAM, M. R.; NIWA, R.; KODAMA, I. A downward gradient in action potential duration along the conduction path in and around the sinoatrial node. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. 686-698, 1999.
- BOYETT, M. R.; HONJO, H.; KODAMA, I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. **Cardiovasc. Res.**, v. 47, p. 658-687, 2000.
- BRUTON, M. . The breeding biology and early development of *Clarias gariepinus* (Pisces, Clariidae) in Lake Sibaya, South Africa with a review of breeding in species of the subgenus *Clarias* (*Clarias*). **Trans. Zool. Soc. Lond.**, v. 35, p. 1-45, 1979.
- BURLESON, M.L. **Oxygen-sensitive chemoreceptors and cardiovascular and ventilatory control in rainbow trout**. 1991. 153f. Thesis (PhD on Philosophy) – Department of Zoology, University of British Columbia, Vancouver, Canada, 1991.
- BURLESON, M.L.; MILSOM, W.K. Propranolol inhibits O₂-sensitive chemoreceptor activity in trout gills. **Amer. Physiol. Soc.**, v. 258, n. 4, p. 1089-1091, 1990.
- BURLESON, M.L.; SMATRESK, N.J. Effects of sectioning cranial nerves IX and X on cardiovascular and ventilatory reflex responses to hypoxia and NaCN in channel catfish. **J. Exp. Biol.**, v. 154, p. 407-420, 1990a.
- BURLESON, M.L.; SMATRESK, N.J. Evidence for two oxygen-sensitive chemoreceptor loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Physiol. Zool.**, v. 63, p. 208-221, 1990b.

- BURLESON, M.L.; MILSOM, W.K. Propranolol inhibits oxygen sensitive chemoreceptor activity in trout gills. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 1089-1091, 1990.
- BURLESON, M.L.; MILSOM, W.K. Sensory receptors in the 1st gill arch of rainbow-trout. **Resp. Physiol.**, v. 93, p. 97-110, 1993.
- BURLESON, M. L.;MILSOM, W. K. Cardio-ventilatory control in rainbow trout: I. Pharmacology of branchial, oxygen-sensitive chemoreceptors. **Resp. Physiol.**, v. 100, p. 231-238, 1995.
- BURLESON, M.L.; SMATRESK, N.J.; MILSOM, W.K. Afferent inputs associated with cardioventilatory control in fish. *In*: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARREL, A.P. **Fish Physiology**. Vol. XII, San Diego, Academic Press Inc., 1992, p. 389-426.
- BURLESON, M. L.; MERCER, S. E.; WILK-BLASZCZAK, M. A. Isolation and characterization of putative O₂ chemoreceptor cells from the gills of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Brain. Res.**, v. 1092, p. 100-107, 2006.
- BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W. Response of the dogfish (*Scyliorhinus caniculata* L.) to slowly induced and rapidly induced hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.39, p. 307-323,1971.
- BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W.; SHORT, S. The effect of sectioning cranial nerves V, VII, IX and X on the cardiac response of the dogfish *Scyliorhinus canicula* to environmental hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 69, p. 233-245, 1977.
- CAMERON, J. S. Autonomic nervous tone and regulation of heart rate in the goldfish, *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 63, p. 341-349, 1979.
- CAMERON, J. N.; WOHLSCHLAG, D. E. Respiratory response to experimentally induced anaemia in the pinfish (*Lagodon rhomboides*). **J. Exp. Biol.**, v. 50, p. 307-317, 1969.
- CAMERON, J. N.; DAVIES, J. C. Gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with varying blood oxygen capacity. **J. Fish Res. Board Can.**, v. 27, p. 1069-1085, 1970.
- CAMERON, J. S.; BROWN, S. E. Adrenergic and cholinergic responses of the isolated heart in the goldfish *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 70, p. 109-116, 1981.
- CAMPBELL, H. A.; EGGINTON, S. The vagus nerve mediates cardio-respiratory coupling that changes with metabolic demand in a temperate nototheniid fish. **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 2472-2480, 2007.
- CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; EGGINTON, S. The use of power spectral analysis to determine cardio-respiratory control in the shorthorned sculpin *Myoxocephalus scorpius*. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 1969-1976, 2004.
- CASTELLINI, M. A.; DAVIS, R. W.; KOOYMAN, G. L. Blood chemistry regulation during repetitive diving in Weddell Seals. **Physiol. Zool.**, v. 61, p. 379-386,1988.

- CASTELLINI, M. A.; KOOYMAN, G. L.; PONGANIS, P. J. Metabolic rates of freely diving Weddell seals: correlation with oxygen stores, swim velocity, and diving duration. **J. Exp. Biol.**, v. 165, p. 181-194, 1992.
- CAVACO, J.E.B. Sex steroids and spermatogenesis in the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Arch. Androl.**, v. 51, p. 99-107, 2005.
- CHAPMAN, L. J.; MCKENZIE, D. J. Behavioral Responses and Ecological Consequences. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Fish Physiology: Hypoxia**, Vol. 27, London, UK. Academic Press, 2009, p. 25-77.
- CLENCH, J.; FERREL, R. E.; SCHULL, W. J. Effect of chronic altitude hypoxia on hematologic and glycolytic parameters. **Am. J. Physiol.**, v. 242, p. R447-R451, 1982.
- COBB, J.; SANTER, R. Electrophysiology of cardiac function in teleosts: Cholinergically mediated inhibition and rebound excitation. **J. Physiol.**, v. 230, p. 561-573, 1973.
- COOLIDGE, E.H.; CIUHANDU, C.S.; MILSOM, W.K. A comparative analysis of putative oxygen-sensing cells in the fish gill. **J. Exp. Biol.**, v. 211, n. 8, p. 1231-1242, 2008.
- COSTA, O.T.F.; PEDRETTI, A.C.E.; SCHMITZ, A.; PERRY, S.F.; FERNANDES, M.N. Stereological estimation of the surface area and barrier thickness of the fish gills in vertical sections. **J. Microsc.**, v. 255, p. 1-9, 2007.
- COURTENAY, W.R.Jr. Florida's walking catfish. **Ward's Bulletin**, v. 10, n. 69, 1970.
- COURTENAY, W.R.JR.; SAHLMAN; H.F.; MILEY, W.W.II, HERREMA, D.J. Exotic fish in fresh and brackish waters of Florida. **Biol. Conserv.**, v. 6, p. 292-302, 1974.
- COURTENAY, W.R.; STAUFFER, J.R. **Distribution, Biology and Management of Exotic Fishes**. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 1984, p. 431.
- CRUZ, A. L. **O comportamento respiratório e a cascata de O₂ no cascudo de respiração bimodal *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei, Loricariidae)**. 2007. 161 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- CUTZ, E.; JACKSON, A. Neuroepithelial bodies as airway oxygen sensors. **Respir. Physiol.**, v. 115, p. 201-214,, 1999.
- DADEBO, E. Reproductive biology and feeding habits of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) (Pisces: Clariidae) in Lake Awassa, Ethiopia. **Ethiop. J. Sci.**, v. 23, p. 231-246, 2000.
- DAVIS, J. C. Circulatory and ventilatory responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to artificial manipulation of gill surface area. **J. Fish Res. Bd. Can.**, v. 28, p. 1609-1614, 1971.
- DAVIE, P.S.; FARRELL, A.P. The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. **Can. J. Zool.**, v. 2, p. 158-164, 1991.

- DAXBOECK, C.; HOLETON, G.F. (1978). Oxygen receptors in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 1254-1259, 1978.
- DEJOURS, P. **Respiration**. New York, Oxford University Press, 1966, pp. 244.
- DEJOURS, P. **Respiration in water and air: Adaptations, Regulation, Evolution**. Elsevier, Amsterdam, 1988, pp. 1-179.
- DONALD, J.; CAMPBELL, G. A comparative study of the adrenergic innervations of the teleost heart. **J. Comp. Physiol.**, v. 147, p. 85-91, 1982.
- DUNEL-ERB, S.; BAILLY, Y.; LAURENT, P. Neuroepithelial cells in fish gill primary lamellae. **J. Appl. Physiol.**, v. 53, p. 1342-1353, 1982.
- DUTHIE, G.G.; HUGHES, G.M. The effects of reduced gill area and hyperoxia on the oxygen-consumption and swimming speed of rainbow-trout. **J. Exp. Biol.**, v. 127, p. 349-354, 1987.
- ENYIDI, U.; KILJUNEN, M.; JONES, R. I.; PIRHONEN, J.; VIELMA, J. Nutrient assimilation by first-feeding African catfish, *Clarias gariepinus*, assessed using stable isotope analysis. **J. World Aquacult. Soc.**, v. 44, p. 161-172, 2013.
- EVANS, A. M.; MUSTARD, K. J.; WYATT, C. N.; PEERS, C.; DIPP, M.; KUMAR, P.; KINNEAR, N. P.; HARDIE, D. G. Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells? **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 41504-41511, 2005.
- FAO. FAO database on Introduced Aquatic Species. FAO Database on Introduced Aquatic Species, FAO, Rome, 1997.
- FARBER, J.; RAHN, H. Gas exchange between air and water and the ventilation pattern in the electric eel. **Resp Physiol.**, v. 9, p. 151-161, 1970.
- FARREL, A. P. Cardiovascular events associated with air-breathing in two teleosts, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Arapaima gigas*. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 953-958, 1978.
- FARREL, A. P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 523-536, 1984.
- FARRELL, A. P. From hagfish to tuna: a perspective on cardiac function. **Physiol. Zool.**, v. 64, p. 1137-1164, 1991.
- FARREL, A. P.; JONES, D. R. The heart. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARREL, A. P. **Fish Physiology: The cardiovascular system**, Vol. XII, PartA. San Diego, C. A.: Academic Press, Inc., 1992, p. 1-88.
- FELDMAN, J. L.; SMITH, J. C.; ELLENBERGER, H. H.; CONNELLY, C. A.; LUI, G. S.; GREER, J. G.; LINDSAY, A. D.; OTOO, M. R. Neurogenesis of respiratory rhythm and pattern: emerging concepts. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 879-886, 1990.

- FELGER, R. S.; CLIFTON, K.; REGAL, P. J. Winter dormancy in sea turtles: independent discovery and exploitation in the Gulf of California by two local cultures. **Sci.**, v. 191, p. 283, 1976.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish Biol.**, v. 35, p. 509-519, 1989.
- FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. MORON, S. E. Comparative study of Gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. **Can. J. Zool.**, v. 72, p. 160-165, 1994.
- FERRI, M. Bagre-africano ameaça espécies nativas. **Diário da Região**, São José do Rio Preto, 25 abril 2004. Disponível em < www.diarioweb.terra.com.br>. Acesso em: 06 ago. 2004.
- FLORINDO, L.H. **O papel dos quimiorreceptores de O₂, CO₂/pH no controle dos reflexos cárdio-respiratórios e da respiração na superfície aquática (ASR) em tambaqui, *Colossoma macropomum*: Respostas a longo prazo durante a hipóxia e hipercarbia.** 2002. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 2002.
- FLORINDO, L.H.; REID, S. G.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K., RANTIN, F. T. Cardiorespiratory reflexes and aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): acute responses to hypercarbia. **J. Comp. Physiol.**, v. 174, p. 319-328, 2004.
- FLORINDO, L.H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; REID, S. G.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. 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.**, v. 209, p. 1709-1715, 2006.
- FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 42, p. 63-70, 1993.
- FRITSCHÉ, R.; NILSSON, S. Cardiovascular responses to hypoxia in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. **J. Exp. Biol.**, v. 48, p. 153-160, 1989.
- FRITSCHÉ, R.; NILSSON, S. Autonomic nervous control of blood pressure and heart rate during hypoxia in the cod, *Gadus morhua*. **J. Comp. Physiol.**, v. 160, p. 287-292, 1990.
- FRITSCHÉ, R.; NILSSON, S. Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. In: RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B. **Fish Ecophysiology**. London, New York, USA. Academic Press, 1993, p. 180-206.
- FRITSCHÉ, R.; AXELSSON, M.; FRANKLIN, C. E.; GRIGG, G. G.; HOLMGRENS, S.; NILSSON, S. Respiratory and cardiovascular-responses to hypoxia in the Australian lungfish. **Resp. Physiol.**, v. 94, p. 173-187, 1993.

- GAMPERL, A. K.; SHIELDS, H. A. Cardiovascular system. In: EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B.; CURRIE, S. **The physiology of fishes, 4th Edition**. Danvers, MA, CCR Press, 2014, p. 34-79.
- GAREY, W. F.; RAHN, H. Normal arterial gas tensions and pH and the breathing frequency of electrical eel. **Resp. Physiol.**, v. 9, p. 141-150, 1970.
- GANNON, B. J.; BURNSTOCK, G. Excitatory adrenergic innervations of the fish heart. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 29, p. 765-773, 1969.
- GAUTIER, H. Interactions among metabolic rate, hypoxia, and control of breathing. **J. Appl. Physiol.**, v. 81, p. 521-527, 1996.
- GEE, J.H. Buoyancy control of four species of eletrid fishes during aquatic surface respiration. **Environ. Biol. Fishes**, v. 14, p. 269-278, 1986.
- GIBBINS, I. Comparative anatomy and evolution of the autonomic nervous system. In: NILSSON, S.; Holmgren, S. **Comparative Physiology and Evolution of the Autonomic Nervous System**. Chur, Switzerland, Howard, 1994, p. 1-68.
- GILMOUR, K.M. The CO₂/pH ventilatory drive in fish. **Comp. Bioch. Physiol.**, v. 130, p. 219-240, 2001.
- GLASS, M.L. Ventilatory responses to hypoxia in ectothermic vertebrates. In: WOOD, S. C.; WEBER, R. E.; HARGENS, A. R.; MALLARD, R. W. **Physiological adaptation in vertebrate respiration, circulation and metabolism**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp. 97-118.
- GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. Gas exchange and control of respiration in air-breathing teleost fish. In: GLASS, M.L.; WOOD, S.C. **Cardio-Respiratory Control in Vertebrates**. Heidelberg, Springer-Verlag, 2009, p. 99-119.
- GLASS M.L.; RANTIN, F. T.; VERZOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N.; KALININ, A. L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp, *Cyprinus carpio*. L. **J. Fish. Biol.**, v. 39, p. 142-149, 1991.
- GNAIGER, E. Efficiency and power strategies under hypoxia. Is low efficiency at high glycolytic ATP production a paradox? In: HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L.; SICK, T.; ROSENTHAL, M.; van den THILLART, G. (Eds.). **Surviving Hypoxia: Mechanisms of control and adaptation**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2000, pp. 77-109.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Tradução de Carla de Melo Vorsatz, Rio de Janeiro, 2005, p. 1450 e 1522.
- GONZÁLES, C.; ALMARAZ, L.; OBESO, A.; RIGUAL, R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 829-898, 1994.
- GRAHAM, J. B. The transition to air breathing in fishes. II. Effects of hypoxia acclimation on the bimodal gas exchange of *Ancistrus chagresi* (Loricariidae). **J. Exp. Biol.**, v. 102, p. 157-173, 1983.

- GRAHAM, J. B. Seasonal and environmental effects on the blood hemoglobin concentrations of some Panamanian air-breathing fishes. **Environ. Biol. Fishes**, v. 12, p. 291-301, 1985.
- GRAHAM, J. B. Cardiorespiratory control. In: GRAHAM, J. B. **Air-breathing Fishes: evolution, diversity and adaptation**. San Diego, California, Academic Press, 1997, pp. 183-202.
- GRAHAM, J. B.; KRAMER, D. L.; PINEDA, E. Respiration of the air breathing fish *Piabucina festae*. **J. Comp. Physiol.**, v. 122, p. 295-310, 1977.
- GRAHAM, J. B.; BAIRD, T. A. The transition to air breathing fishes I. Environmental effects of the facultative air breathing of *Ancistrus chagresi* and *Hypostomus pecostomus* (Loricariidae). **J. Exp. Biol.**, v. 96, p. 53-67, 1982.
- GRAHAM, J. B.; BAIRD, T. A. The transition to air breathing in fishes. III. Effects of body size and aquatic hypoxia on the aerial gas exchange of the swamp eel *Symbranchus marmoratus*. **J. Exp. Biol.**, v. 108, p. 357-375, 1984.
- GRAHAM, J. B.; CHILLER, L. D.; ROBERTS, J. L. The transition to air breathing in fishes. V. Comparative aspects of cardiorespiratory regulation in *Symbranchus marmoratus* and *Monopterus albus* (Synbranchidae). **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 455-467, 1995.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Excitação rítmica do coração. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 11ª Edição. Tradução de Barbara de Alencar Martins et al. Elsevier Editora Ltda, 2006, p. 116-121.
- HEATH, D.; WILLIAMS, D. R. **Man at high altitude. The pathophysiology of acclimatization and adaptation**. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981, pp. 347.
- HESSE, R. **Ecological animal geography**. Transl. Allee WC, Schmidt K.P., 3rd edn. Wiley & Sons, New York, pp. 597, 1947.
- HICKLEY, P.; BAILEY, R. G. Food and feeding relationships of fish in the Sudd swamps (River Nile, southern Sudan). **J. Fish Biol.**, v. 30, p. 147-159, 1987.
- HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C. Oxygen consumption during aerial activity in aquatic and amphibious fish. **Copeia**, v. 1, p. 232-234, 1987.
- HOCHACHKA, P. W. **Living without oxygen**. Closed and open systems in hypoxia tolerance. Harvard University, Cambridge, 1980, p. 181.
- HOLETON, G. F. Oxygen uptake and transport by the rainbow trout during exposure to carbon monoxide. **J. Exp. Biol.**, v. 54, p. 239-254, 1971.
- HOLENTON, G. F. Oxygen as an environmental factor of fishes. In: ALI, M.A. **Environmental Biology of Fishes**. Plenum, New York, 1980, p. 7-32.
- HOLMGREN, S. Regulation of the heart of a teleost, *Gadus morhua*, by autonomic nerves and circulating catecholamines. **Acta Physiol. Scand.**, v. 99, p. 62-74, 1977.

- HUGHES, G. M. Respiratory responses to hypoxia in fish. **Amer. Zool.**, v. 13, p. 475–489, 1973.
- HUGHES, B., SHELTON, G. Respiratory mechanisms and their nervous control in fish. **Adv. Comp. Physiol. Bioch.**, v.1, p. 275-364, 1962.
- HUGHES, G. M.; SINGH, B. H. Respiration in an air breathing fish, the climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch). I- Oxygen uptake and carbon dioxide release into air and water. **J. Exp. Biol.**, v. 53, p. 265-280, 1970.
- HUGHES, G. M.; SINGH, B. H. Gas exchange with air and water in an air-breathing catfish, *Saccobranchus (Heteropneustes) fossilis*. **J. Comp. Biol.**, v. 55, p. 667–682, 1971.
- HUTCHISON, V. H.; HAINES, H. B.; ENGBRETSON, G. Aquatic life at high altitude: respiratory adaptations in the lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. **Respir. Physiol.**, v. 27, p. 115-129, 1976.
- JACKSON, D. C. Acid-base balance during hypoxia hypometabolism: Selected vertebrate strategies. **Resp. Physiol. Neurobiol.**, v. 141, p. 273-283, 2004.
- JOHANSEN, K. Air breathing in the teleost *Symbranchus marmoratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 18:383–395, 1966.
- JOHANSEN, K. Air breathing in fishes. In: HOARD, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology**, vol. IV., Academic Press, New York, 1970, p. 361-411.
- JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; SCHMIDT, K.; PETERSEN, J. A. Gas exchange and control of breathing in electric eel *Electrophorus electricus*. **Z. Verg. Physiol.**, v. 61, p. 137–163, 1968.
- JOHANSEN, K.; HANSON, D.; LENFANT, C. Respiration in a primitive air breather, *Amia calva*. **Resp. Physiol.**, v 9, p. 162-174, 1970.
- JONES, D. R. Ontogeny and phylogeny of the oxygen response. **Proc. Physiol. Soc. NZ.**, v. 3, p. 79-81, 1983.
- JONES, D. R.; EVANS, B. K.; GABBOT, G. R. J.; BALDWIN, J.; GRIMSEY, D. P. Diving behavior and heart rate in the platypus. **Physiologist.**, v. 30, p. 54-55.
- JONZ, M. G.; NURSE, C. A. Neuroepithelial cells and associated innervation of the zebrafish gill: A confocal immunofluorescence study. **J. Comp. Neurol.**, v. 461, n. 1, p. 1-17, 2003.
- JORDAN, J. The influence of body weight on gas exchange in the air-breathing fish, *Clarias batrachus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 53, p. 305–310, 1976.
- JORDAN, D.; SPYER, K. M. Central mechanisms mediating respiratory-cardiovascular interactions. In: TAYLOR, E. W. **Neurobiology of the Cardiorespiratory System**. Manchester, Manchester University Press, 1987, p. 322-341.
- JULIO, A. E.; DESFORGES, P.; PERRY, S. F. Apparent diffusion limitations for carbon dioxide excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are relieved by

- intravascular injections of carbonic anhydrase. **Respir. Physiol.**, v. 121, p. 53-64, 2000.
- KALININ, A. L.; GLASS, M. L.; RANTIN, F. T. A Comparison of directly measured and estimated gill ventilation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 122, p. 207-211, 1999.
- KLAASSEN, C. D. Tóxicos ambientais não-metálicos: poluentes do ar, solventes e pesticidas. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. Tradução de Carla de Melo Vorsatz, Rio de Janeiro, 2001, p. 1409-1428.
- KOFORD, C. B. The vicuña and the puna. **Ecol. Monogr.**, v. 26, p. 153-219, 1956.
- KONAS, E.; GENÇ, E.; KAYA, C.; EROL, C. Occurrence of *Trypanosoma sp* in wild African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in the River Asi (north-eastern Mediterranean), Turkey. **Turk. J. Zool.**, 34:271-273, 2010.
- KRAMER, D. L. Dissolved oxygen and fish behavior. **Environ. Biol. Fish.**, v. 18, n. 2, p. 81-92, 1987.
- KRAMER, D. L.; GRAHAM, J. B. Synchronous air breathing, a social component of respiration in fishes. **Copeia**, v. 4, p.689-696, 1976.
- KRAMER, D.L.; LINDSEY, C. C.; MOODIE, G. E. E.; STEVES, E. D. The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 717-729, 1978.
- KRAMER, D., MANLEY, D.; BOURGEOIS, R. The effect of respiratory mode and oxygen concentration on the risk of aerial predation in fishes. **Can. J. Fish. Aquatic Sci.**, v. 61, p. 653-665, 1983.
- LACHNER, E. A.; ROBINS, C. R.; COURTENAY JR, W. R. Exotic fishes and other aquatic organisms introduced into North America. **Smithsonian Contrib. Zool.**, v. 59, p. 1-29, 1970.
- LAHIRI, S.; SZIDON, J. P.; FISHMAN, A. P. Potential respiratory and circulatory adjustments to hypoxia in the African lungfish. **Fed. Proc.**, v 29, p. 1141-1148, 1970.
- LAURENT, P.; ROUZEAU, J. D. Afferent neural activity from pseudobranch of teleosts. Effects of PO_2 , pH, osmotic pressure and Na^+ ions. **Resp. Physiol.**, v. 14, p. 307-331, 1972.
- Le BEOUF, B. J.; COSTA, D. P. HUNTLEY, A. C.; FELDCAMP, S. D. Continuous deep diving by northern elephant seals. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 446, 1989.
- LEITE, C. A. C.; FLORINDO L. H.; KALININ A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN F. T. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Comp. Physiol.**, v. 193, p. 1001-1011, 2007.
- LEITE, C. A. C.; TAYLOR, E. W.; GUERRA, C. D. R.; FLORINDO, L. H.; BELÃO, T.; RANTIN, F. T. The role of the vagus nerve in the generation of cardiorespiratory

- interactions in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Comp. Physiol.**, v. 195, p. 721-731, 2009.
- LENFANT, C.; TORRANCE, J. ENGLISH, E.; FINCH, C. A.; REYNAFARJE, C.; RAMOS, J.; FAURA, J. Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. **J. Clin. Invest.**, v. 47, p. 252-2656, 1968.
- LIEM, K. F. Respiratory gas bladders in teleosts: functional conservatism and morphological diversity. **Am. Zool.**, v. 29, p. 333-352, 1989.
- LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. Control of breathing in *Amphipnous cuchia*, an amphibious fish. **Resp. Physiol.**, v. 21, p. 325-340, 1974.
- LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp. How it affects O₂ uptake, ventilation and O₂ extraction from the water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38-4, 1979.
- LOPES, J. M.; BOIJINK, C. L.; FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Hypoxic cardiorespiratory reflex in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): role of branchial O₂ chemoreceptors. **J. Comp. Physiol.**, v. 180, p. 797-811, 2010.
- LÓPEZ-BARNEO, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, J. R.; UREÑA, J.; GONZÁLEZ, C. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. **Science**, v. 241, p. 580-582, 1988.
- LÓPEZ-BARNEO, J.; PARDAL, R.; ORTEGA-SÁENZ, P. Cellular mechanisms of oxygen sensing. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 63, p. 259-287, 2001.
- LUTCAVAGE, M. E.; BUSHNELL, P. G.; JONES, D. R. Oxygen stores and aerobic metabolism in the leatherback sea turtle. **Can. J. Zool.**, v. 70, p. 348-351, 1992.
- MAGALHÃES, J.; DUARTE, J.; ASCENSÃO, A.; OLIVEIRA, J.; SOARES, J. O desafio da altitude. Uma perspectiva fisiológica. **Rev. Port. Cienc. Desp.**, v. 2, p. 81-91, 2002.
- MALAN, A. pH and metabolic depression in mammalian hibernation. The example of brown adipose tissue. ”. In: HOCHACHKA, PW. **Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation**. CRC Press, Boca Raton, 2000, p. 201-214.
- MARIMUTHU, K.; MUTHU, N. XAVIER, R.; AROCKIARAJ, J.; RAHMAN, M. A.; SUBRAMANIAM, S. Toxicity of buprofezin on the survival of embryo and larvae of African catfish, *Clarias gariepinus* (Bloch). **PLoS One**, v. 8, 2013.
- MARTINS, N. D.; COLVARA, W.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, 84:154-159, 2011.
- MATTIAS, A. T.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regain* (Loricariidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120, p. 311-315, 1998.

- MAUGUIT, Q.; VANDEWALLE, P. Ontogeny of swimming movements in relation to the skeletal system development in *Clarias gariepinus*. **J. Morph.**, v. 268, p. 1105-1105, 2007.
- McCRIMMOM, D. R.; ZUPERKU, E. J.; HAYASHI, F. Modulation of the synaptic drive to respiratory premotor and motor neurons. **Resp. Physiol.**, v. 110, p. 161-176, 1997.
- McDONALD, D.M.; GILMOUR, K. M.; WALSH, P. J.; PERRY, S. F. Cardiorespiratory reflexes of the gulf toadfish, *Opsanus beta* during acute hypoxia. **Resp. Physiol Neurobiol.**, v. 170, p. 59-66, 2010.
- McKENZIE, D. J.; BURLESON, M. L.; RANDALL, D. J. The effects of branchial denervation and pseudobranch ablation on cardio-ventilatory control on an air-breathing fish. **J. Exp. Biol.**, v. 161, p. 347-365, 1991a.
- McKENZIE, D. J.; AOTA, S.; RANDALL, D. J. Ventilatory and cardiovascular responses to blood pH, plasma PCO_2 , blood O_2 content and catecholamines in an air-breathing fish, *Amia calva*. **Physiol. Zool.**, v. 64, p. 432-450, 1991b.
- McKENZIE, D. J.; TAYLOR, E. W.; BRONZI, P.; BOLIS, C. L. Aspects of cardioventilatory control in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). **Resp. Physiol.**, v. 100, p. 45-53, 1995.
- McKENZIE, D. J.; CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; MICHELI, M. A.; RANTIN, F. T.; ABE, A. S. The autonomic control and functional significance of the changes in heart rate associated with air breathing in the jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 4224-4232, 2007.
- McMAHON, B. R.; BURGGREN, W. W. Respiratory physiology of intestinal air-breathing in the teleost fish *Misgurnus anguillicaudatus*. **J. Exp. Biol.**, v. 133, p. 371-393, 1987.
- MICHELI-CAMPBELL, M. A.; CAMPBELL H. A.; KALININ A. L.; RANTIN F. T. The relationship between O_2 chemoreceptors, cardio-respiratory reflex and hypoxia tolerance in the neotropical fish *Hoplias lacerdae*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 154, p. 224-232, 2009.
- MILI, P. S. M.; TEIXEIRA, R. L. Notas ecológicas do bagre-africano, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Teleostei, Clariidae) de um córrego do Sudeste do Brasil. **Bull. Mus. Biol. Mello Leitão**, v. 19, p. 45-51., 2006.
- MILSOM, W. K. Control of breathing in fish: Role of chemoreceptors. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. **Physiology and Biochemistry of the Amazon**. Manaus: INPA. 1997, p. 359-377.
- MILSOM, W. K.; REID, S. G.; RANTIN, F. T.; SUNDIN, L. Extrabranquial chemoreceptors involved in respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 1765-1774, 2002.
- MILSOM, W. K. New insights into gill chemoreception: Receptor distribution and roles in water and air breathing fish. **Resp. Physiol. Neurobiol.**, v. 184, p. 326-339, 2012.

- MILSOM, W. K.; BRILL, R. W. Oxygen sensitive afferent information arising from the 1st gill arch of yellowfin tuna. **Resp. Physiol.**, v. 66, p. 193-203, 1986.
- MILSOM, W. K.; SUNDIN, L.; REID, S.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Chemoreceptor control of cardiovascular reflexes. In: VAL, AL. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Biology of tropical fishes**. Manaus, INPA, 1999, p. 363-374.
- MOUSSA, T. A. Morphology of the accessory air-breathing organs of the teleost *Clarias lazera* (C and V). **J. Morph.**, v. 98, p. 125-160, 1956.
- MOUSSA, T. A. Physiology of the accessory respiratory organs of the teleost, *Clarias lazera* (C and V). **J. Exp. Zool.**, v. 136, p. 419-454, 1957.
- MILLIGAN, E.; LAHIRI, S. Dependence of carotid chemoreceptors stimulation by metabolic agents on PaO₂ and PaCO₂. **J. Appl. Physiol.**, v. 50, p. 884-891, 1981.
- MUKAI, Y.; SANUDIN, N.; FIRDAUS, R. F.; SAAD, S. Reduced cannibalistic behavior of African catfish, *Clarias gariepinus*, larvae under dark and dim conditions. **Zool. Sc.**, v. 30, p. 421-424, 2013.
- MUNRO, J. L. The food of a community of East African freshwater fishes. **J. Zool.**, v. 151, p. 389-415, 1967.
- MUNSHI, J.S.D. The accessory respiratory organs of *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Morph.**, v. 109, p. 115-139, 1962.
- MUNSHI, J. S. D. Gross and fine structure of respiratory organs of air-breathing fishes. In: HUGHES, G. M. **Respiration of Amphibious Vertebrates**. Academic Press, London, 1976, p. 73-104.
- NA-NAKORN, U.; KAMONRAT, W.; NGAMSIRI, T. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*. **Aquacult.**, v. 240, p. 145-163, 2004.
- NAKATANI, K.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001, p. 378.
- NAPIER, J. **Bigfoot. The Yeti and Sasquatch in myth and reality**. Cape, London, pp. 240, 1972.
- NDIMELE, P. E.; OWODEINDE, F. G. Comparative reproductive and growth performance of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its hybrid induced with synthetic hormone and pituitary gland of *Clarias gariepinus*. **Turk. J. Fish. Aquat. Sc.**, v. 12, p. 619-626, 2012.
- NILSSON, S. **Autonomic nerve function in the vertebrates**. Berlin, Heidelberg, Germany; New York, Springer-Verlag, 1983.
- NILSSON, S. Evidence of adrenergic nervous control of blood pressure in teleost fish. **Physiol. Zool.**, v. 67, p. 1347-1359, 1994.

- OLIVEIRA, R. D.; LOPES, J. M.; SANCHES, J. R.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L. RANTIN, F. T. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 139, p. 479-485, 2004.
- OLURIN, K. B.; OLUWO, A. B. Growth and Survival of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Larvae Fed Decapsulated Artemia, Live Daphnia, or Commercial Starter Diet. **Isr. J. Aquacult-Bamid.**, v. 62, p. 50-55, 2010.
- OSUIGWE, D. I.; ERONDU, E. S. Reproductive biology of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in the River Ezu (southeastern Nigeria). **Acta Hydrobiol.**, v. 39, 53-60, 1997.
- PANTASIS, P. A.; NEOFITOU, C. N. Digestibility of nutrients and energy in diets for the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). **Isr. J. Aquacult-Bamid.**, v. 56, p. 176-187, 2004.
- PAWSON, I. G.; JEST, C. The high-altitude areas of the world and their cultures. In: BAKER (Ed.) **The biology of high altitude peoples**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1978, p. 17-45.
- PEARSON, O. P. Mammals in the highlands of Southern Peru. **Bull. Mus. Comp. Zool.**, v. 106, p. 117-173, 1951.
- PERNA, S. A.; FERNANDES; M. N. Internal morphology of the gill of a loricariid fish, *Hypostomus plecostomus*: Arterio-arterial vasculature and muscle organization. **Can. J. Zool. Rev. Can. Zool.**, v. 73, p. 2259-2265, 1995.
- PERNA, S. A.; FERNANDES, M. N. Gill morphometry of the facultative air-breathing loricariid fish, *Hypostomus plecostomus* (Walbaum) with special emphasis on aquatic respiration. **Fish. Physiol. Biochem.**, v. 15, p. 213-220, 1996.
- PERRY, S. F., WOOD, C. M. Control and coordination of gas transfer in fishes. **Can. J. Zool.**, v. 67, p. 2961-2970, 1989.
- PERRY, S. F.; REID S. G. Cardiorespiratory adjustments during hypercarbia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are initiated by external CO₂ receptors on the first gill arch. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 3357-3365, 2002.
- PERRY, S. J.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B. **Fish Ecophysiology**. London: Chapman & Hall, 1993, p. 231-264.
- PERRY, S. F.; REID, S. G.; GILMOUR, K. M.; BOIJINK, C. L.; LOPES, J. M.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. A comparison of adrenergic stress responses in three tropical teleosts exposed to acute hypoxia. **Am. J. Physiol.**, v. 287, p. 188-197, 2004.
- PERRY, S. F., JONZ, M. G., GILMOUR, K. M. Oxygen sensing and the hypoxic ventilator response. In: RICHARDS, J. G., BRAUNER, C. J., FARRELL, A. P. **Hypoxia**. Academic Press, Amsterdam, 2009a, p. 193-251.

- PERRY, S. F.; VULESEVIC, B., BRAUN, M., GILMOUR, K. M. Ventilation in Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*) during exposure to acute hypoxia or hypercapnia. **Resp. Physiol. Neurobiol.**, v. 167, p. 227-234, 2009b.
- PETERSEN, L. H., GAMPERL, A. K. Effect of acute and chronic hypoxia on the swimming performance, metabolic capacity and cardiac function of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **J. Exp. Biol.**, v. 213, p. 808–819, 2010.
- PETSCHOW, D.; WURDINGER, I.; BAUMANN, R.; DUHM, J.; BRAUNITZER, G.; BAUER, C. Causes of high blood O₂ affinity of animals living at high altitude. **J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Ex. Physiol.**, v. 42, p. 139-143, 1977.
- PIENAR, U. **The freshwater fishes of the Kruger National Park.** Republic of South Africa, The National Parks board of trustees of the Republic of South Africa.
- POWER, E. B.; CLARK, R. T. Control of normal breathing in fishes by receptors located in the regions of the gills and innervated by the IXth and Xth cranial nerves. **Am. J. Physiol.**, v. 138, p. 104-107, 1942.
- PULELLA, S. V. S. **Aquaculture of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and a comparison of its quality: microbiological, sensory and proximate composition.** 1997. 191 f. Dissertação (Mestrado em "Food Science and Tecnology") - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia – USA. 1997.
- QVIST, J. R.; HILL, D.; SCHNEIDER, R. C.; FALKE, K. J.; LIGGINS, G. C.; GUPPY, M.; ELLIOT, R. L.; HOCHACHKA, P. W.; ZAPOL, W. M. Hemoglobin concentrations and blood gas tensions of free-diving Weddell seals. **J. Appl. Physiol.**, v. 64, p. 1560-1569, 1986.
- RAHN, H.; OTIS, A. B. Man's respiratory response during and after acclimatization to high altitude. **Am. J. Physiol.**, v. 157, p. 445-462, 1949.
- RANDALL, D. J. The nervous control of cardiac activity in the tench (*Tinca tinca*) and the goldfish (*Carassius auratus*). **Physiol. Zool.**, v. 39, p. 185–192, 1966.
- RANDALL, D. J. Functional morphology of the heart in fishes. **Am. Zool.**, v. 8, p. 179–189, 1968.
- RANDALL, D. J. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 275-288, 1982.
- RANDALL, D. J.; SMITH, J. C. The regulation of cardiac activity in fish in a hypoxic environment. **J. Exp. Biol.**, v. 40, p. 104-113, 1967.
- RANDALL, D. J.; STEPHENS, E. D. The role of adrenergic receptors in cardiovascular changes associated with exercise in salmon. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 21, p. 415–424, 1967.
- RANDALL, D. J.; JONES, D. R. The effects of deafferentation of the pseudobranch on the respiratory response to hypoxia and hyperoxia in the trout (*Salmo gairdneri*). **Resp. Physiol.**, v. 17, p. 291-302, 1973.

- RANDALL, D. J.; BUEGGREN, W.; FRENCH, K. Gas exchange and acid-base balance. In: RANDALL, D. J.; BUEGGREN, W.; FRENCH, K. **Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. New York: W.H. Freeman and Co., 1997, p.517-570.
- RANDLE, A. M.; CHAPMAN, L. J. Air-breathing behavior of the African anabantoid fish *Ctenopoma muriei*. **J. Fish Biol.**, v. 67, p. 292-298, 2005.
- RANTIN, F. T., JOHANSEN, K. Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. **Env. Biol. Fish.**, v. 11, p. 221-228, 1984.
- RANTIN, F. T.; MARINS, M. A. Como os teleósteos respondem à hipóxia ambiental - Uma revisão. **An. Simp. Bras. Aquicult.**, v. 3, p. 673-692, 1984.
- RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardio-respiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In: VAL, A. L.; ALMEIDA VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. INPA, Manaus, 1996, p. 169-180.
- RANTIN, F. T.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L.; FERNANDES, M. N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish Biol.**, v. 41, p. 805-812, 1992.
- RANTIN, F. T.; ; GLASS, M. L.; KALININ, A. L.; VERZOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Env. Biol. Fish.**, v. 36, p. 93-97, 1993.
- RANTIN, F. T.; GUERRA, C. D. R.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119, p. 991-997, 1998.
- REID, S. G.; PERRY, S. F. Peripheral O₂ chemoreceptors mediate humoral catecholamine secretion from fish chromaffin cells. **Am. J. Physiol.**, v. 284, p 990-999, 2003.
- RICHTER, G. O. **Pesca e Aquicultura. Relatório técnico da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/cultura2.pdf>>. Acesso em: mar. 2014.
- RICKLEFS, R. E. Ecosistemas. In: RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993, p. 83-133.
- ROBERTS, J. L.; GRAHAM, J. B. Adjustments of cardiac rate to changes in respiratory gases by a bimodal breathear, the Panamanian swamp eel, *Synbranchus marmoratus*. **Am. Zool.**, v. 25, p. 25-51, 1985
- SANCHEZ, A.; SONCINI, R.; WANG, T.; KOLDKJAER, P.; TAYLOR, E. W.; GLASS, M. L. The differential cardiorespiratory responses to ambient hypoxia and systemic hypoxaemia in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comp. Bioch. Physiol.**, v. 130, p. 677-687, 2001.

- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Adrenergic control of venous capacitance during moderate hypoxia in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): role of neural and circulating catecholamines. **Am. J. Physiol.**, v. 291, p. 711–718, 2006.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Autonomic control of circulation in fish: A comparative view. **Auton. Neurosci: Basic Clin.**, v. 165, p. 127-139, 2011.
- SANTER, R. M. Morphology and innervations of the fish heart. **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.**, v. 89, p. 1-102, 1985.
- SAUNDERS, R. L. The irrigation of the gills in fishes. 2. Efficiency of oxygen uptake in relation to the respiratory flow activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Can. J. Zool.**, v. 40, p. 817-862, 1962.
- SAUNDERS, R. L., SUTTERLIN, A. M. Cardiac and respiratory responses to hypoxia in the sea raven, *Hemipterus americanus*. An investigation of possible control mechanisms. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, v. 28, p. 491-503, 1971.
- SCHIMIDT-NIELSEN, K. Oxigênio. In: SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal**. Tradução de Terezinha Oppido, Carla Finger. Livraria Santos Ed. Com Imp. Ltda., São Paulo, 2002, p. 5-64.
- SEVERI, W.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Respiratory gill surface of the serrasalmid fish, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Fish Biol.**, v. 50, p. 127-136, 1997.
- SHELTON, G., JONES, D. R., MILSOM, W. K. Control of breathing in ectothermic vertebrates. In: CHERNIACK, N. S., WIDDICOMBE, J. G. **Handbook of Physiology**. Section 3: The Respiratory System, Vol. II: Control of Breathing, Part 2. Am. Physiol. Soc. Bethesda, MD, 1986, p. 857-909.
- SIEBERT, H. Thermal adaptation of the heart rate and its parasympathetic control in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 64, p. 275-278, 1979.
- SHINGLES, A.; MCKENZIE, D. J.; CLAIREAUX, G.; DOMENICI, P. Reflex cardioventilatory responses to hypoxia in the flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) and their behavioural modulation by perceived threat of predation and water turbidity. **Physiol. Bioch. Zool.**, v. 78, p. 744-755, 2005.
- SIMÕES, K.; VICENTINI, C. A.; ORSI, A. M.; CRUZ, C. Myoarchitecture and vasculature of the heart ventricle in some freshwater teleosts. **J. Anat.**, v. 200, p. 467-475, 2002.
- SIMÕES, K.; VICENTINI, C. A.; ORSI, A. M.; GREGÓRIO, E. A.; CRUZ, C. Morphological Studies on the Heart Ventricle of African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, p. 247-251, 2002.
- SINGH, B. N.; HUGHES, G. M. Respiration of an air-breathing catfish *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Exp. Biol.**, v. 55, p. 421-434, 1971.
- SINGH, B. N.; HUGHES, G. M. Cardiac and respiratory responses in the climbing perch *Anabas testudineus*. **J. Comp. Physiol.**, v. 84, p. 205–226, 1973.

- SINGH, B. R.; MISHRA, A. P., SHEEL, M.; SINGH, I. Development of the air-breathing organ in the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). **Zool. Anz.**, v. 208, p. 100-111, 1982.
- SKAALS, M.; SKOVGAARD, N.; TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; ABE, A. S.; WANG, T. Cardiovascular changes under normoxic and hypoxic conditions in the air-breathing teleost *Synbranchus marmoratus*: importance of the venous system. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 4167-4173, 2006.
- SKELTON, P. **A complete guide to the freshwater fishes of Southern Africa**. Halfway House, Southern Book Publishers Ltd..
- SMATRESK, N. J. Ventilatory and cardiac reflex responses to hypoxia and NaCN in *Lepisosteus osseus*, an air-breathing fish. **Physiol. Zool.**, v. 59, p. 385-397, 1986.
- SMATRESK, N. J. Vagal afferent control over water and air-breathing patterns in *Lepisosteus oculatus*, an air-breathing fish. **Am. Zool.**, v. 27, p. 111, 1987.
- SMATRESK, N. J. Control of the respiratory mode in air-breathing fishes. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 144-151, 1988.
- SMATRESK, N. J. Chemoreflex control of respiration in an air-breathing fish. In: LAHIRI, S.; FOSTER, I. I. R. E.; DAVIES, R. O.; PACK, A. I. **Chemoreceptors and Chemoreflexes in Breathing: Cellular and Molecular Aspects**. Oxford University Press, London, 1989, p. 29-52.
- SMATRESK, N. J. Respiratory defense reflexes in an air-breathing fish, *Lepisosteus oculatus* (Abstract). **Am. Zool.**, v. 30, p. 67, 1990.
- SMATRESK, N. J. Respiratory control in the transition from water to air breathing in vertebrates. **Am. Zool.**, v. 34, p. 264-279, 1994.
- SMATRESK, N. L.; BURLESON, M. L.; AZIZI, S. Q. Chemoreflexive responses to hypoxia and NaCN in longnose gar: evidence for two chemoreceptive loci. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. 6-125, 1986.
- SMITH, F. M.; JONES, D. R. Localization of receptors causing hypoxic bradycardia in trout (*Salmo gairdenri*). **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 1260-1265, 1978.
- SMITH, F. M.; JONES, D. R. The effect of changes in blood oxygen-carrying capacity on ventilation volume in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Exp. Biol.**, v. 97, p. 325-334, 1982.
- SMITH, F. M.; DAVIE, P. S. Effects of sectioning cranial nerves IX and X on the cardiac response to hypoxia in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 766-768, 1984.
- SMITH, F. M.; KRAMER, D. L. The effect of apparent predation risk on the respiratory behavior of the Florida gar (*Lepisosteus platyrhincus*). **Can. J. Zool.**, v. 64, p. 2133-2136, 1984.

- SNYDER, G. K.; WEATHERS, W. W. Activity and oxygen consumption during hypoxic exposure in high altitude and lowland sceloporine lizards. **J. Comp. Physiol.**, v. 117, p. 291-301, 1977.
- SOUZA, R. H. S.; SONCINI, R.; GLASS, L.; SANCHES, J. R.; RANTIN, F. T. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. **J. Comp. Physiol.**, v. 171, p. 483-489, 2001.
- STEVENS, E. D.; BENNION, G. R.; RANDALL, D. J.; SHELTON, G. Factors affecting arterial pressure and blood flow from the heart in intact, unrestrained lingcod, *Ophiodon elongatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 43, p. 681-695, 1972.
- SUAREZ, R. K.; DOLL, C. J.; BUIE, A. E.; WEST, T. G.; FUNK, G. D.; HOCHACHKA, P. W. Turtles and rats: a biochemical comparison of anoxia-tolerant and anoxia sensitive brains. **Am. J. Physiol.**, v. 26, p. R1083-1088.
- SUNDIN, L.; HOLMGREN, S.; NILSSON, S. The oxygen receptor of the teleost gill? **Acta. Zool.**, v. 79, p. 207-214, 1998.
- SUNDIN, L.; REID, S. G.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*). **Resp. Physiol.**, v. 116, p. :181-119, 1999.
- SUNDIN, L.; REID, S. G.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **J. Exp. Biol.**, v. 203, p. 1225-1239, 2000.
- SUNTI, D. M. Efeitos da abolição da bradicardia reflexa nas respostas cardiorrespiratórias de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em hipóxia severa, vagotomia versus inibição farmacológica. 2013, 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 2013.
- SWAN, L. W. The ecology of the Himalayas. **Sci. Am.**, v. 205, p. 67-78, 1961.
- TAKASUSUKI, J.; FERNANDES, M. N.; SEVERI, W. The occurrence of aerial respiration in *Rhinelepis strigosa* during progressive hypoxia. **J. Fish Biol.**, v. 52, p. 369-379, 1998.
- TAMURA, O.; MORIYAMA, T. On the morphological feature of the gill of amphibious and air-breathing fishes. **Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.**, v. 41, p. 1-8, 1976.
- TAYLOR, E. W. Cardiovascular-respiratory interactions in fish and crustaceans. In: TAYLOR, E. W. **The neurobiology of the cardiorespiratory system**. Manchester, Manchester University Press, 1987, p. 277-303.
- TAYLOR, E. W. Nervous control of the heart and cardiorespiratory interactions. In: HOAR, W. S., RANDALL, D. J. AND FARRELL, A. P. **Fish Physiology**, Vol. XII, Part B. Academic Press, Inc., San Diego, 1992, p. 343-387.

- TAYLOR, E. W.; SHORT, S.; BUTLER, P. J. The role of cardiac vagus in response of dogfish *Scyliorhinus canicula* to hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 70, p. 57-75, 1977.
- TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 855-916, 1999.
- TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; BELÃO, T.; RANTIN, F. T. The basis of vagal efferent control of heart rate in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Exp. Biol.**, v. 212, p. 906-913, 2009.
- TEMMA, K.; KOMAZU, Y.; SHIRAKI, Y.; KITAZAWA, T.; KONDO, H. The roles of α - and β -adrenoceptors in the chronotropic responses to norepinephrine in carp heart (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 92, p. 149-153, 1989.
- TEUGELS, G. A systematic revision of the African species of the genus *Clarias* (Pisces: Clariidae). **Annales Musee Royal de l'Afrique Centrale**, v. 247, p. 1-199, 1986.
- TEUGELS, G. G.; DOMENIQUE, A. Taxonomy and phylogeny of Clariidae – An overview. In: ARRATIA, G.; KAPOOR, B. G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. (Eds.). **Catfishes**. Vol. 2. Science Publishers Inc., Enfield, USA. 2003, p. 465-487.
- TIRRI, R.; RIPATTI, P. Inhibitory adrenergic control of heart rate of perch (*Perca fluviatilis*) *in vitro*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73, p. 399-401, 1982.
- VAN RENSBURG, C. J.; VAN AS, J. G.; KING, P. H. New records of digenean parasites of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) from the Okavango Delta, Botswana, with description of *Thaparotrema botswanensis* sp. n. (Plathelminthes: Trematoda). **Afr. Invertebr.**, v. 54, p. 431-445, 2013.
- VARAS, R.; WYATT, C. N.; BUCKLER, K. J. Modulation of TASK-like background potassium channels in rat arterial chemoreceptor cells by intracellular ATP and other nucleotides. **J. Physiol.**, v. 583, p. 521-536, 2007.
- VERRETH, J.; EDING, E. H.; RAO, G. R. M.; HUSKENS, F.; SEGNER, H. A review of feeding practices, growth and nutritional physiology in larvae of the catfishes *Clarias gariepinus* and *Clarias batrachus*. **J. World Aquacult. Soc.**, v. 24, p. 135-144, 1993.
- VONDRACEK, B.; CECH, J. J.; LONGANECKER, D. (1982). Effect of cycling and constant temperatures on the respiratory metabolism of the tahoe sucker, (*Catostomus tahoensis*) (Pisces: Catostomidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73, p. 11-14, 1982.
- VULESEVIC, B.; McNEILL, B.; PERRY, S. F. Chemoreceptor plasticity and respiratory acclimation in the zebrafish, *Danio serio*. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 1261-1273, 2006.
- WANG, X. M.; DAI, W.; XU, M.; PAN, B. P.; LI, X. Q.; CHEN, Y. T. Effects of Stocking Density on Growth, Nonspecific Immune Response, and Antioxidant Status in African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Isr. J. Aquacult-Bamid.**, v. 65, p. 813, 2013.

- WEIR, E. K.; LÓPEZ-BARNEO, J.; BUCKLER, K. J.; ARCHER, S. L. Acute oxygen-sensing mechanisms. **N. Eng. J. Med.**, v. 353, p. 2042-2055, 2005.
- WEGER, N. P. Treatment of cyanide poisoning with 4-dimethylaminophenol (DMAP) – experimental and clinical overview. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 3, p. 387-396, 1983.
- WEST, J. B. Physiology of extreme altitude. In: FREGLY, M. J.; BLATTEIS, C. M. (Eds). **Handbook of physiology: Environmental physiology**, vol. II. New York, Oxford University Press, 1996, 1307-1325.
- WHITE, F.; HICKS, J. W. Cardiovascular implications of the transition from aquatic to aerial respiration. In: DEJOURS, P.; BOLIS, L.; TAYLOR, C. R.; WEIBEL, E. R. **Comparative Physiology: life in water and on land**. Padova, Liviana Press, Springer Verlag, v. 9, 1987, p. 93-105.
- WILKIES, P. R. H.; WALKER, R. L.; McDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Respiratory, ventilatory, acid-base and ionoregulatory physiology of the white sucker *Catostomus commersoni*: The influence of hyperoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 91, p. 239-254, 1981.
- WOOD, C. M.; SHELTON, G. The reflex control of heart rate and cardiac output in the rainbow trout: interactive influences of hypoxia, haemorrhage, and systemic vasomotor tone. **J. Exp. Biol.**, v. 87, p. 271–284, 1980.
- WOOD, S. C.; GATZ, R. N.; GLASS, R. N. Oxygen transport in the green sea turtle. **J. Comp. Physiol.**, v. 154, p. 275-280, 1984.
- WOOD, C. M.; PIEPRZAK, P.; TROTT, J. N. The influence of temperature and anaemia on the adrenergic and cholinergic mechanisms controlling heart rate in the rainbow trout. **Can. J. Zool.**, v. 57, p. 2440-2447, 1979.
- WYATT, C. N.; BUCKLER, K. J. The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. **J. Physiol.** 556, p. 175-191, 2004.
- WYATT, C. N.; EVANS, A. M. AMP –activated protein kinase and chemotransduction in the carotid body. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 157, p. 22-29, 2007.
- WYATT, C. N.; MUSTARD, K. J.; PEARSON, S. A.; DALLAS, M. L.; ATKINSON, L.; KUMAR, P.; PEERS, C.; HARDIE, D. G.; EVANS, A. M. AMP-activated protein kinase mediates carotid body excitation by hypoxia. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 8092-8098, 2007.
- YAMANOUCCI, A.; BURNSTOCK, G. An electronmicroscopic study of the innervation of the trout heart. **J. Comp. Neurol.**, v. 132, p. 567–588, 1968.
- YILMAZ, E. The effects of two chemo-attractants and different first feeds on the growth performances of African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) at different larval stages. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 29, p. 309-314, 2005.
- YOUNG, J. Z. The innervation and reactions to drugs of the viscera of teleostean fish. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, 120: 303–318, 1936.

- YU, K. L.; WOO, Y. S. Effects of ambient oxygen tension and temperature on the bimodal respiration of an air-breathing teleost. **Physiol. Zool.**, v. 58, p. 181-189, 1985.
- ZAKI, M. I.; ABDULA, A. The reproduction and development of *Clarias gariepinus* (Clariidae) from lake Manzala (Egypt) **J. Ichthyol.**, v.23, p. 48-58, 1983.
- ZUTSHI, D. P.; KAUL, V.; VASS, K. K. Limnology of high altitude Kashmir lakes. **Verth. Int. Verein. Limnol.**, v. 18, p. 599-604, 1972.