

**Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Ciências Fisiológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e da Saúde**

**Caracterização dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos no controle
dos reflexos cardio-respiratórios de trairão,
Hoplias lacerdae (Teleostei, Erythrinidae) em resposta à hipóxia
ambiental.**

Mariana Andrade de Micheli

**São Carlos, SP
2008**

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Ciências Fisiológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e da Saúde

**Caracterização dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos no controle
dos reflexos cardio-respiratórios de trairão,
Hoplias lacerdae (Teleostei, Erythrinidae) em resposta à hipóxia
ambiental.**

Mariana Andrade de Micheli

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin.

São Carlos, SP
2008

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

M623cq

Micheli, Mariana Andrade de.

Caracterização dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos no controle dos reflexos cardio-respiratórios de trairão, *Hoplias lacerdae* (Teleostei, Erythrinidae) em resposta à hipóxia ambiental / Mariana Andrade de Micheli. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

59 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Fisiologia comparada. 2. Quimiorreceptores. 3. Erythrinidae. 4. Função cardio-respiratória. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)

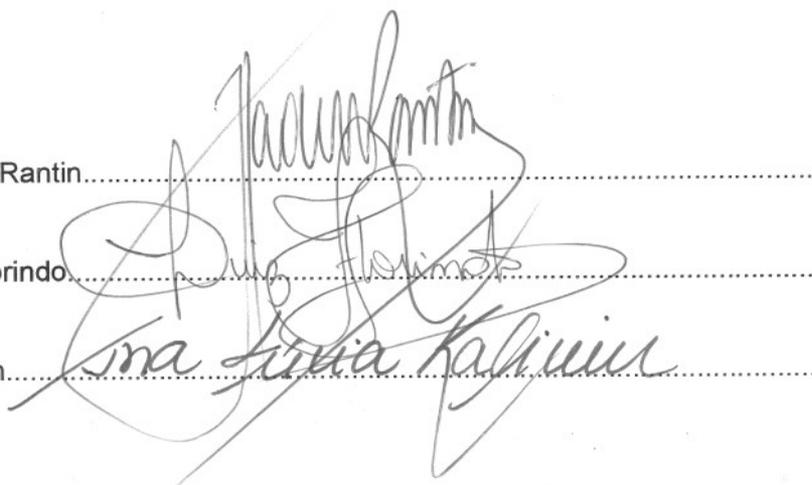
Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de Mariana Andrade de Micheli

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

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

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Kalinin.....



The image shows three handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal dotted line. The top signature is for Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, the middle for Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo, and the bottom for Prof. Dr. Ana Lúcia Kalinin. The signatures are stylized and cursive.

Orientador,

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin

*Às duas mulheres que são meus exemplos
de força, honestidade e superação:
minha avó Zulmira (†) e minha mãe Marina,
com amor, dedico este trabalho.*

Agradecimentos

Ao fim de 2 anos de trabalho, gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pela orientação, paciência, confiança, e acima de tudo, por ter me aberto as portas quando mais precisei, mesmo sem me conhecer, por isso minha eterna gratidão.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFSCar e à sua coordenadora Prof. Dra. Keico O. Nonaka.

Ao Prof. Dr. Edwin Taylor (Ted), por me encaminhar, aconselhar e pelas conversas sempre enriquecedoras e divertidas.

Às professoras Dra. Ana L. Kalinin, Dra. Mônica Costa e Marisa N. Fernandes pelo apoio e convivência no laboratório.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo e Dr. Cléo A.C. Leite pelos ensinamentos, ajudas e ricas discussões, sem as quais esse trabalho não teria sido possível.

Aos funcionários do DCF, que sempre estavam lá quando precisei: Carmen, Thaís, Zé Roberto, Nadir, Selma, Alexandre, Dona Vera e um “muito obrigada” especial àquele que foi mais que um técnico, foi e será sempre um grande amigo, que sei que posso contar para todas as horas, Seu Ângelo!

Aos colegas e amigos de laboratório: minhas queridas amigas Diana e Ritinha, Fernanda, Luciano (DW), Daniela, Juliana Figueiredo, Fabiano, Kátia, Eli Oba, Anelli, André, Fabinho, Patrícia, Thiago, Zezinho e Daniel pela amizade e incentivo em todos os momentos de

convivência. E também a todos os alunos e professores do DCF a quem eu não citei o nome, mas que também tornaram de alguma forma o dia-a-dia no laboratório mais feliz!

Em especial a minha amiga e madrinha Juliana Thomaz e meu amigo Thiago Belão, que foram mais que amigos, que estavam lá quando mais precisei, na vida e no trabalho, nos choros e risadas, e principalmente dividindo laboratório, a ajuda de vocês foi imprescindível!

À toda a minha família, em especial minha mãe Marina, sem a qual eu não teria chegado tão longe, a qual sempre foi minha fortaleza e mais que uma mãe, minha melhor amiga, obrigada pelo amor, dedicação e confiança. À minha avó Zulmira (†), que foi meu estímulo e exemplo, às minhas tias Eulina e Lourdes pelo apoio de sempre.

Meu agradecimento especial ao meu marido Dr. Hamish Campbell, que além de estar ao meu lado sempre, mesmo longe às vezes, foi indispensável para a realização dos meus experimentos, sempre paciente, dando idéias, apoio e amor!

Finalmente, gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, e desculpas se por ventura eu me esqueci de citar o nome de alguém. Afinal são necessárias tantas pessoas para tornar possível a realização de apenas um sonho!

A todos muito obrigada!!!!

Sumário

| | |
|--|----|
| Índice de Tabelas | i |
| Índice de Figuras | ii |
| Resumo | iv |
| Abstract | v |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Ambiente hipóxico e adaptações dos peixes | 1 |
| 1.2 Quimiorreceptores de O ₂ e respostas cardio-respiratórias | 3 |
| 1.3 Quimiorreceptores de O ₂ e NaCN | 6 |
| 1.4 Erythrinideos e o trairão | 7 |
| 1.5 Objetivos | 11 |
| 2. Materiais e Métodos | 12 |
| 2.1 Animais | 12 |
| 2.2 Procedimentos cirúrgicos | 12 |
| 2.3 Protocolo experimental | 15 |
| 2.4 Análise estatística | 16 |
| 3. Resultados | 17 |
| 3.1 Controle e Sham - operated | 17 |
| 3.2 Respostas Cardiovasculares | 20 |
| 3.3. Respostas Respiratórias | 28 |
| 4. Discussão | 36 |
| 4.1 Respostas Cardiovasculares | 36 |
| 4.2 Respostas Respiratórias | 44 |
| 5. Conclusões | 50 |
| 6. Bibliografia | 51 |

Índice de Tabelas

- Tabela I:** Valores sob condição de hipóxia das variáveis cardio-respiratórias, em *Hoplias lacerdae*, nos grupos: intacto (n = 8) e “sham-operated” (n = 4). Os pontos são médias \pm S.E.M. 19
- Tabela II:** Valores de repouso das variáveis cardio-respiratórias, em *Hoplias lacerdae*, nos grupos: intacto e denervados (IX, G1 e G4). Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao grupo intacto (controle), com $P < 0,05$. Os pontos são médias \pm S.E.M. 22
- Tabela III:** Resumo dos padrões de localização, orientação e inervação dos quimiorreceptores de O₂ ligados às respostas cardio-respiratórias em peixes da família Erythrinidae (*Hoplias malabaricus*, *Hoplias lacerdae* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*). 43

Índice de Figuras

- Figura 1: Exemplar de trairão, *Hoplias lacerdae* (www.jjphoto.dk/..hoplias_lacerdae.htm).....10
- Figura 2: Vista dos ramos dos nervos cranianos IX e X que enervam os arcos branquiais de trairão, *Hoplias lacerdae*. 14
- Figura 3: Traçados representativos dos registros da pressão arterial (Pa) e pressão intrabucal (P_{bucal}), evidenciando as alterações dos padrões cardio-respiratórios de *H. lacerdae*, do grupo intacto: A - normóxia ($P = 140$ mmHg); B - hipóxia ($P = 30$ mmHg); C - injeção interna; D - Injeção externa. Setas indicam as injeções de NaCN. 18
- Figura 4: Respostas cardíacas (f_H) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). A injeção controle de água na boca não apresentou diferenças significativas na f_H , não sendo mostrada no gráfico para clareza na visualização dos dados. Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle ($n = 8$), IX ($n = 9$), G1 ($n = 9$) e G4 ($n = 8$) 23
- Figura 5: Frequência cardíaca de *H. lacerdae* em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores em normóxia. Pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle ($n = 8$), IX ($n = 9$), G1 ($n = 9$) e G4 ($n = 8$). 24
- Figura 6: Pressão arterial (Pa) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle ($n = 8$), IX ($n = 9$), G1 ($n = 9$) e G4 ($n = 8$). 26
- Figura 7: Pressão arterial de trairão, *H. lacerdae*, em relação à hipóxia gradual. Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle ($n = 8$), IX ($n = 9$), G1 ($n = 9$) e G4 ($n = 8$). 27

- Figura 8: Respostas respiratórias (f_R) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8). 30
- Figura 9: Frequência respiratória (f_R) de *H. lacerdae* em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (normóxia). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8). 31
- Figura 10: Respostas respiratórias (V_{amp}) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8). 32
- Figura 11: Amplitude Ventilatória de trairão, *H. lacerdae*, em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (normóxia). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8). 33
- Figura 12: Respostas respiratórias (V_{tot}) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8). 34
- Figura 13: Ventilação total de trairão, *H. lacerdae*, em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (normóxia). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8). 35

Resumo

A capacidade de sentir e responder às variações de oxigênio no ambiente é de extrema importância para peixes. Isto é mais acentuado em ambientes dulceaquícolas tropicais onde a hipóxia ambiental ocorre frequentemente. Estudos recentes sobre respostas cardio-respiratórias em peixes tropicais têm focado espécies tolerantes à hipóxia. O foco do presente estudo foi examinar o controle neural e a função cardio-respiratória de um peixe adaptado a ambientes bem oxigenados. O trairão, *Hoplias lacerdae* foi escolhido por pertencer à família Erythrinidae, que apresenta a maioria das espécies tolerantes à hipóxia, incluindo algumas onde os receptores de O₂ já foram caracterizados. O foco do estudo foi investigar a localização, distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O₂ em trairão, bem como os parâmetros cardio-respiratórios são modificados pela hipóxia. Os peixes foram submetidos à denervações seletivas dos ramos branquiais dos nervos cranianos IX e X. Os grupos foram: (1) apenas nervo IX seccionado do 1º arco branquial (IX; n = 9), (2) primeiro arco, ambos IX e ramo do X seccionados (G1; n = 9), (3) os quatro arcos, ambos IX e X seccionados (G4; n = 8), (4) grupo controle (n = 8) e (5) grupo “sham-operated”, que passou por cirurgia, mas não teve os nervos seccionados (n = 4). Uma cânula foi inserida na aorta ventral para monitorar frequência cardíaca e pressão arterial. A frequência e a amplitude ventilatórias foram monitoradas por uma cânula no palato da cavidade bucal. Os peixes foram expostos à hipóxia gradual de 140 a 10 mmHg. Ambas as superfícies, interna e externa, das brânquias receberam tratamento de NaCN para determinar a orientação dos receptores. Os resultados mostraram que receptores relacionados ao controle da frequência cardíaca e amplitude ventilatória estão distribuídos por todos os arcos branquiais, orientados tanto interna quanto externamente, e ambos os nervos IX e X estão envolvidos nesta resposta. Este padrão difere do observado para a frequência respiratória. Os receptores envolvidos no controle dessa resposta localizam-se internamente no 1º arco branquial. O trairão também possui quimiorreceptores de O₂ envolvidos no controle da pressão arterial apenas no primeiro arco branquial, participando de um controle barostático eficiente. Não foram identificados receptores de O₂ extrabranquiais em trairão. Este padrão difere da maioria dos peixes tolerantes à hipóxia onde os estes receptores são importantes para iniciar rapidamente as respostas cardio-respiratórias à hipóxia.

Abstract

The ability to sense and respond to oxygen availability in the environment is of extreme functional importance for fish. This is even more so in tropical freshwater habitats where environmental hypoxia can occur rapidly in space and time. Recent physiological studies on the cardio-respiratory response of tropical fishes have focused on hypoxia tolerant species. This aim of this study was to examine the neural control and function of the cardio-respiratory system in a fish that is adapted to living at high levels of oxygen. Trairão, *Hoplias lacerdae* was chosen because it is a member of the Erythrinidae family, in which most of species are hypoxia tolerant, including some where the O₂ receptors has already been characterized. The study focused on investigation of the localization, distribution and orientation of chemoreceptors of O₂ in trairão. Also how the cardio-respiratory parameters were modified by hypoxia. The fish were submitted to selective denervations of the branchial branches of the cranial nerves IX and X. These were, (1) only IX nerve sectioned at the 1st gill arch (IX; n = 9), (2) first gill arch both IX and branch of X sectioned (G1; n = 9), (3) all four gill arches both IX and X sectioned (G4; n = 8), (4) a control group (n = 8) and (5) a sham-operated group that underwent surgery but no nerves were sectioned (n = 4). A cannula was inserted into the ventral aorta to monitor changes in heart rate and blood pressure. Ventilation rate and amplitude was also monitored with a cannula through the roof of the buccal cavity. The fish were exposed to a gradual hypoxia from 140 to 10 mmHg. Either the internal and external surfaces of the gill were treated with NaCN to determine the receptors orientation. Results showed that the receptors related to the heart rate control and ventilation amplitude were distributed over all gill arches on both the internal and external surfaces, and the branches of the both nerves IX and X were involved in these responses. This pattern differs from that observed for the ventilation rat. The receptors involved in the control of this response are located internally to the first gill arch. Tairão also showed blood pressure control chemoreceptors on the first gill arch, involved in a very efficient barostatic control. Extrabranhial O₂ chemoreceptors were not identified in trairão. This differs from the hypoxia tolerant fish, where extrabranhial chemoreceptors are important to start the cardio-respiratory responses the most fast and accurate possible.

1. Introdução

1.1 Ambiente hipóxico e adaptações dos peixes

A grande maioria dos peixes utiliza a respiração aeróbica sendo dependentes de um suprimento adequado de O_2 . O suprimento de O_2 para os animais de respiração aquática é limitado pela baixa solubilidade deste gás na água que, nos ambientes tropicais, é ainda mais crítica com as constantes flutuações da temperatura do meio. “Inputs” de matéria orgânica, resultantes de chuvas e flutuações sazonais dos níveis de lagoas marginais e várzeas onde as espécies ocorrem, também contribuem para essas flutuações no oxigênio dissolvido. Tal problema é ainda exacerbado pelo fato de que as elevações de temperatura guardam uma relação direta com aumentos na taxa metabólica e, conseqüentemente, na demanda de O_2 . Considerando-se que estes fatores freqüentemente levam a uma hipóxia ambiental, não é surpresa que os peixes que vivem em tais ambientes tenham desenvolvido adaptações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais para garantirem sua sobrevivência.

Segundo HOCHACHKA (1980), quando os peixes são expostos à hipóxia ambiental podem responder comportamentalmente, nadando para áreas com maior disponibilidade de O_2 . Porém, se tal condição persistir, 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 da hipóxia.

Quando impossibilitados de “fugir” do ambiente hipóxico, a primeira resposta fisiológica que os teleósteos apresentam é o aumento da ventilação branquial (\dot{V}_G) com elevações na freqüência respiratória (f_R) e/ou no volume ventilatório (V_T) (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979;

RANDALL, 1982; SMITH & JONES, 1978). Dentre os teleósteos mais tolerantes à hipóxia, os aumentos na \dot{V}_G são freqüentemente decorrentes de um maior incremento no V_T do que na f_R . Segundo RANTIN et al. (1992), tal mecanismo requer um menor custo metabólico para a \dot{V}_G .

Tais alterações ventilatórias são freqüentemente acompanhadas por uma bradicardia reflexa que pode resultar na manutenção, ou mesmo no aumento, do volume sistólico (RANTIN et al., 1992; FERNANDES & RANTIN, 1994, MILSOM et al., 1999). Essas respostas cardio-respiratórias frente à hipóxia foram observadas na maioria das espécies já estudadas.

A bradicardia hipóxica pode levar a um aumento do volume sistólico, a fim de manter o débito cardíaco. Paralelamente, a resistência sistêmica é aumentada, resultando na elevação da pressão sanguínea em ambas as aortas, dorsal e ventral. Assim, o aumento do volume sistólico e a diminuição da f_H , como citado anteriormente, resultam em uma elevação acentuada na pressão de bombeamento sanguíneo, fazendo com que o sangue seja ejetado do coração com mais força do que o normal a cada contração (RANDALL, 1982). Estes mecanismos levam a passagem do volume de sangue pelas lamelas secundárias, a cada batimento cardíaco, por um intervalo maior de tempo, com o objetivo de retirar da água que passa através das brânquias o máximo de O_2 possível.

Estudos têm demonstrado que a eficiência de extração de O_2 (EO_2) pelas brânquias dos teleósteos é geralmente alta, podendo chegar a 80% (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979).

Segundo SAUNDERS (1962) e HUGHES (1966), a percentagem de utilização do oxigênio diminui à medida que o fluxo de água que passa pelas brânquias é aumentado. Porém, a passagem de um maior fluxo de água pela superfície de trocas gasosas durante períodos de hipóxia ambiental traz benefícios ao animal, pois o gradiente de difusão entre o sangue e a água é mantido o mais alto possível. Assim, uma das respostas imediatas apresentadas por peixes em

exposição à hipóxia, a fim de regular a redução de O_2 ambiental, é um aumento no volume ventilatório (V_T).

1.2 Quimiorreceptores de O_2 e respostas cardio-respiratórias

Estudos realizados por MILSOM & BRILL (1986) e FRITSCHÉ & NILSSON (1989) demonstraram que os receptores de O_2 envolvidos no controle da \dot{V}_G estariam localizados no primeiro par de arcos branquiais, detectando diretamente as variações de O_2 no meio circundante (quimiorreceptores de O_2 orientados externamente). Estes receptores são responsáveis pelo acionamento dos mecanismos ventilatórios de compensação, os quais vão atuar na regulação, tanto do fluxo da água através das brânquias, quanto no fluxo de sangue através das lamelas secundárias. Independentemente do estímulo, existem diferentes respostas ventilatórias exibidas pelas diversas espécies de teleósteos que, aparentemente, são suficientes para manter a PO_2 do sangue arterial durante períodos de hipóxia (MILSOM, 1993).

Os arcos branquiais em peixes são inervados pelos nervos cranianos IX (glossofaríngeo) e X (vago). A secção bilateral dos nervos IX e X aboliu a bradicardia hipóxica em truta, *Oncorhynchus mykiss* (SMITH & JONES, 1978), em tambaqui, *Colossoma macropomum* (SUNDIN et al., 2000; FLORINDO, 2002), em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (LEITE et al., 2007) e em jeju, *Hopleryttrinus unitaeniatus* (LOPES, 2003). Entretanto, BUTLER et al. (1977) observaram que, para abolir a bradicardia hipóxica do elasmobrânquio “dogfish”, *Scyliorhinus canícula*, foi necessária a secção bilateral dos nervos cranianos V (trigêmio), VII (facial), XI e X e concluíram que os receptores de O_2 também estão distribuídos difusamente nas cavidades orobranquial e parabranquial.

Dados similares, obtidos a partir da secção progressiva dos nervos cranianos, foram recentemente relatados para peixes neotropicais como o tambaqui, *Colossoma macropomum* (SUNDIN et al., 2000; MILSOM et al., 2002), a traíra, *Hoplias malabaricus* (SUNDIN et al., 1999), e o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (LEITE et al., 2007). Além disso, SAUNDERS & SUTTERLIN (1971) observaram que a secção bilateral dos nervos IX e X, em *Hemitripterus americanus*, não aboliu a resposta cardíaca à hipóxia. Porém, sem fazer a denervação progressiva, só foi possível concluir que os receptores responsáveis por esta resposta não se encontram exclusivamente nas brânquias (receptores extrabranquiais).

Ao longo dos anos, possíveis áreas de recepção de O₂ têm sido testadas e sugeridas como locais de origem desse tipo de sinal, como as pseudobrânquias (MCKENZIE et al., 1991). Há também evidências de sítios receptores fora do aparato branquial de peixes, como no sistema nervoso central (BANFORD, 1974; JONES, 1983; WILKIES et al., 1981), artéria aferente (SMATRESK et al., 1986) e a já observada existência de receptores venosos de O₂ (BARRETT & TAYLOR, 1984),.

Contrariamente ao que fora postulado por FRITSCHÉ & NILSSON (1989), SUNDIN et al. (1999) constataram que quimiorreceptores sensíveis ao O₂ estão distribuídos por todos os arcos branquiais de traíra, *Hoplias malabaricus*, detectando diminuições na disponibilidade do O₂ do meio e produzindo um aumento na f_R . Estes autores também constataram a existência de receptores orientados interna (monitoramento da PO₂ do sangue arterial) e externamente (monitorando a PO₂ da água inspirada) nas brânquias que participam na modulação do V_T.

Resultados similares foram obtidos por LOPES (2003) que observou que em jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, os receptores de O₂ que participam do aumento na f_R estão situados exclusivamente nas brânquias, distribuídos por todos os arcos branquiais e monitoram as

mudanças de O₂ tanto do sangue (orientados internamente) quanto da água (orientados externamente), tendo sido constatado que o mesmo padrão de distribuição de receptores de O₂ também ocorre em tambaqui, *C. macropomum* (SUNDIN et al., 2000; FLORINDO, 2002). SUNDIN et al. (2000) verificaram, também, que há receptores de O₂ orientados internamente e externamente que estão envolvidos na regulação do V_T, distribuídos por todos os quatro arcos branquiais, e que receptores extrabranquiais também estão envolvidos na modulação deste parâmetro ventilatório.

Embora os peixes teleósteos também apresentem respostas à hipercarbia, não há evidência clara de um papel para os quimiorreceptores centrais no controle da ventilação em peixes de respiração exclusivamente aquática. A acidose hipercárbica estimulou a ventilação no bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, (BURLESON & SMATRESK, 1993). Esta resposta foi abolida pela denervação total das brânquias, indicando ser resultado da estimulação de receptores periféricos inervados pelos nervos cranianos IX e X. BURLESON & SMATRESK (1993) sugeriram que estes podem pertencer à mesma população de receptores que respondem ao oxigênio.

Face ao exposto, pode-se depreender que não existe um padrão de distribuição de quimiorreceptores de O₂ entre peixes teleósteos e elasmobrânquios. A variabilidade de respostas aos estímulos hipóxicos entre os teleósteos indica haver uma grande heterogeneidade entre a localização, distribuição e orientação dos quimiorreceptores sensíveis ao O₂ nas diferentes espécies.

1.3 Quimiorreceptores de O₂ e NaCN

Quimiorreceptores sensíveis ao O₂ participam do controle dos reflexos cardíaco-respiratórios em peixes, modulando a bradicardia reflexa e o aumento no esforço ventilatório (TAYLOR, 1992). Muitos estudos dão suporte à existência de receptores periféricos de O₂ nas brânquias ou próximos a elas. Contudo, os sítios anatômicos precisos, assim como as propriedades funcionais destes quimiorreceptores periféricos em peixes permanecem incertas (BURLESON et al., 1992; MCKENZIE et al., 1995). Este fato se deve a carência de métodos de identificação histológica direta dos quimiorreceptores de O₂ em peixes.

Segundo BURLESON et al. (1992) células nos filamentos branquiais de peixes têm sido identificadas como semelhantes às células quimiorreceptoras de mamíferos. Essas candidatas a células quimiorreceptoras exibem fluorescência monoaminica usando a técnica de Falk-Hillarp (DONALD, 1984, 1987; DUNEL-ERB et al., 1982; LAURENT, 1984), assim como os corpos carotídeos de mamíferos (NIEMA & OJALA, 1964). Recente estudo de BURLESON et al. (2006), demonstrou a existência de células morfológicamente semelhantes às células tipo I dos corpos carotídeos de mamíferos em *Ictalurus punctatus*, porém somente pode-se afirmar que seriam supostas células quimiossensíveis ao O₂.

Assim, a identificação dos locais de origem das aferências dos quimiorreceptores de O₂, bem como sua distribuição nestes locais, tem sido realizada, em sua maioria, por métodos indiretos (MILSOM, 1997). Estas investigações foram realizadas, em sua grande maioria utilizando o cianeto de sódio (NaCN). Isso porque este sal bloqueia o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondrial, estimula a atividade dos quimiorreceptores sensíveis ao O₂ em todos os vertebrados nos quais eles foram encontrados, os quais incluem anfíbios, répteis,

aves e mamíferos, sugerindo que os quimiorreceptores de O₂ seriam similares em todos os vertebrados (BURLESON et al., 1992).

As alterações cardio-respiratórias apresentadas por peixes, decorrentes da administração de NaCN, parecem ser determinadas apenas pela estimulação dos quimiorreceptores de O₂, assim como ocorre em mamíferos (FIDONE & GONZÁLES, 1986). Isso foi confirmado por BURLESON & MILSOM (1995) em experimento com truta arco-íris, *Onchorhynchus mykiss*, onde foi observado que o NaCN causou um estímulo mais prolongado do que qualquer outro composto químico testado. Assim, o NaCN vem sendo utilizado com frequência para a determinação da localização e distribuição dos quimiorreceptores de O₂ em estudos indiretos.

Desta forma, apesar da falta de conhecimento sobre o mecanismo exato de funcionamento dos quimiorreceptores de O₂, principalmente em peixes, pode-se inferir que as respostas reflexas cardiovasculares e respiratórias desencadeadas pela administração de NaCN são mediadas apenas por estes receptores, sendo esta uma boa ferramenta para o estudo destes.

1.4 Eritrinídeos e o trairão

Erythrinidae é uma família pequena, apresentando três gêneros na América do Sul: *Hoplias* Gill, 1903, *Erythrinus* Scopoli, 1777; e *Hoplerythrinus* Gill, 1895 (GODOY, 1975), sendo que todas as espécies destes gêneros são de hábitos carnívoros. *Hoplias* apresenta respiração exclusivamente branquial (ou aquática), enquanto os outros dois gêneros apresentam respiração aérea facultativa (ou acessória), utilizando a bexiga natatória como órgão de respiração aérea (GRAHAM, 1997; OLIVEIRA et al., 2004). Os peixes desta família habitam predominantemente ambientes dulceaquícolas pobres em oxigênio nas regiões tropicais e

subtropicais da América do Sul (BRITISKI et al., 1984; DICKSON & GRAHAM, 1986; RANTIN et al., 1993).

A maioria dos eritrínídeos é considerada bem adaptada às condições de hipóxia, como é o caso dos jejus, *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Erythrinus erythrinus* (RANDALL et al., 1981), que apresentam respiração aérea facultativa e da traíra, *Hoplias malabaricus*, de respiração exclusivamente aquática, exemplares típicos de lagos, lagoas e corpos d'água estagnados (RANTIN & JOHANSEN, 1984). A tolerância à hipóxia da traíra tem sido atribuída a uma combinação especial de fatores, que incluem baixo metabolismo, tolerância a baixas tensões de O₂ dissolvido e pequena necessidade de convecção de água para a respiração branquial (RANTIN & JOHANSEN, 1984), atribuída à sua grande área da superfície funcional respiratória (FERNANDES & RANTIN, 1985). Além disso, a espécie apresenta uma alta capacidade anaeróbica (DRIEDZIC et al., 1978; HOCHACHKA et al., 1978), o que a capacita a sobreviver por longos períodos em águas quase anóxicas.

O trairão, *Hoplias lacerdae* (Figura 1), diferentemente dos outros eritrínídeos, habita rios e riachos mais oxigenados (GODOY, 1975). Esta espécie, carnívora, nativa das bacias Amazônica e Paraná-Paraguai, apresenta carne de excelente qualidade e características desejáveis para a pesca esportiva (Andrade et al., 1998). Pode atingir 20 kg e 1 metro de comprimento, possui coloração geral quase preta, os flancos cinzentos com faixas transversais escuras, abdome esbranquiçado e nadadeiras com pontos escuros.

Apesar de ser uma espécie interessante por se distinguir de seus parentes próximos, tanto em relação aos ambientes em que vivem quanto às suas tolerâncias à hipóxia, poucos estudos foram realizados com trairão. Dentre estes estudos, destaca-se o trabalho de RANTIN et al. (1993), que analisaram comparativamente as respostas cardio-respiratórias frente à hipóxia

gradual de traíra e trairão. Neste estudo os autores observaram que a ecologia diferente em ambas as espécies de *Hoplias* é claramente refletida em aspectos básicos de suas respostas cardio-respiratórias à hipóxia ambiental. Porém, mesmo frente a essas diferenças, foi possível concluir que, em ambas as espécies a redução na VO_2 está correlacionada com o início da bradicardia hipóxica, mas não está ligada às mudanças na frequência ventilatória..

Outro trabalho, que também foi realizado com as mesmas duas espécies co-genéricas, mas ecologicamente distintas, foi o de KALININ et al. (1996), que estudaram o fluxo ventilatório relativo aos volumes intrabucal e intra-operculares, também em resposta à hipóxia gradual. Os autores constataram que *H. malabaricus* exibe uma maior diferença de pressão entre os compartimentos bucal e opercular quando comparado ao aumento moderado que ocorre em *H. lacerdae*. Além disso, foi possível averiguar que a resposta máxima à hipóxia em trairão está correlacionada com o volume corrente, que nestas condições se aproxima do limite morfológico da câmara opercular.

Embora as repostas cardio-respiratórias à hipóxia de *Hoplias lacerdae*, tenham sido elucidadas por RANTIN et al. (1993), os mecanismos de controle das repostas reflexas envolvidos na compensação à hipóxia, tais como os ajustes ventilatórios (f_R , V_T e \dot{V}_G) e cardíacos (desenvolvimento da bradicardia hipóxica), ainda permanecem desconhecidos.

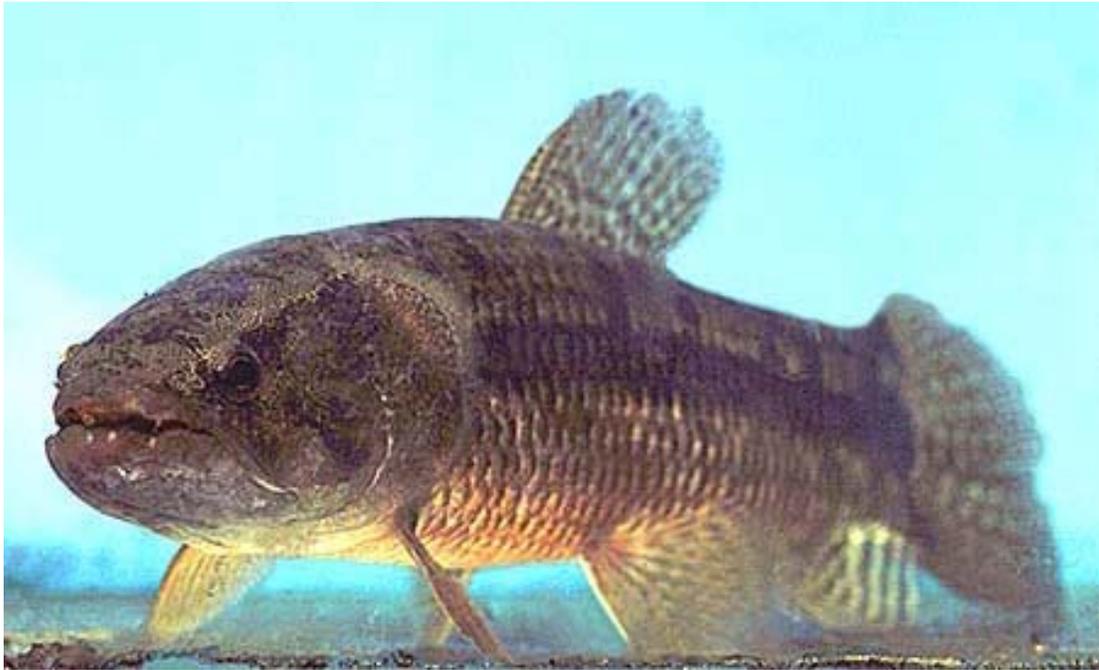


Figura 1: Exemplar de trairão, *Hoplias lacerdae* (www.jjphoto.dk/.../hoplias_lacerdae.htm)

1.5 Objetivos

O presente estudo teve por objetivo: a) detectar a localização e a distribuição dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos nessas respostas reflexas; b) se esses receptores detectam as variações de O₂ na corrente ventilatória e/ou no sangue (orientação interna e/ou externa dos quimiorreceptores) e c) como se dá a modulação das respostas cardio-respiratórias frente à hipóxia gradual.

Outro objetivo deste estudo foi relacionar os achados de trabalhos realizados anteriormente com espécies filogeneticamente muito próximas ao trairão: a traíra, *Hoplias malabaricus* (SUNDIN et al., 1999) e o jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (LOPES, 2003). Portanto, com este estudo foi possível estabelecer as relações de similaridades e de diferenças filogenéticas entre as espécies de eritrínídeos no tocante aos seus mecanismos cardio-respiratórios frente à hipóxia ambiental. Isso foi possível comparando-se uma espécie de respiração exclusivamente aquática e que habita preferencialmente ambientes lóticos (trairão, *Hoplias lacerdae*), uma espécie de respiração exclusivamente aquática e que habita preferencialmente ambientes lênticos (traíra, *Hoplias malabaricus*) e uma espécie de respiração aérea acessória e de ambientes lênticos (jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*).

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados exemplares adultos de trairão, *Hoplias lacerdae*, com peso corpóreo médio de $402 \pm 206,7$ g. Os peixes, cujas matrizes são originárias da Bacia do Rio Grande, foram cedidos pela Estação de Piscicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas e Fazenda Cascata, São Sebastião do Paraíso, ambas no Estado de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em tanques de capacidade de 500 ou 1000 L, com recirculação de água aerada e termostaticada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar. Os trairões foram alimentados semanalmente com peixes de menor tamanho (*Geophagus*, *Astyanax*, *Tilapia*, *Oreochromis*, etc.), coletados na Represa da Universidade Federal de São Carlos.

2.2. Procedimentos cirúrgicos

Os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) e transferidos para uma mesa cirúrgica onde foram artificialmente ventilados com uma solução anestésica mais branda ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de benzocaína). Uma cânula de polietileno (PE 50 com um pequeno segmento de PE 10 na extremidade), preenchida com uma solução salina heparinizada (NaCl 0,9%, 100 IU.mL^{-1} de heparina) foi inserida na artéria aferente do terceiro arco branquial para a injeção de drogas, de acordo com o método descrito por AXELSSON & FRITSCHÉ (1994). A mesma cânula foi acoplada a um transdutor de pressão (Utah Medical Products) conectado a um amplificador de

pressão (AECAD 0804 – AVS, São Paulo) e, este, a um canal de uma placa de aquisição DATAQ DI 154RS de um computador IBM compatível, para os registros da pressão arterial (Pa) e da frequência cardíaca (f_H) em tempo real.

Com o auxílio de uma mini-furadeira e uma broca, foi aberto um orifício entre as narinas, acessando a cavidade bucal, onde foi inserida outra cânula de polietileno (PE160) fixada no palato por uma flange (detalhes em SUNDIN et al., 1999). Esta cânula serviu para a injeção de drogas na corrente ventilatória e, foi conectada a outro canal do sistema de transdução, o qual, por sua vez, foi conectado a um segundo canal do sistema de aquisição (acima descrito) que serviu para efetuar os registros de variação da pressão intrabucal. Através desta preparação foram efetuados os registros de frequência respiratória (f_R), amplitude ventilatória (V_{amp}), os quais permitiram o cálculo da ventilação total ($V_{tot} = f_R \times V_{amp}$).

Para o procedimento cirúrgico nos grupos que tiveram os nervos cranianos seccionados, foi realizada uma pequena incisão (± 1 cm) no epitélio dorsal do opérculo, na região próxima a extremidade dos primeiros e segundos arcos branquiais, onde eles encontram a superfície da cavidade opercular. Assim foi possível acessar o nervo craniano IX e o ramo pretremático do X, os quais inervam o primeiro arco branquial. Para uma completa denervação branquial, foi necessário o acesso a todos os ramos branquiais dos nervos IX e X, assim realizou-se uma incisão maior ($\pm 0,5$ cm) (Figura 2).

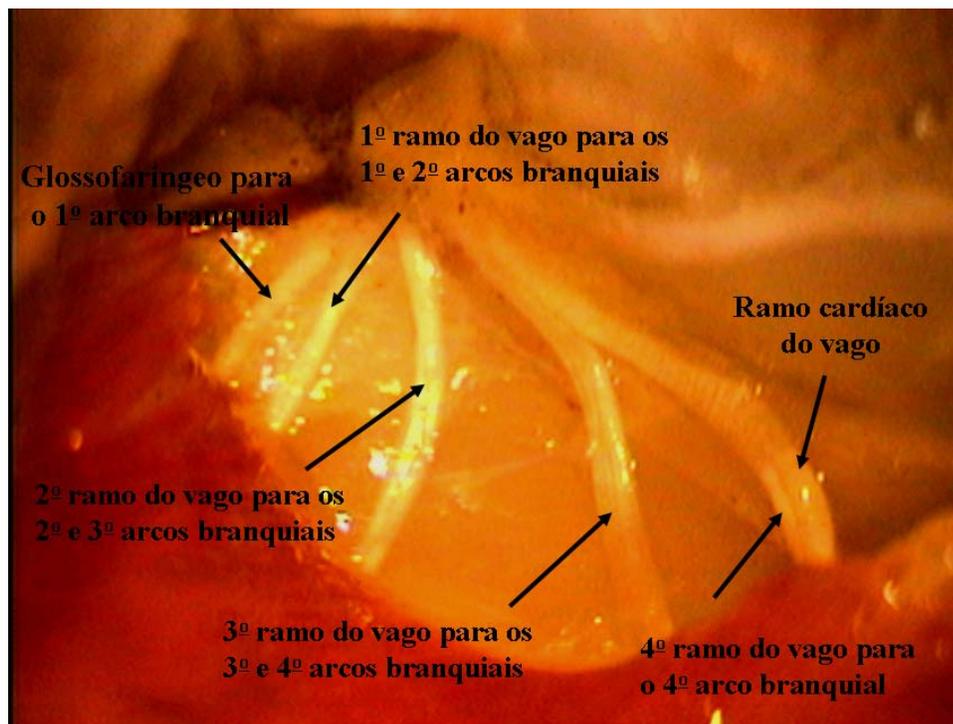


Figura 2: Vista dos ramos dos nervos cranianos IX e X que enervam os arcos branquiais e o ramo cardíaco do vago que foi mantido intacto de trairão, *Hoplias lacerdae*.

Em 9 peixes ($Wt = 312,6 \pm 118,7$ g), o nervo craniano IX foi o único a ser seccionado (grupo IX), e em outros 9 peixes ($Wt = 355,4 \pm 187,9$ g), ambos os nervos IX e ramo pretremático do X foram seccionados, denervando completamente o primeiro arco branquial (grupo G1). Em outro grupo os nervos foram cuidadosamente separados do tecido conjuntivo e seccionados, juntamente com o nervo IX e todos os ramos do nervo X que suprem todos os arcos branquiais (grupo G4, $n = 8$; $Wt = 455,7 \pm 204,5$ g). Os ramos cardíaco e visceral do nervo X permaneceram intactos. O mesmo procedimento foi realizado do outro lado para que todas as denervações fossem bilaterais. O processo de cicatrização em peixes é rápido, tanto que as incisões normalmente se cicatrizaram aproximadamente 24 h após a cirurgia.

O grupo controle ($n = 8$; $Wt = 506,2 \pm 298,2$ g) foi constituído por peixes nos quais os nervos não foram expostos ou cortados. Para se verificar o efeito da cirurgia nas respostas estudadas, outro grupo de peixes ($n = 4$; $Wt = 380,1 \pm 137,7$ g) foi “falsamente” operado (“sham-operated”). Neste grupo, foi feita a incisão no epitélio opercular, e os nervos que suprem as brânquias foram expostos, porém não foram seccionados.

Após a cirurgia, os peixes foram colocados em tubos plásticos individuais com malha nas duas extremidades (câmara de contenção) e transferidos para uma caixa plástica escura coberta com uma tampa. Eles permaneceram nestas condições por 24 h após todos os procedimentos cirúrgicos para recuperação.

2.3. Protocolo experimental

Após a recuperação, as cânulas foram conectadas ao sistema de aquisição de dados descrito acima para os registros dos parâmetros ventilatórios (f_R e V_{amp}) enquanto a cânula da aorta ventral foi conectada ao mesmo sistema para os registros da pressão arterial (Pa) e frequência cardíaca (f_H). As cânulas da aorta ventral e da cavidade bucal também foram utilizadas para administrar soluções de NaCN para a identificação da localização e da orientação dos quimiorreceptores de O_2 . Após a conexão das cânulas, os peixes permaneceram em repouso por aproximadamente 30 minutos para restabelecer a f_R , a f_H e a Pa nos seus valores de repouso.

Passado o período de recuperação, cada peixe foi submetido a uma série de injeções internas (via cânula da aorta ventral) e externas (via cânula bucal) de NaCN para a estimulação dos quimiorreceptores. Injeções de salina (0,9% NaCl; interna) e água (externa) serviram como controles. As injeções foram administradas na seguinte ordem: (1) salina interna; (2) NaCN

interno (0,25 mL de 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); (3) água externa e (4) NaCN externo (1 mL de 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em cada caso, a cânula foi lavada com uma nova solução salina (0,2 mL internamente) ou de água (0,5 mL externamente) para assegurar a completa administração da droga. Após cada injeção, as variáveis cardio-respiratórias foram monitoradas por 5 minutos ou até a ventilação, f_H e Pa retornassem às condições basais. As concentrações de NaCN utilizadas foram obtidas a partir de uma curva dose-resposta previamente determinada para essa espécie.

A hipóxia foi produzida pelo borbulhamento de N_2 na água do tanque experimental. A PO_2 da água foi monitorada continuamente (eletrodos de O_2 FAC 001 e analisador de O_2 FAC 204A) e a tensão de O_2 da água foi gradualmente reduzida de normóxia (140 mmHg) até um nível hipóxico de 10 mmHg passando pelas seguintes tensões: 100, 70, 50, 30 e 20 mmHg. Testes preliminares mostraram que, em média, são necessários $10,5 \pm 3,6$ min para que o PO_2 da água caia para 10 mmHg e $9,4 \pm 2,2$ minutos para que a PO_2 retorne a 140 mmHg novamente.

2.4. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados do grupo controle foram comparados pelo teste de ANOVA “One Way” RM (medida repetida) e comparação múltipla de Dunnett para testar a significâncias das respostas à hipóxia e às injeções internas e externas de NaCN. Para se avaliar os efeitos das respostas das denervação seletivas em diferentes tratamentos, foi empregado o teste ANOVA “Two Way” RM. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Controle e “Sham-operated”

Assim como na maioria das espécies de teleósteos, o grupo controle exibiu uma bradicardia acentuada em exposição à hipóxia, assim como em resposta às injeções de NaCN. Além de ter uma imediata e intensa resposta respiratória quando submetidos a essas situações experimentais, exibindo um aumento tanto na f_R quanto na V_{amp} , o que pode ser observado na Figura 3, que mostra o registro dos parâmetros cardio-respiratórios de um dos animais, o qual representa o padrão exibido pelo grupos intacto.

As respostas cardiovasculares e respiratórias do grupo falso-operado (“sham-operated”) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo intacto, o que pode ser observado na Tabela I, onde são apresentados os valores das variáveis em ambos os grupos, quando submetidos à hipóxia gradual.

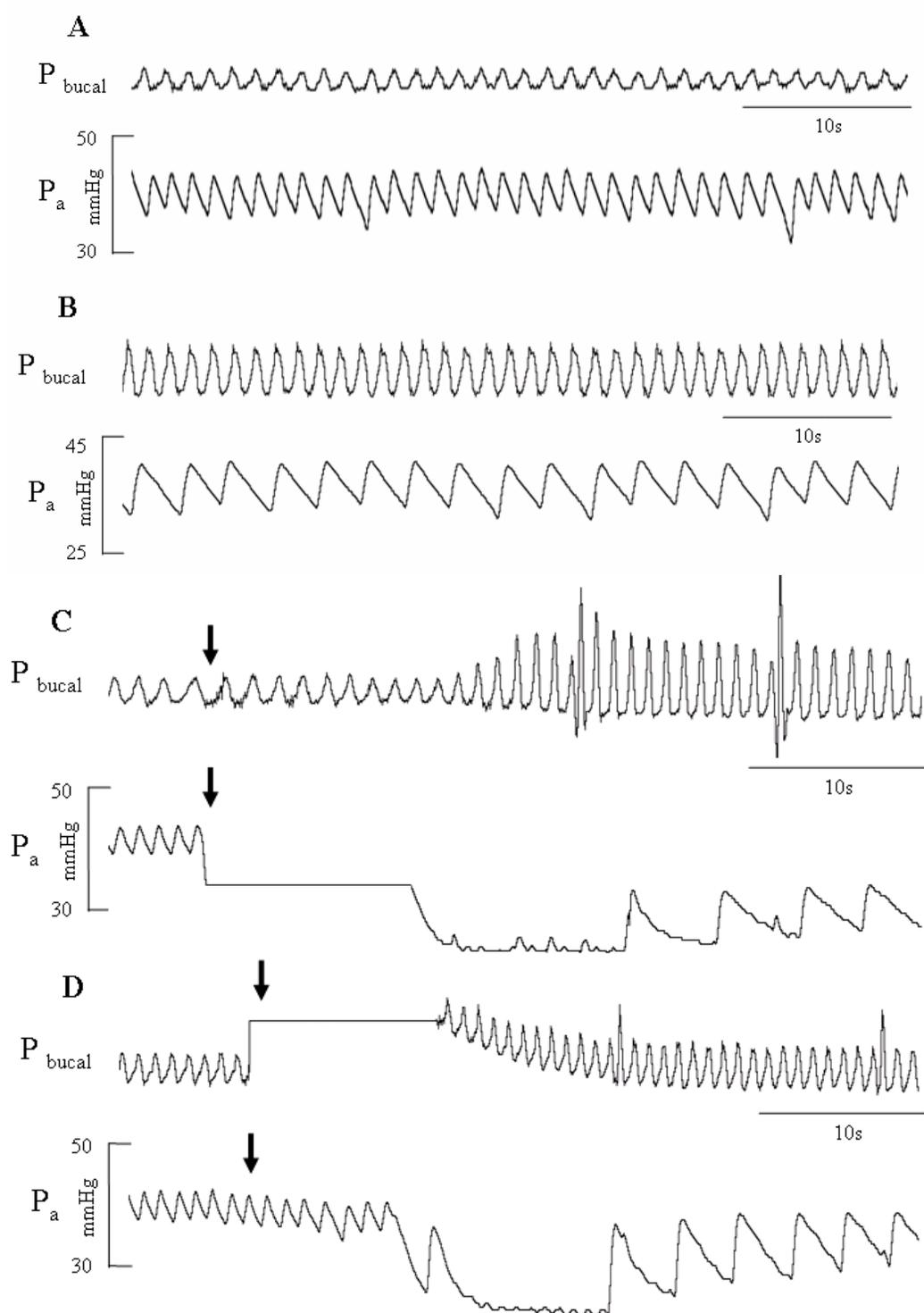


Figura 3: Traçados representativos dos registros da pressão arterial (P_a) e pressão intrabucal (P_{bucal}), evidenciando as alterações dos padrões cardio-respiratórios de *H. lacerdae*, do grupo intacto: A - normóxia ($P = 140$ mmHg); B - hipóxia ($P = 30$ mmHg); C - injeção interna; D - Injeção externa. Setas indicam as injeções de NaCN.

Tabela I: Valores sob condição de normóxia e hipóxia gradual das variáveis cardio-respiratórias em *Hoplias lacerdae*, nos grupos: intacto (n = 8) e “sham-operated” (n = 4). Os valores são médias \pm S.E.M.

| Variáveis | $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ (mmHg) | 140 | 100 | 70 | 50 | 30 | 20 | 10 |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| f_H (bpm) | Controle | 66,3 \pm 3,4 | 58,5 \pm 4,6 | 57,7 \pm 5,6 | 46,5 \pm 6,5 | 41,8 \pm 7,2 | 37,5 \pm 6,2 | 36,3 \pm 5,8 |
| | Sham | 61,3 \pm 5,5 | 57,5 \pm 4,2 | 55,1 \pm 6,8 | 52,3 \pm 6,1 | 41,6 \pm 7,8 | 38,2 \pm 9,0 | 28,9 \pm 8,8 |
| Pa (mmHg) | Controle | 37,1 \pm 2,0 | 35,9 \pm 1,8 | 35,4 \pm 2,2 | 32,2 \pm 1,4 | 31,6 \pm 1,7 | 30,6 \pm 2,2 | 29,5 \pm 1,8 |
| | Sham | 33,3 \pm 4,1 | 32,1 \pm 2,8 | 32,6 \pm 2,2 | 33,2 \pm 2,5 | 32,7 \pm 3,5 | 32,5 \pm 3,8 | 28,2 \pm 3,5 |
| f_R (Resp.min ⁻¹) | Controle | 59,2 \pm 3,8 | 60,1 \pm 3,6 | 63,6 \pm 4,2 | 62,5 \pm 4,1 | 64,9 \pm 4,6 | 66,5 \pm 5,3 | 64,8 \pm 5,6 |
| | Sham | 60,7 \pm 6,4 | 59,6 \pm 4,8 | 61,8 \pm 5,1 | 63,2 \pm 3,6 | 64,1 \pm 4,4 | 61,8 \pm 3,8 | 55,3 \pm 4,1 |
| V_{amp} (% alteração) | Controle | 100,0 | 104,3 \pm 8,2 | 127,0 \pm 7,0 | 134,9 \pm 15,7 | 127,3 \pm 11,4 | 145,6 \pm 12,3 | 134,8 \pm 12,6 |
| | Sham | 100,0 | 102,5 \pm 16,2 | 141,2 \pm 19,7 | 136,0 \pm 17,1 | 168,8 \pm 38,7 | 159,0 \pm 21,3 | 153,8 \pm 42,8 |

3.2. Respostas Cardiovasculares

A denervação bilateral dos ramos nervosos branquiais causou elevação nos valores de repouso da f_H , que foi significativa nos grupos G1 e G4, em relação ao grupo controle, como pode ser observado na Tabela II. Apesar do aumento nos valores de f_H de repouso com a denervação branquial progressiva, houve uma tendência à diminuição da Pa, que foi significativa apenas no grupo com o primeiro arco branquial denervado (G1) (Tabela II).

O grupo controle (intacto) respondeu às injeções internas e externas de NaCN e à hipóxia progressiva com diminuição na f_H (Figuras 4 e 5). A Pa somente apresentou um decréscimo significativo após ambas as injeções de NaCN, mas não em resposta à hipóxia (Figura 7).

A denervação dos grupos IX e G1 induziram uma bradicardia significativa em relação aos valores normóxicos após as injeções internas e externas de NaCN. No G4 houve uma bradicardia significativa entre 50 e 60 s após a injeção interna de NaCN quando comparada ao valor pré-injeção. A leve alteração na f_H que ocorreu somente após 50 s das injeções, não é suficiente para comprovar a existência de quimiorreceptores de O_2 internos. Desta forma, pode-se considerar que a denervação total das brânquias (G4) aboliu esta resposta, sendo possível afirmar que a completa denervação branquial abole a resposta cardíaca aos estímulos internos e externos do NaCN.

Os grupos denervados tem suas f_H significativamente diferentes do grupo controle após às injeções externas de NaCN, porém não foram observadas diferenças significativas na f_H do grupo IX em relação ao intacto após as injeções internas. Assim o NaCN injetado internamente induziu uma bradicardia no grupo intacto que foi significativa quando comparada aos grupos G1 e G4 (Figura 4). A injeção interna de NaCN acarretou uma bradicardia mais persistente do que a injeção externa.

Em hipóxia, os peixes intactos apresentaram uma bradicardia significativa em relação aos valores normóxicos (de $66,3 \pm 3,4$ para $36,3 \pm 5,8$ bpm) somente em $P_{\text{insp}}\text{O}_2$ próximas à tensão crítica de O_2 dessa espécie ($P_{\text{cO}_2} = 35$ mmHg; RANTIN et al., 1993) até a tensão mais baixa (10 mmHg), como pode-se verificar na Figura 5. Tanto a denervação parcial do primeiro par de arcos branquiais (IX) como a completa denervação do mesmo (G1) não aboliram totalmente a bradicardia hipóxica, não diferindo significativamente do grupo intacto. Entretanto, a completa secção dos ramos dos nervos cranianos IX e X (G4) aboliu este efeito em relação aos valores em normóxia, quando comparados ao grupo intacto (Figura 5).

Tabela II: Valores de repouso das variáveis cardio-respiratórias de *Hoplias lacerdae*, nos grupos: intacto e denervados (IX, G1 e G4). Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao grupo intacto (controle), com $P < 0,05$. Os valores são médias \pm S.E.M.

| Variáveis | Controle (n = 8) | IX (n = 9) | G1 (n = 9) | G4 (n = 8) |
|---------------------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| f_H (bpm) | 50,5 \pm 5,7 | 61,9 \pm 3,4 | 69,0 \pm 3,4 * | 74,3 \pm 3,3 * |
| Pa (mmHg) | 38,0 \pm 1,5 | 32,0 \pm 1,5 | 31,2 \pm 2,3 * | 34,5 \pm 1,8 |
| f_R (Resp min ⁻¹) | 55,0 \pm 3,4 | 58,9 \pm 2,3 | 62,4 \pm 4,3 | 59,8 \pm 3,4 |

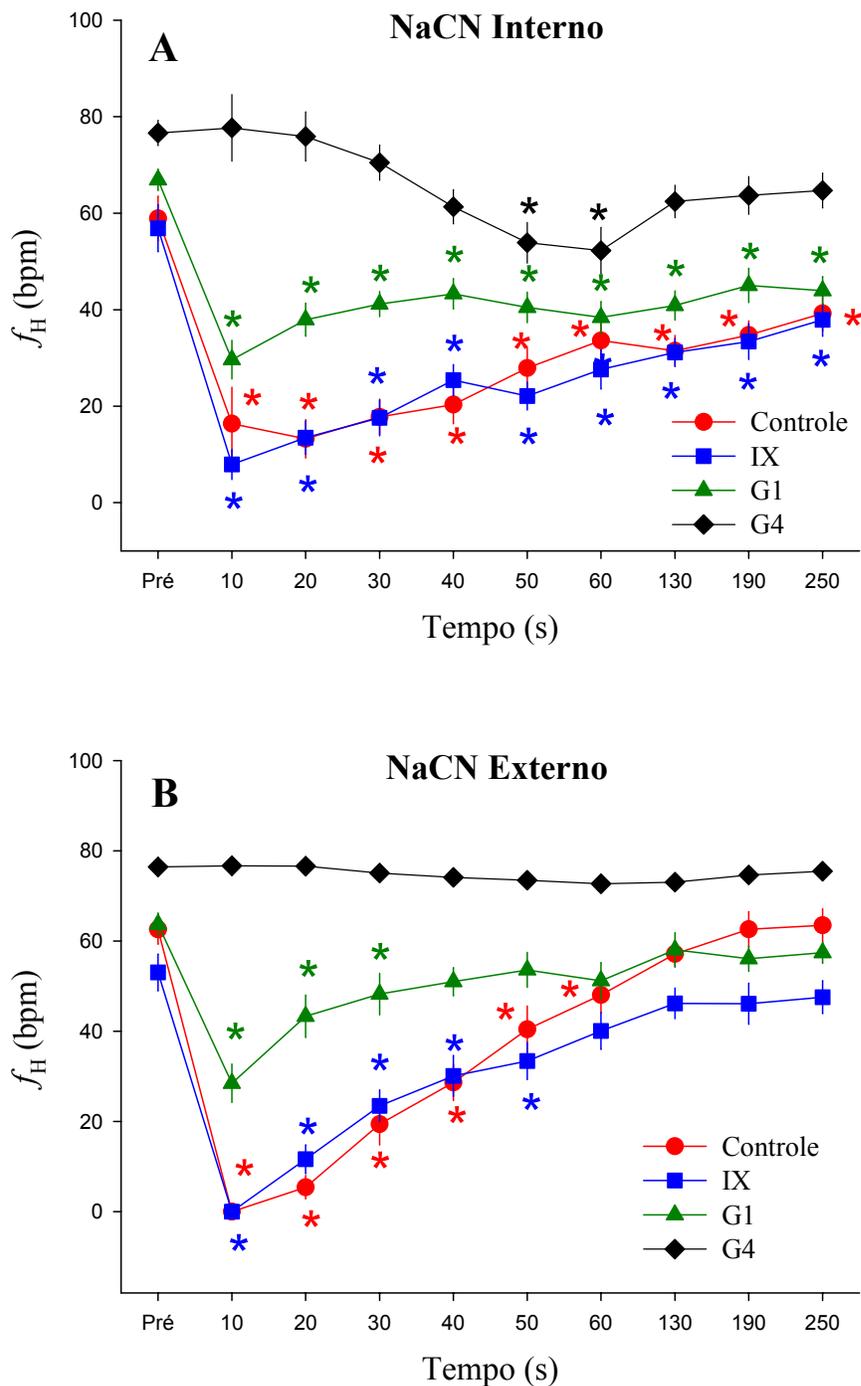


Figura 4: Respostas cardíacas (f_H) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). A injeção controle de água na boca não apresentou diferenças significativas na f_H , não sendo mostrada no gráfico para clareza na visualização dos dados. Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

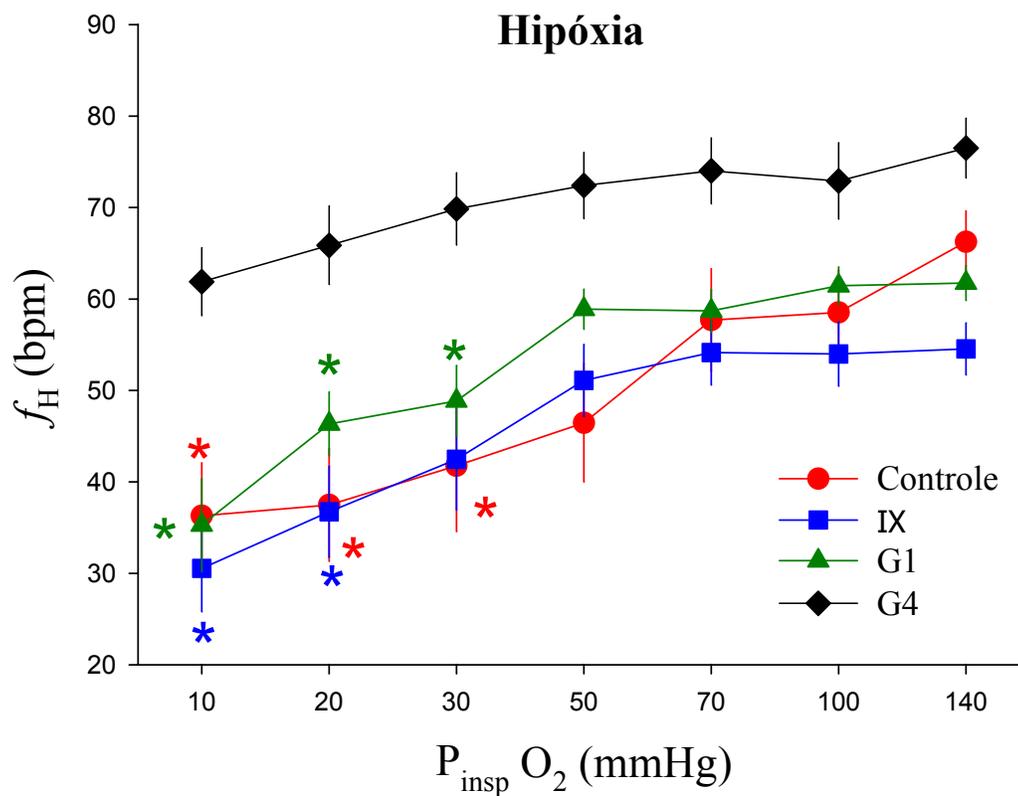


Figura 5: Frequência cardíaca de *H. lacerdae* em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores em normóxia. Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

O NaCN injetado tanto interna, quanto externamente, provocou uma diminuição significativa na Pa do grupo intacto em relação aos valores de repouso. Essa diminuição retornou aos valores iniciais após aproximadamente 20 s seguidos às injeções (Figura 6). A resposta do grupo IX foi semelhante ao do controle, porém a denervação completa do primeiro arco branquial, assim como a de todos os arcos (G1 e G4) aboliu a diminuição da Pa, após ambas as injeções internas e externas, como pode ser observado na Figura 6.

Os trairões do grupo intacto apresentaram uma tendência à diminuição da Pa conforme a hipóxia foi tornando-se mais severa. Porém, estas alterações não foram significativas, partindo de $37,1 \pm 2$ mmHg ($P_{\text{insp}}\text{O}_2 = 140$ mmHg) até $29,5 \pm 1,8$ mmHg (na $P_{\text{insp}}\text{O}_2 = 10$ mmHg). Nos grupos denervados nem mesmo esta tendência à diminuição ocorreu e a Pa não sofreu nenhuma alteração quando os peixes foram submetidos à hipóxia gradual (Figura 7). Em todos os grupos, as injeções controle internas e externas, (salina e água, respectivamente) não causaram alterações nos parâmetros cardíacos.

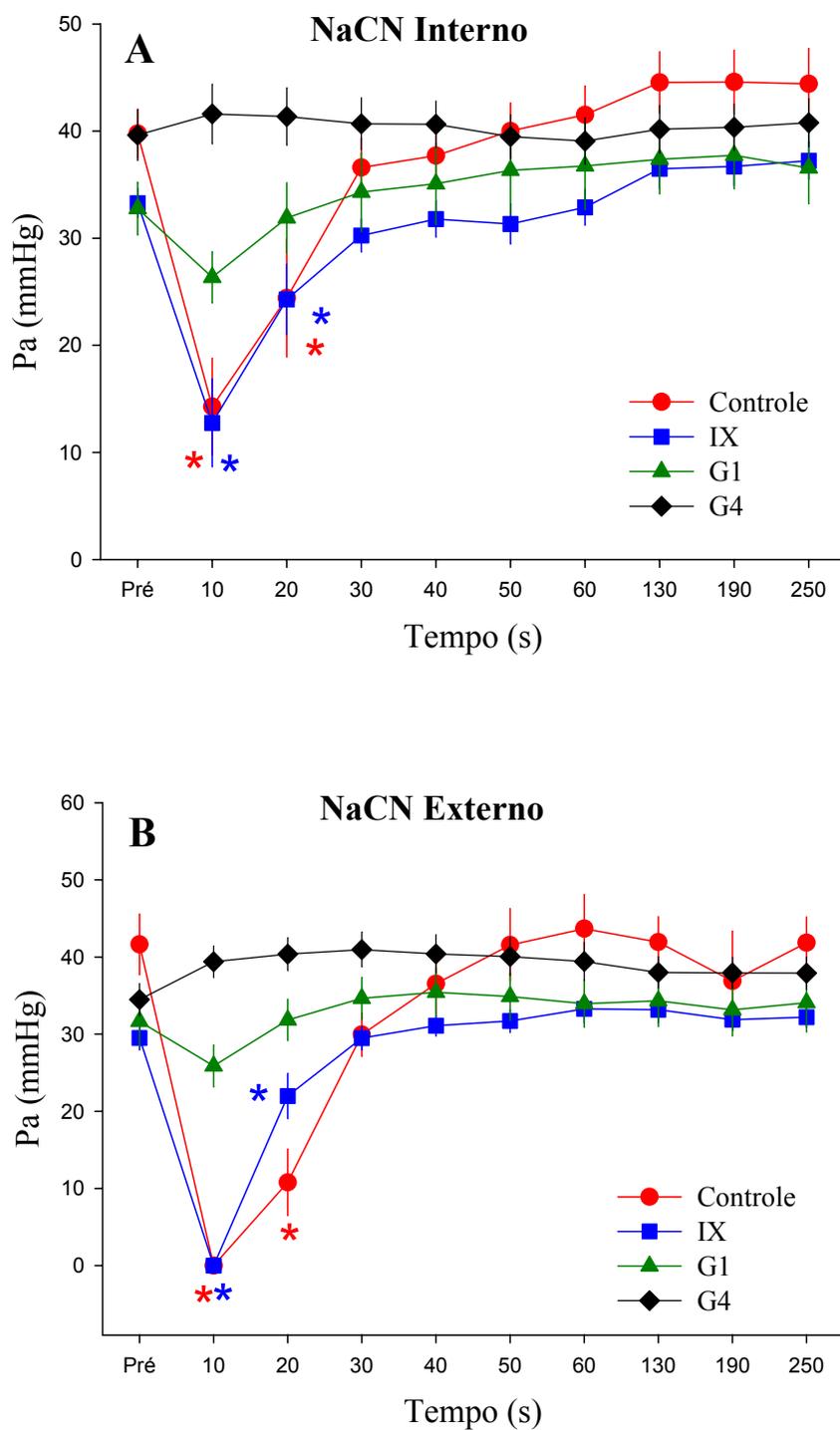


Figura 6: Pressão arterial de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

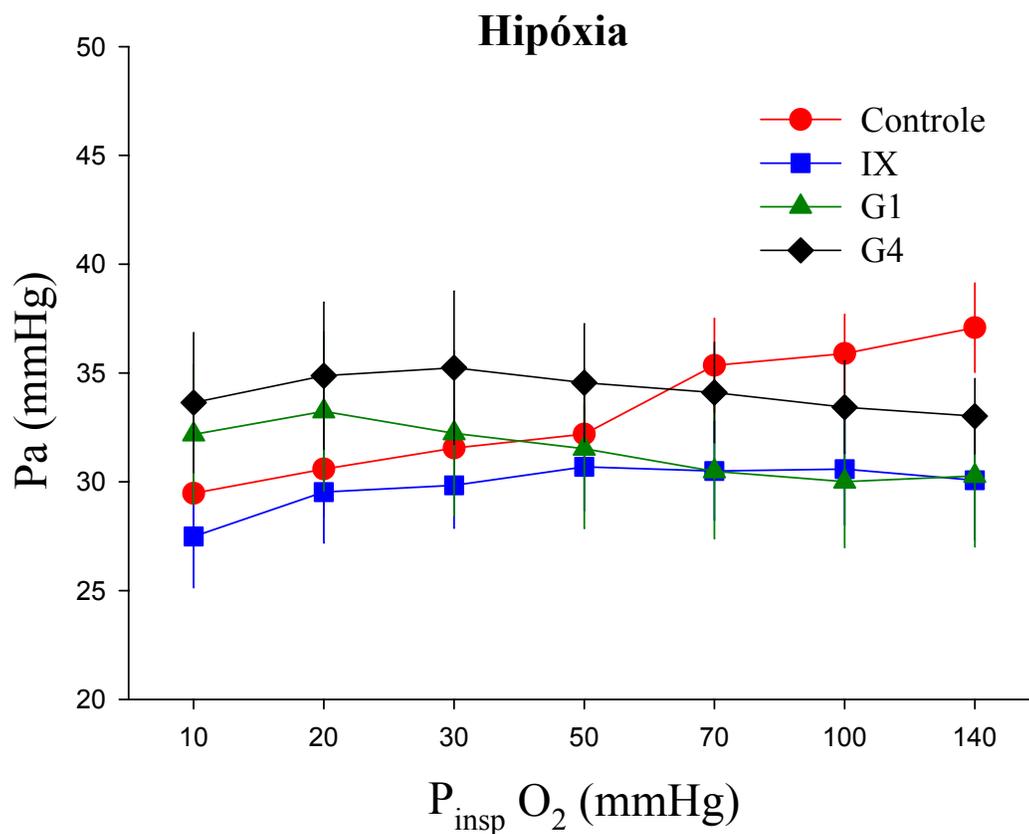


Figura 7: Pressão arterial de trairão, *H. lacerdae*, em relação à hipóxia gradual. Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

3.3. Respostas Respiratórias

As variáveis respiratórias em repouso não sofreram alterações significativas após qualquer uma das denervações branquiais seletivas (Tabela II).

Os peixes intactos responderam às injeções internas de NaCN com um aumento significativo da f_R , da V_{amp} e, conseqüentemente, da V_{tot} (Figuras 8, 10 e 12), sendo que estas respostas foram relativamente breves, voltando aos valores iniciais nos primeiros 30 s após as injeções. Assim, como nas variáveis cardíacas, a f_R não apresentou diferenças significativas em relação às injeções controles de salina e água.

Por outro lado, a injeção interna de salina (controle) teve um efeito sobre a V_{amp} , a qual apresentou um aumento significativo nos primeiros 10 s após a injeção, e conseqüentemente, no V_{tot} . Devido a este aumento, a injeção de salina controle foi testada contra as injeções internas de NaCN, utilizando o teste estatístico “One Way” ANOVA. As injeções internas de NaCN causaram um aumento significativo na V_{amp} , e conseqüentemente no V_{tot} , em relação ao controle salina ($P = 0,019$). A injeção externa de NaCN causou um aumento significativo da V_{amp} , e conseqüentemente da V_{tot} .

Os peixes que tiveram apenas o nervo craniano IX seccionado bilateralmente (grupo IX) apresentaram uma f_R semelhante à do grupo intacto após as injeções internas de NaCN, como pode ser observado na Figura 8. Porém, foi observado um aumento significativo na f_R destes animais após as injeções externas de NaCN, o que não ocorreu em nenhum outro grupo (Intacto, G1 ou G4). O mesmo ocorre para a V_{amp} , e conseqüentemente, para a V_{tot} (Figura 8).

A completa denervação do primeiro arco branquial (G1) aboliu a resposta da f_R às injeções internas de NaCN (Figura 8), porém não eliminou as respostas da V_{amp} após as injeções

internas e externas de NaCN (Figura 10), assim como da V_{tot} (Figura 12), as quais só são abolidas com a completa denervação dos quatro arcos branquiais (G4).

Em resposta à hipóxia gradual, o grupo intacto apresentou um aumento significativo na f_R nas tensões de 10, 20 e 30 mmHg, sendo o valor em normóxia de $50,6 \pm 3,8$ resp.min⁻¹ e na tensão mais baixa de $74,9 \pm 3,7$ Resp.min⁻¹ (hipóxia). O mesmo ocorreu com os grupos parcialmente denervados IX e G1 (Figura 9). O grupo com todos os arcos branquiais completamente denervados (G4) não apresentou aumento na f_R , ao contrário, houve uma tendência a diminuição neste parâmetro, como pode ser constatado na mesma figura, podendo-se então considerar que esta resposta é abolida com a completa denervação branquial.

Houve aumentos significativos na V_{amp} no grupo intacto nas últimas $P_{insp}O_2 = 10$ e 20 mmHg (Figura 11), enquanto a V_{tot} apresentou aumentos nas $P_{insp}O_2 = 10, 20$ e 30 mmHg (Figura 13), em relação aos valores de normóxia. O grupo IX apresentou um aumento significativo na V_{amp} , sob condições de hipóxia, em relação ao grupo controle, sendo que esta resposta teve início em $P_{insp}O_2 = 50$ mmHg. O mesmo ocorreu para a V_{tot} (Figuras 11 e 13). Sob condições de hipóxia gradual, a V_{amp} no grupo G1 também apresentou um aumento significativo apenas na $P_{insp}O_2 = 20$ mmHg, e a V_{tot} nas $P_{insp}O_2 = 20$ e 30 mmHg em relação ao grupo controle. Porém, nos animais do G4 pode-se afirmar que esta resposta foi completamente abolida, tendendo a uma diminuição tanto na V_{amp} quanto na V_{tot} .

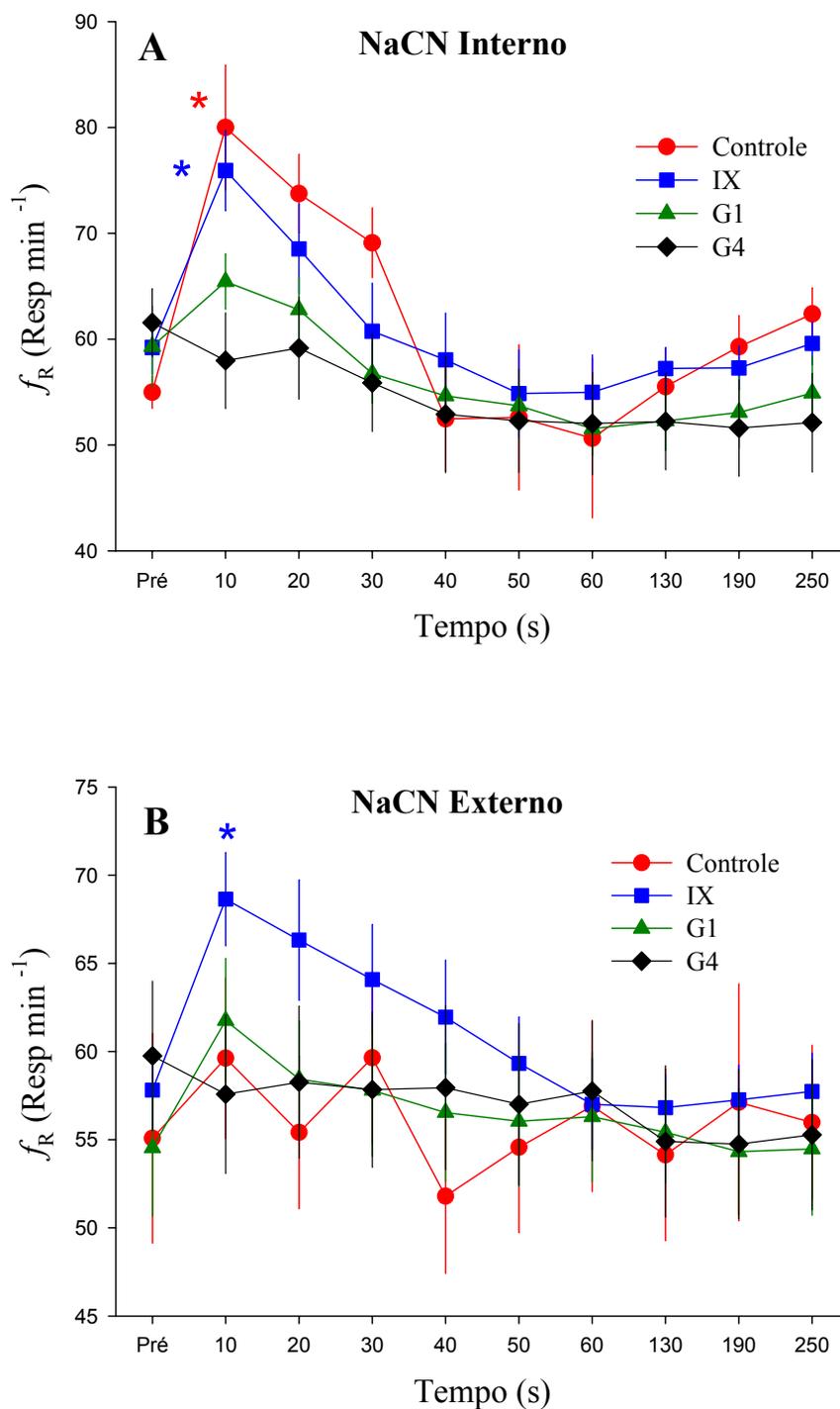


Figura 8: Respostas respiratórias (f_R) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

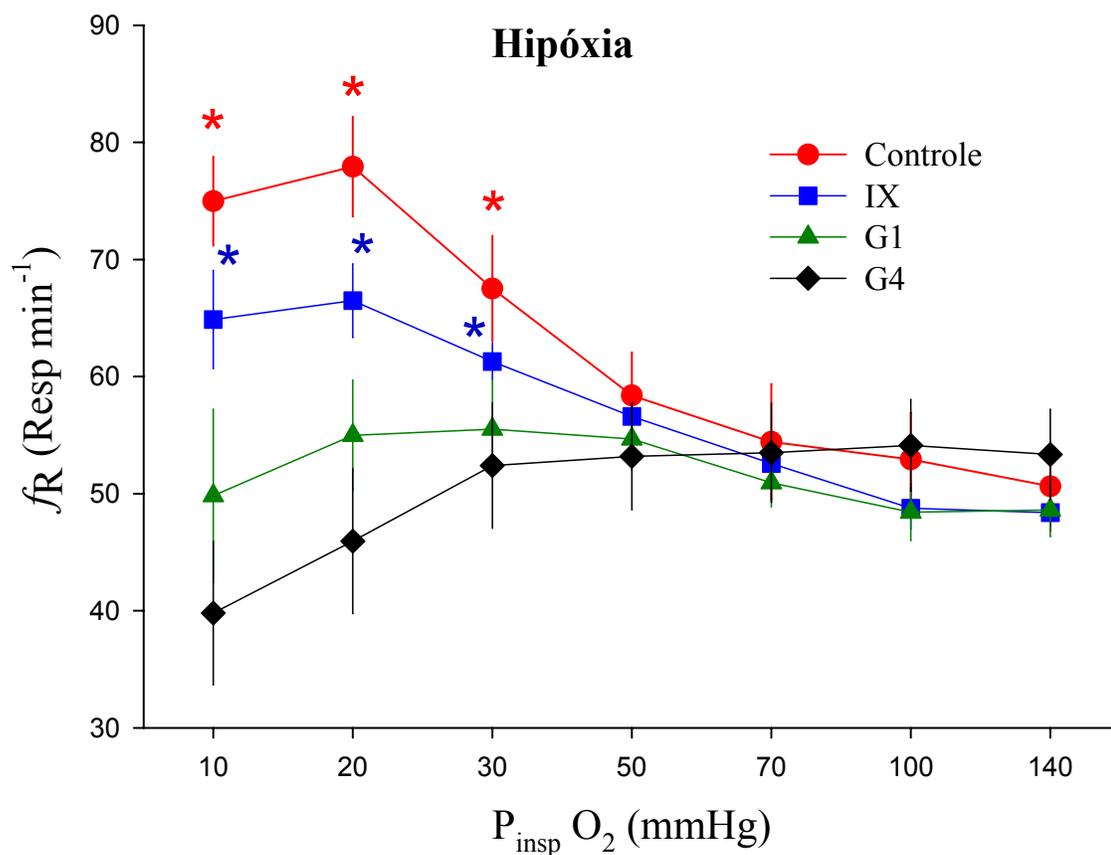


Figura 9: Freqüência respiratória (f_R) de *H. lacerdae* em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (normóxia). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle ($n = 8$), IX ($n = 9$), G1 ($n = 9$) e G4 ($n = 8$).

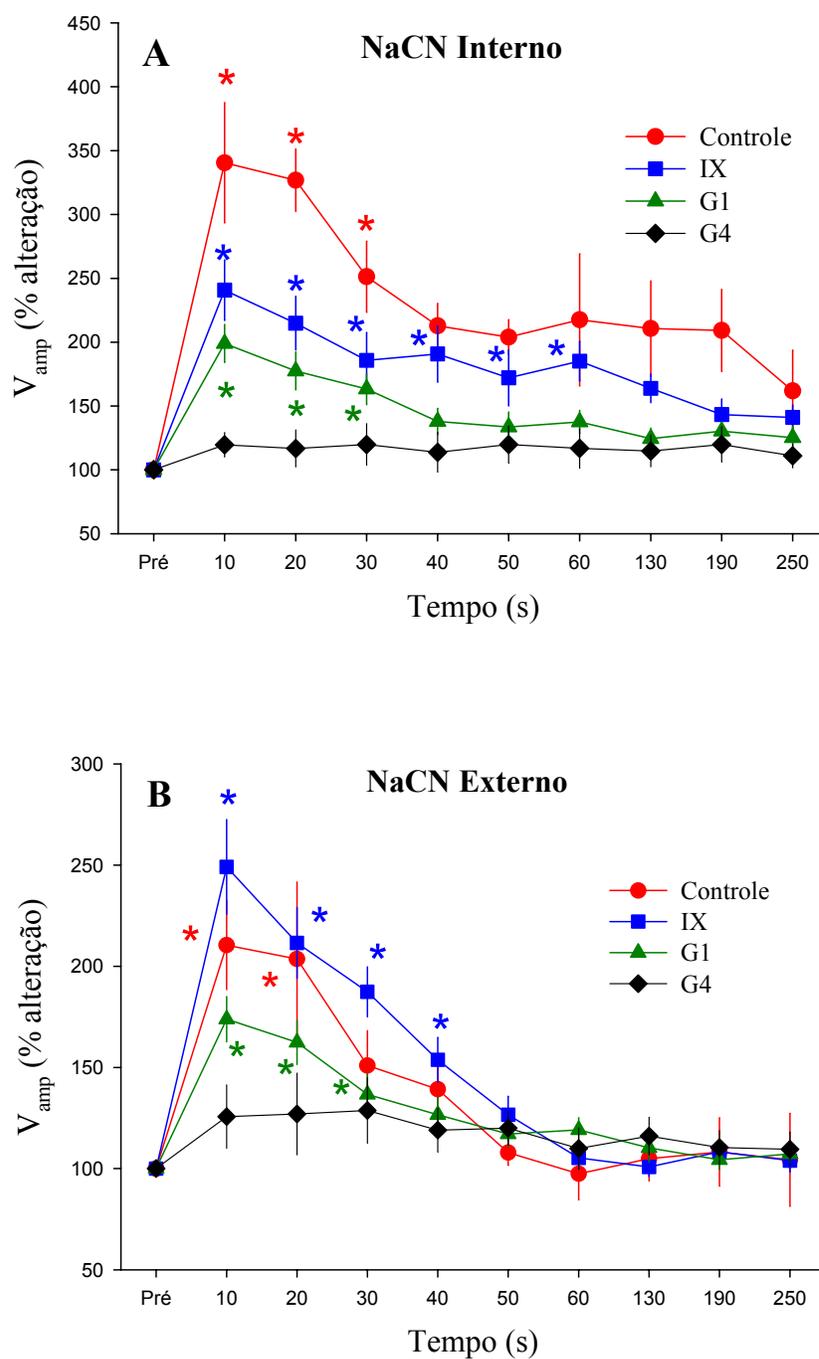


Figura 10: Respostas respiratórias (V_{amp}) de trairão, *H. lacertae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

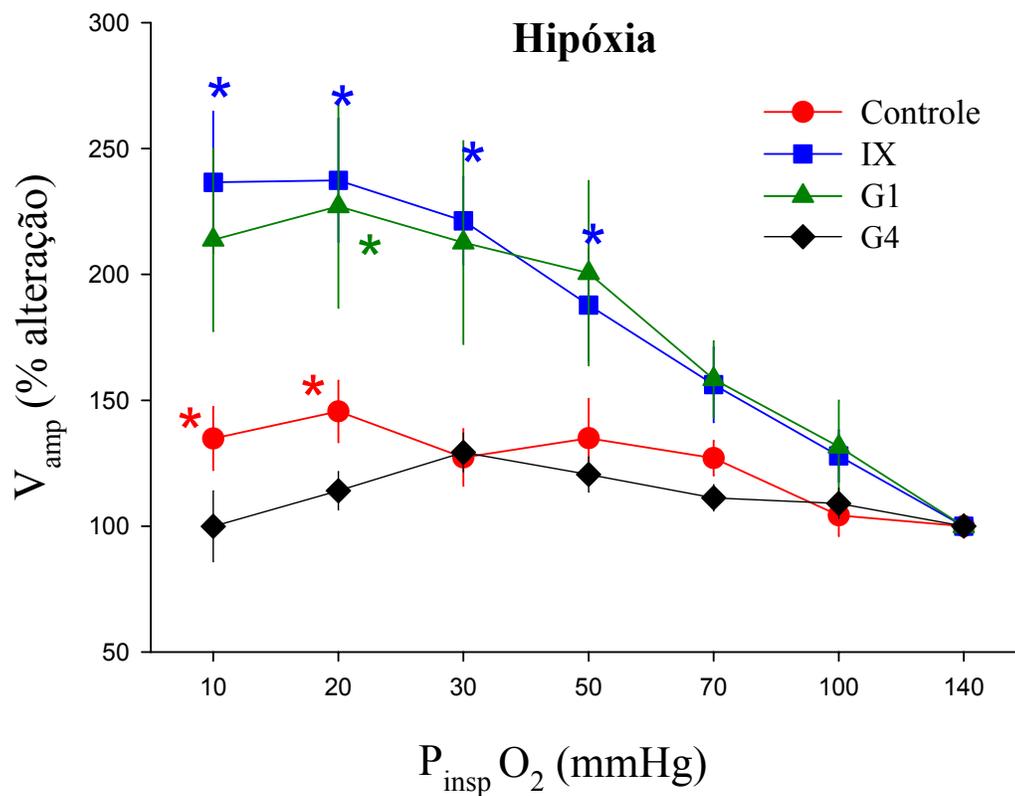


Figura 11: Amplitude ventilatória de trairão, *H. lacerdae*, em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (normóxia). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

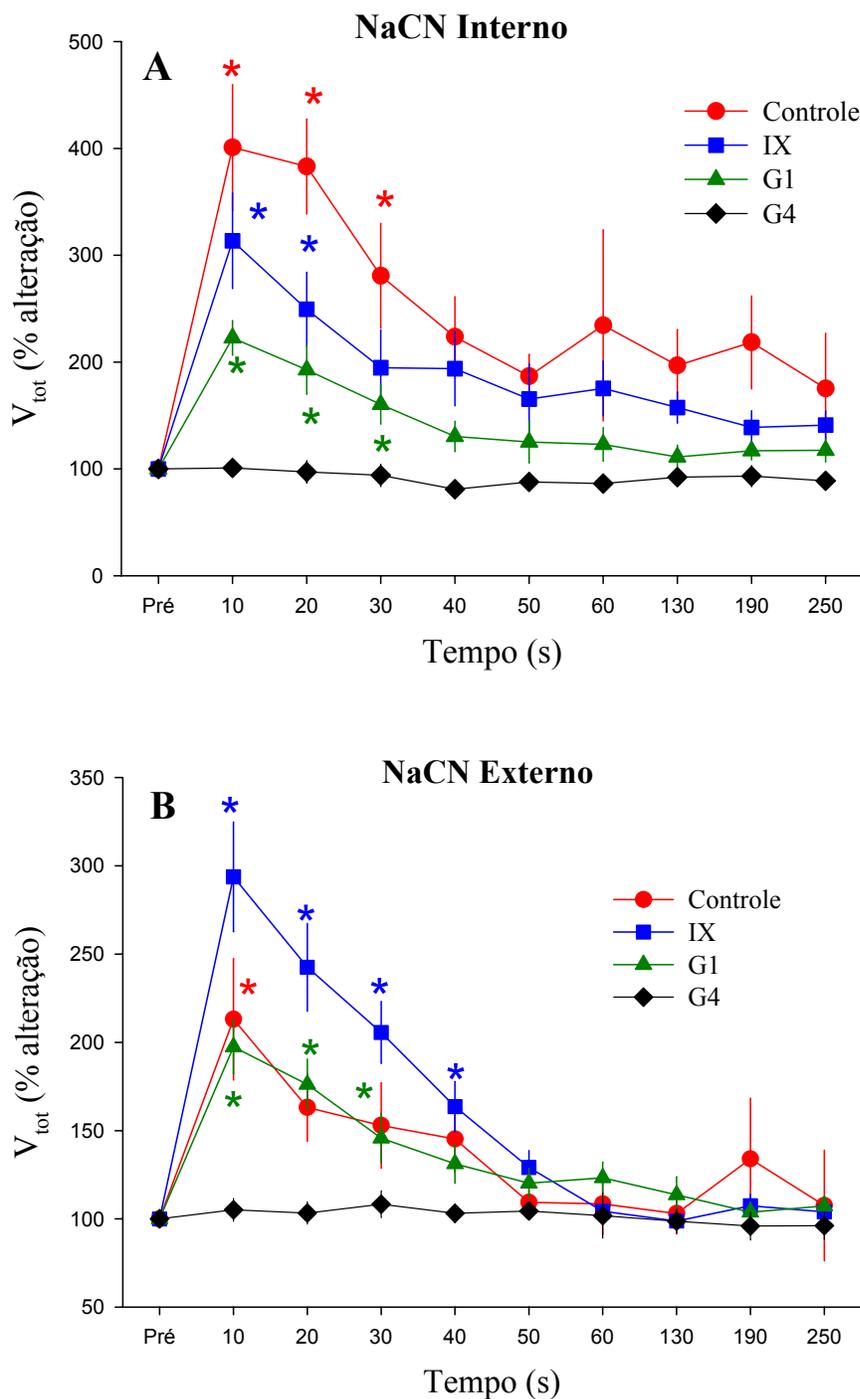


Figura 12: Respostas respiratórias (V_{tot}) de trairão, *H. lacerdae*, após injeções internas (A) e externas (B) de NaCN. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (pré-injeção). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

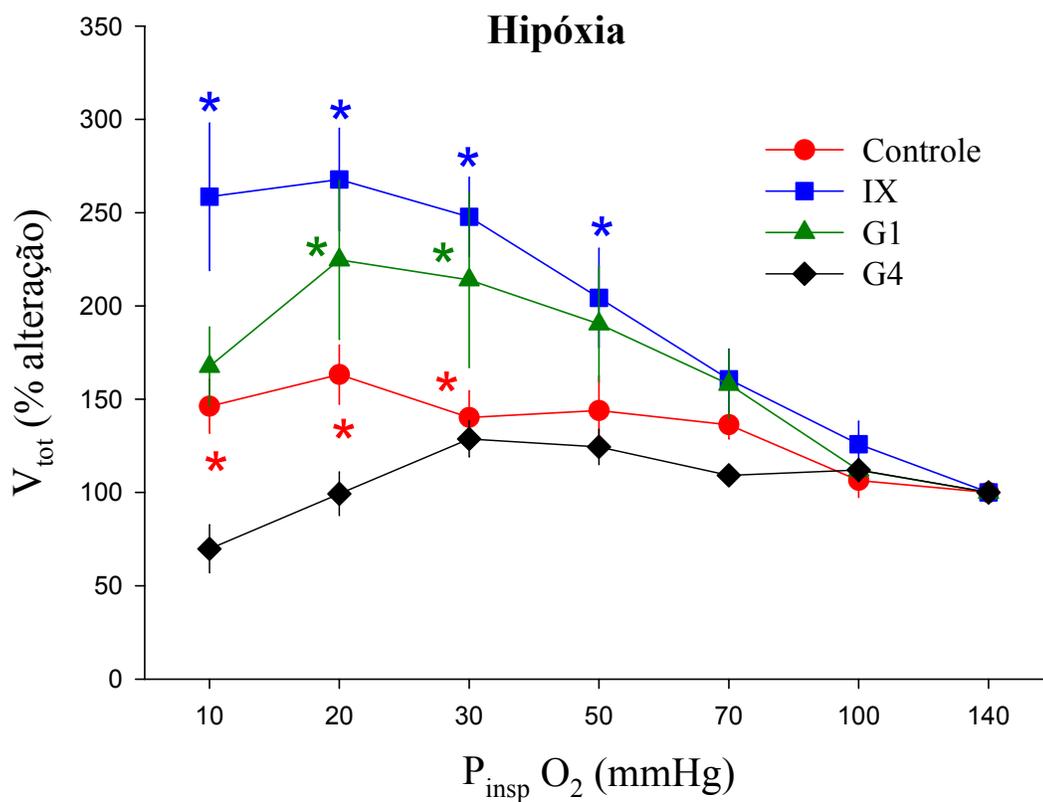


Figura 13: Ventilação total de trairão, *H. lacerdae*, em relação à hipóxia gradual. Asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais (normóxia). Os pontos são médias \pm S.E.M dos grupos controle (n = 8), IX (n = 9), G1 (n = 9) e G4 (n = 8).

4. Discussão

4.1. Respostas Cardiovasculares

Em trairão, assim como em traíra (ver SUNDIN et al., 1999), ocorreu um aumento significativo nos valores de repouso da f_H em correspondência a um maior grau de denervação, nos grupos experimentais G1 e G4. Sabe-se que as denervações realizadas não removem somente as aferências, mas também as eferências nervosas dos arcos branquiais. Nesse caso é difícil determinar se o aumento dos valores de repouso da f_H está ligado à diminuição do controle da resistência vascular branquial ou a ausência de parte das informações sensoriais das brânquias que iriam influenciar as modulações da f_H , ou ambas (LOPES, 2003).

A diminuição dos valores de repouso da Pa foi significativa apenas em G1, sendo que G4 apresentou apenas uma tendência a esse aumento. Segundo BURLESON et al. (1990), a denervação apresenta efeitos sobre a ventilação e o ritmo cardíaco. Contudo, pouco se conhece sobre as conseqüências da secção dos nervos na Pa de peixes.

Em teleósteos de águas temperadas, a bradicardia em resposta à hipóxia ambiental parece ser iniciada pela ativação de receptores branquiais orientados externamente (SAUNDERS & SUTTERLIN, 1971; SMITH & JONES, 1978; SMATRESK et al., 1986; MCKENZIE et al., 1991; BURLESON & MILSOM, 1993), enquanto que em traíra, espécie neotropical e tolerante a hipóxia, esta bradicardia é primariamente reflexa, originada na ativação dos receptores branquiais orientados internamente (SUNDIN et al., 1999). Na literatura há uma tendência em se afirmar que espécies tolerantes à hipóxia respondem primariamente à hipoxemia, enquanto que espécies menos tolerantes respondem imediatamente à hipóxia aquática (SUNDIN et al., 1999).

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que as injeções internas e externas de NaCN resultam em bradicardia, indicando a presença de populações de quimiorreceptores monitorando tanto o O₂ da água quanto do sangue, orientados tanto interna quanto externamente. Este padrão de resposta também foi observado em espécies tolerantes à hipóxia, como o tambaqui (SUNDIN et al., 2000), o pacu (LEITE et al., 2007) e o eritrínideo de respiração aérea facultativa, jeju (LOPES, 2003) (ver Tabela III). Desta forma, a bradicardia também é iniciada pela ativação de receptores de O₂ que percebem a falta de O₂ tanto na água inspirada, quanto no sangue, demonstrando a eficiência fisiológica deste mecanismo para a compensação da falta de oxigênio no ambiente, na tentativa de manter os níveis de O₂ sanguíneo constantes.

De acordo com BURLESON et al. (1992), a maioria dos teleósteos de respiração exclusivamente aquática apresenta quimiorreceptores de O₂ envolvidos nas respostas cardíacas que são orientados externamente, no primeiro par de arcos branquiais, como previamente determinado em *Hemipterus americanus* (SAUNDERS & SUTTERLIN, 1971); *Onchorhynchus sp* (DAXBOECK & HOLETON, 1978; SMITH & JONES, 1978); *Gadus morhua* (FRITSCHÉ & NILSSON, 1989) e, posteriormente, *Ascipenser naccarii* (MCKENZIE et al., 1995).

No elasmobrânquio *Scyliorhinus canicula* (dogfish) (BARRET & TAYLOR, 1984), foram observados receptores voltados para o meio externo, porém estes são distribuídos na cavidade orobranquial. Assim como *Scyliorhinus canicula*, em *Amia calva*, peixe de respiração bimodal, a bradicardia reflexa também é controlada por grupos de receptores orientados externamente, porém, distribuídos em todos os arcos branquiais e na pseudobrânquia (MCKENZIE et al., 1991). Diferentemente, SUNDIN et al. (1999) demonstraram que a traíra

apresenta esses quimiorreceptores voltados para o monitoramento do O_2 sanguíneo (ver Tabela III).

A hipóxia gradual induziu a bradicardia em trairão até que a $P_{\text{insp}}O_2$ atingisse níveis próximos à tensão crítica de O_2 (P_{cO_2}) desta espécie (~ 35 mmHg), ocorrendo uma pronunciada diminuição na f_H abaixo desta tensão (RANTIN et al., 1993). Respostas cardíacas semelhantes ocorrem em traíra (SUNDIN et al., 1999), jeju (LOPES, 2003), pacu (LEITE et al., 2007) e tambaqui (SUNDIN et al., 2000). Os valores de f_H descritos no presente trabalho se assemelham aos encontrados por RANTIN et al. (1993), na mesma espécie (trairão), submetida à hipóxia. A f_H é um sensível indicador de estresse em peixes (CAMPBELL et al., 2004), e ao se comparar os valores obtidos no presente trabalho com aqueles obtidos por RANTIN et al. (1993) é possível afirmar que os animais estavam em boas condições para a realização deste experimento.

A denervação parcial e completa do primeiro par de arcos branquiais (IX e G1) produziu respostas semelhantes às do grupo intacto. Porém, a completa denervação branquial (G4) aboliu completamente a bradicardia hipóxica. Portanto, nossos dados mostraram que os quimiorreceptores de O_2 envolvidos no controle da f_H , em resposta às alterações da $P_{\text{insp}}O_2$ e da PO_2 sanguínea, estão distribuídos por todos os arcos branquiais, não havendo populações de receptores de O_2 extrabranquiais envolvidos na modulação desta função, o que é aceitável, considerando-se que esta espécie habita águas bem oxigenadas, não necessitando de populações de receptores fora do aparato branquial para auxiliar no controle desta função, que se mostrou tão eficiente nesta espécie. Resultado semelhante foi encontrado por LEITE et al. (2007), em pacu, onde a completa denervação branquial aboliu a resposta cardíaca.

De forma semelhante à *Hoplias lacerdae*, outras espécies apresentam quimiorreceptores de O_2 envolvidos no controle das respostas cardíacas distribuídos por todos os arcos branquiais,

como em *Ictalurus punctatus* (channel catfish), no qual estes receptores estão localizados nos três primeiros pares de arcos branquiais (BURLESON & SMATRESK, 1990a). No elasmobrânquio *Scyliorhinus canicula* os receptores de O₂ que medeiam estas repostas estão localizados em todos os arcos branquiais, assim como na cavidade orobranquial (BUTLER et al., 1977), sendo o mesmo observado em tambaqui (SUNDIN et al., 2000).

Assim como em traíra, *Hoplias malabaricus* (ver SUNDIN et al., 1999), espécie filogeneticamente próxima ao trairão, *Hoplias lacerdae*, há muitos teleósteos de respiração exclusivamente aquática, talvez a maioria, que apresentam quimiorreceptores de O₂ envolvidos nas repostas cardíacas localizados no primeiro par de arcos branquiais. A traíra, além deste sítio de quimiorrecepção, possui também receptores ligados ao controle desta função localizados extrabranquialmente. O fato de possuir receptores apenas no primeiro arco branquial já foi determinado em inúmeras espécies além de *H. malabaricus*, como truta arco-iris, *Onchorhynchus mykiss* (DAXBOECK & HOLETON, 1978), bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua* (FRITSCHÉ & NILSSON, 1989), esturjão do Ártico, *Ascipenser naccarii* (MCKENZIE et al., 1995) e salmão, *Oncorhynchus kisutch* (SMITH & DAVIE, 1984; SUNDIN et al., 2000; MILSOM & BRILL, 1986).

Tais diferenças interespecíficas não são de fácil interpretação. Porém, a atual falta de padrão de ocorrência e distribuição dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos nos reflexos cardíacos não sustenta a hipótese de que espécies mais tolerantes à hipóxia possuiriam quimiorreceptores de O₂ orientados internamente, monitorando a PO₂ sangüínea (hipoxemia), enquanto que as espécies menos tolerantes possuiriam quimiorreceptores de O₂ orientados externamente, monitorando a PO₂ da água inspirada (LEITE, 2003).

Os efeitos da hipóxia sobre a pressão sanguínea determinam uma grande variedade de respostas. Como resultado da bradicardia hipóxica, alguns peixes teleósteos exibem hipertensão (FRITSCHÉ & NILSSON, 1989), ou pressão sanguínea constante (FRITSCHÉ & NILSSON, 1993) ou hipotensão (SUNDIN et al., 1999). Segundo FRITSCHÉ & NILSSON (1989), a hipóxia comumente determina hipertensão em teleósteos. Este evento tem, supostamente, ligação direta com o aumento do débito cardíaco durante a bradicardia e/ou com o aumento da resistência periférica desencadeados pelo mesmo estímulo (MILSOM et al., 1999). Esta hipertensão foi observada em *Onchorhynchus mykiss* (HOLETON & RANDALL, 1967; SUNDIN & NILSSON, 1997), *Ictalurus punctatus* (MILSOM et al., 1999), *Amia calva* (MCKENZIE et al., 1991), *Hemitripterus americanus* (SAUNDERS & SUTTERLIN, 1971; SUNDIN et al., 2000) e *Gadus morhua* (FRITSCHÉ & NILSSON, 1989; SUNDIN, 1995).

Contudo, em outras espécies de peixes ocorre uma diminuição da Pa em resposta à diminuição da $P_{\text{insp}}\text{O}_2$, como em *Scyliorhinus canicula* (SATCHELL, 1961; BUTLER & TAYLOR, 1971; BUTLER et al., 1977; MILSOM et al., 1999), *Acipenser naccarri* (MCKENZIE et al., 1995) e *H. malabaricus* (SUNDIN et al., 1999). Os autores atribuíram à acentuada bradicardia hipóxica a causa da hipotensão nessas espécies.

O trairão apresentou Pa relativamente constante em resposta a hipóxia gradual, e um rápido retorno aos valores de repouso após as injeções de NaCN, em todos os grupos experimentais, apesar das alterações ocorridas na f_H . Essa manutenção da Pa se assemelha ao que ocorre em tambaqui (SUNDIN et al., 2000) e pacu (LEITE et al., 2007). Esta última espécie apresenta hipertensão em resposta à hipóxia. A manutenção da Pa aproximadamente constante pode ser considerada como um mecanismo preciso do controle barostático nessas espécies (Leite et al., 2007). A diminuição da Pa em resposta às injeções de NaCN (que são fortes estímulos)

teve duração de poucos segundos demonstrando a capacidade do trairão de retornar sua Pa a níveis normais rapidamente, através do controle barostático, frente às reduções de oxigênio. Apesar deste controle da Pa, foi possível observar a existência de quimiorreceptores de O₂ ligados a esta variável cardíaca, orientados tanto interna quanto externamente, monitorando as tensões de O₂ na água e no sangue.

Nos grupos intacto e IX houve uma diminuição significativa da Pa após as injeções de NaCN. Porém, no G1 esta resposta foi abolida, demonstrando a existência de populações de quimiorreceptores de O₂ ligados ao controle da Pa apenas no primeiro par de arcos branquiais, não havendo, portanto, a participação de recepção extrabranquial. Em traíra os quimiorreceptores ligados à resposta pressora estão restritos ao primeiro par de arcos branquiais. Entretanto, além desses sítios de recepção branquiais, a traíra apresenta quimiorreceptores extrabranquiais (SUNDIN et al., 1999), o que provavelmente tem relação com o fato de a traíra, diferentemente do trairão, viver em ambientes freqüentemente hipóxicos, necessitando de mecanismos mais apurados para a percepção das alterações dos níveis de oxigênio na água inspirada.

Em *Hoplerythrinus unitaeniatus*, que possui respiração aérea facultativa, ocorre uma hipertensão desencadeada tanto pela hipóxia quanto por injeções internas e externas de NaCN, indicando que os quimiorreceptores de O₂ ligados à Pa estão presentes interna e externamente em todos os pares de arcos branquiais (LOPES, 2003).

Existe uma grande variabilidade na localização e orientação dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos nas respostas cardio-respiratórias à hipóxia e/ou hipoxemia nos peixes em geral, principalmente com relação às suas inervações, possíveis projeções centrais e suas propriedades neurofarmacológicas. Isto torna difícil a compreensão, de forma generalizada, deste quadro de arcos reflexos em peixes (SHELTON et al., 1986; MILSOM, 1997). Além disso, não está claro se

esta variabilidade está relacionada ao habitat ou ao hábito das diferentes espécies (LOPES, 2003), ou até mesmo às suas filogenias.

Na Tabela III, é possível observar a heterogeneidade na distribuição dos quimiorreceptores de O₂ ligados às variáveis cardiovasculares e ventilatórias em três diferentes espécies (incluindo a espécie do presente estudo, *Hoplias lacerdae*) pertencentes à família Erythrinidae. A partir desta comparação interespecífica, pode-se constatar a não existência de um padrão de localização e/ou orientação desses receptores nas diferentes espécies, mesmo naquelas pertencentes a uma mesma família, ou seja, espécies filogeneticamente próximas.

Tabela III: Resumo dos padrões de localização, orientação e inervação dos quimiorreceptores de O₂ ligados às respostas cardio-respiratórias em peixes da família Erythrinidae (*Hoplias malabaricus*, *Hoplias lacerdae* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*).

| Variáveis | Espécie | Localização dos receptores. | Inervação dos receptores | Orientação dos receptores | Autor/Ano |
|-----------|---|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| f_H | <i>Hoplias malabaricus</i> (Traíra) | 1º arco branquial | X e possivelmente IX | Internos | Sundin et al, 1999. |
| f_H | <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Jeju) | 4 arcos branquiais | IX e X | Internos e Externos | Lopes, 2003 |
| f_H | <i>Hoplias lacerdae</i> (Trairão) | 4 arcos branquiais | IX e X | Internos e Externos | Presente estudo |
| P_a | <i>Hoplias malabaricus</i> (Traíra) | 1º arco brânquial. | IX | Internos | Sundin et al, 1999. |
| | | Extrabranquiais | ? | ? | |
| P_a | <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Jeju) | 4 arcos branquiais | IX e X | Internos e Externos | Lopes, 2003 |
| P_a | <i>Hoplias lacerdae</i> (Trairão) | 1º arco brânquial. | IX e X | Internos e Externos | Presente estudo |
| f_R | <i>Hoplias malabaricus</i> (Traíra) | 4 arcos branquiais | IX e X | Externos | Sundin et al, 1999. |
| f_R | <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Jeju) | 4 arcos branquiais | IX e X | Internos e Externos | Lopes, 2003 |
| f_R | <i>Hoplias lacerdae</i> (Trairão) | 1º arco brânquial. | IX e X | Internos | Presente estudo |
| V_{amp} | <i>Hoplias malabaricus</i> (Traíra) | 4 arcos branquiais | IX e X | Internos e Externos | Sundin et al, 1999. |
| | | Extrabranquiais | ? | Externos | |
| V_{amp} | <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Jeju) | 4 arcos branquiais | IX e X | Internos e Externos | Lopes, 2003 |
| | | Extrabranquiais | ? | Internos e Externos | |
| V_{amp} | <i>Hoplias lacerdae</i> (Trairão) | 4 arcos branquiais | IX e X | Internos e Externos | Presente estudo |

4.2. Respostas Respiratórias

No presente estudo não houve mudanças significativas nos valores de repouso da f_R em relação a um maior grau de denervação seletiva (Tabela II). Não foi possível determinar se houve ou não efeito sobre os valores ventilatórios de repouso afetando a V_{amp} , pois estes dados foram adquiridos por um sinal de pressão intrabucal em níveis similares para cada animal individualmente e para cada ensaio experimental, onde se determinou os valores iniciais, normóxicos, como sendo 100%.

A partir dos dados obtidos no presente estudo, os valores de f_R do grupo controle mostram um aumento significativo após injeções internas de NaCN e sob condição de hipóxia, porém não apresentam mudanças significativas após injeções externas de NaCN. Com base nestes resultados, podemos inferir que os receptores de O_2 que medeiam o aumento na f_R em trairão apenas monitoram o O_2 do sangue.

Provavelmente o tempo de exposição à hipóxia no presente estudo foi suficiente para alterar a PO_2 sanguínea, fazendo com que os quimiorreceptores de O_2 orientados internamente fossem estimulados, fazendo com que houvesse um aumento significativo desta variável respiratória frente à diminuição da PO_2 na água durante a hipóxia gradual, sendo este aumento significativo nos valores de $P_{insp}O_2$ mais baixos.

Segundo MILSOM & BRILL (1986), BURLESON (1991) e BURLESON & MILSOM (1993), os quimiorreceptores podem responder somente, ou preferencialmente, a mudanças no nível externo (água) ou no nível interno (sangue) de O_2 . Estes autores observaram também que alguns receptores são sensíveis às mudanças da PO_2 da água que banha as brânquias e do sangue que as perfunde, sugerindo que os quimiorreceptores de O_2 estão distribuídos difusamente nas

brânquias, apesar de em atum, *Thunnus albacares*, haver uma predominância de quimiorreceptores orientados externamente e, em truta (*Oncorhynchus mykiss*), orientados internamente, assim como encontrado para f_R no presente estudo. Até o momento, nenhum dos estudos comprovou se a orientação externa e/ou interna dos receptores é um aspecto comum a todos os peixes, ou se está associada às diferenças no habitat de cada espécie (MILSOM, 1997). Deve-se levar em consideração que os estudos, em diferentes espécies, utilizaram-se de diferentes metodologias, o que torna ainda mais difícil uma comparação mais precisa entre as espécies já estudadas.

O aumento acentuado na f_R que ocorreu no grupo controle em resposta às injeções de NaCN foi abolido nos peixes do grupo G1, sendo possível assegurar a presença de quimiorreceptores de O_2 que controlam a f_R apenas no primeiro par de arcos branquiais, orientados internamente. O significado ecológico deste padrão de distribuição dos receptores ligados à f_R pode estar relacionado ao fato de que o trairão habita águas bem oxigenadas. Assim, possivelmente esta espécie não necessita de um maior número de sítios de quimiorrecepção para a modulação desta resposta. Isso se deve, talvez, ao fato destes sítios serem suficientes para iniciar as respostas respiratórias (f_R) de maneira eficaz, como foi observado na exposição dos animais à hipóxia, onde houve um aumento significativo da f_R . Ou até mesmo ao fato de o trairão modular suas respostas cardíacas preferencialmente às ventilatórias, a fim de manter a PO_2 sanguínea constante. Este fato corrobora com a ampla distribuição dos receptores ligados à modulação da f_H em trairão, os quais estão distribuídos por todos os pares de arcos branquiais.

Há evidências de que as espécies que vivem em ambientes frequentemente hipóxicos necessitam de mais sítios de recepção para acionarem estes mecanismos fisiológicos

rapidamente, como é o caso, por exemplo, da traíra (ver Tabela III), que possui quimiorreceptores de O_2 ligados ao controle da f_R distribuídos por todos os arcos branquiais (SUNDIN et al., 1999).

Os resultados relacionados à f_R encontrados no presente estudo diferem da maioria dos estudos com protocolo semelhante, os quais seguem o mesmo padrão de distribuição de receptores de O_2 encontrados em traíra, como o jeju (LOPES, 2003), tambaqui (SUNDIN et al., 2000; FLORINDO et al., 2002), *Ictalurus punctatus* (BURLESON & SMATRESK, 1990a), pacu (LEITE et al., 2007) e *Lepisosteus oculatus* (SMATRESK, 1989).

O grupo IX apresentou um aumento significativo na f_R em resposta às injeções externas de NaCN, sugerindo a presença de receptores orientados externamente localizados no primeiro arco branquial e inervados pelo nervo craniano IX, os quais inibem a f_R , pois após a secção deste nervo houve um acentuado aumento desta variável ventilatória. Segundo SUNDIN et al. (1999), ocorre uma inibição semelhante em traíra, onde o ramo pretremático do X, que inerva externamente o primeiro arco branquial, atua inibindo a f_R . Ainda neste estudo, verificou-se a existência de uma outra população de receptores inervados pelo IX que inibe a V_{amp} em traíra, sendo que a mesma constatação foi feita por LEITE et al. (2007) em pacu.

Em trairão, os aumentos significativos da V_{amp} após as injeções internas de NaCN foram significativamente mais acentuados no grupo controle do que no grupo IX sendo que após injeções externas de NaCN este padrão foi invertido. Sob condições de hipóxia, o grupo G1 também difere do controle e de IX, com um aumento discreto indicando que, semelhantemente à traíra e pacu (ver SUNDIN et al., 1999; LEITE et al., 2007), há quimiorreceptores de O_2 que inibem a V_{amp} , inervados pelo nervo glossofaríngeo, e possivelmente pelo ramo pretremático do nervo vago.

Segundo POWELL et al. (1998), as respostas ventilatórias à hipóxia em vertebrados não são produtos de um único mecanismo, mas de uma inter-relação entre vários mecanismos. Entre estes mecanismos estão: (1) o estímulo-específico que inicia o mecanismo (grau de exposição à hipóxia); (2) tempo de exposição (segundos ou anos); (3) os efeitos dos componentes da ventilação (f_R versus V_T); (4) a direção dos seus efeitos (facilitação versus depressão) e, finalmente, (5) as substâncias neuroquímicas necessárias para sua manifestação.

A hipóxia é um poderoso estímulo à hiperventilação em todos os peixes (FRITSCHE & NILSSON, 1993). Os resultados do presente estudo indicaram que a V_{amp} dos animais intactos aumentou aproximadamente 55% em resposta à exposição à hipóxia severa e a f_R aumentou cerca de 25%. Partindo destes dados, podemos concluir que *H. lacerdae*, submetida à hipóxia, apresenta um aumento no fluxo de água através das brânquias, aumentando o volume corrente preferencialmente à modulação na frequência, sendo mais energeticamente econômico para a espécie, conforme observado anteriormente por RANTIN et al. (1992). O trairão apresentou um aumento significativo da V_{amp} após as injeções internas e externas de NaCN, indicando que os receptores de O_2 relacionados a esta variável respiratória monitoram o O_2 tanto da água quanto do sangue. Este padrão de distribuição de receptores ligados a V_{amp} ajuda a entender a possível causa de um menor número de locais de quimiorrecepção ligados a f_R , pois o trairão, assim como outros peixes, modula a V_{amp} preferencialmente à f_R .

Segundo BISGARD & NEUBAUER (1995), há um aumento hiperbólico na ventilação em função da diminuição da PaO_2 . A resposta intensa à hipóxia representa os efeitos das mudanças nos “inputs” aferentes dos quimiorreceptores periféricos sobre o SNC (MCCRIMMON et al., 1997). Embora esta resposta intensa consista em mudanças tanto na f_R como na V_{amp} , o padrão de alterações na f_R versus o V_T é altamente variável e espécie-específico.

O aumento da V_{amp} foi completamente abolida após a completa denervação dos quatro arcos branquiais, tanto após as injeções de NaCN, quanto sob hipóxia gradual, demonstrando que não há receptores de O_2 que modulam esta resposta ventilatória extrabranquialmente, mas sim distribuídos por todos os arcos branquiais, semelhante ao que ocorre em *Ictalurus punctatus* (BURLESON & SMATRESK, 1990a). Portanto, pode-se concluir que *H. lacerdae* apresenta quimiorreceptores de O_2 somente branquiais, distribuídos nos quatro arcos, orientados interna e externamente, envolvidos no controle da V_{amp} . Concomitantemente aos aumentos observados na V_{amp} e na f_R em trairão, foi observado um aumento da V_{tot} frente às injeções internas e externas de NaCN e à hipóxia gradual.

Não foram encontradas evidências da presença de quimiorreceptores de O_2 extrabranquiais ligados a nenhuma das variáveis respiratórias em trairão. Estes achados não corroboram os estudos anteriores realizados com jeju (LOPES, 2003), tambaqui (SUNDIN et al., 2000; FLORINDO et al., 2002), pacu (LEITE et al., 2007) e *Hemipterus americanus* (SAUNDERS & SUTTERLIN, 1971), onde quimiorreceptores de O_2 extrabranquiais estão envolvidos na modulação da V_{amp} . Os resultados do presente trabalho com trairão também não estão em concordância com outro estudo realizado com a traíra, onde receptores extrabranquiais também estão envolvidos na modulação da V_{amp} (ver Tabela III).

A complexidade do quadro de distribuição dos quimiorreceptores de O_2 em *Hoplias lacerdae* é alta, com aspectos distintos dos já descritos na literatura para outras espécies, diferindo muito de duas espécies filogeneticamente próximas, a traíra, *Hoplias malabaricus*, e jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Tabela III). Porém, diferentemente do trairão, que habita águas bem oxigenadas, a traíra é altamente tolerante à hipóxia e o jeju, além de tolerante à hipóxia, apresenta respiração aérea facultativa e habita também ambientes frequentemente hipóxicos. O

mesmo ocorre em pacu, que difere muito com relação a seus receptores de seu parente próximo, o tambaqui (ver LEITE et al., 2007 para revisão).

Essas constatações levam a crer que o significado ecológico das diferenças encontradas nos padrões de quimiorrecepção de O_2 é o fato de que esta heterogeneidade estaria mais ligada aos ambientes onde os peixes habitam do que propriamente à filogenia. Porém nada pode ser afirmado com certeza no atual grau de conhecimento da área, por qualquer argumento adaptativo e/ou evolutivo.

5. Conclusões

a. De acordo com os dados obtidos, os receptores de O_2 em *Hoplias lacerdae* relacionados ao controle cardíaco (f_H e Pa) monitoram os níveis de O_2 tanto da água inspirada (corrente ventilatória), quanto do sangue que perfunde as brânquias e que ambos os ramos branquiais dos nervos IX e X estão envolvidos nessa resposta.

b. Os quimiorreceptores relacionados à hipotensão são restritos ao 1^o arco branquial, enquanto que os relacionados à bradicardia estão distribuídos por todos os pares de arcos branquiais.

c. Há evidências de que os quimiorreceptores de O_2 provavelmente não são essenciais para a manutenção da Pa em níveis constantes, mesmo quando ocorrem modificações na f_H sendo que a espécie apresenta um controle barostático preciso.

d. Os receptores relacionados ao aumento da frequência respiratória são orientados internamente e localizados exclusivamente no 1^o par de arcos branquiais.

e. Por sua vez, os quimiorreceptores de O_2 relacionados ao controle da amplitude ventilatória estão distribuídos por todos os arcos branquiais e são orientados tanto interna quanto externamente.

f. Os resultados indicam a inexistência de quimiorreceptores de O_2 extrabranquiais em *Hoplias lacerdae* envolvidos no controle da função cardio-respiratória.

g. Os dados do presente trabalho indicam, também, a presença de quimiorreceptores de O_2 localizados no primeiro par de arcos branquiais, orientados interna e externamente, que atenuam as respostas respiratórias, inibindo o aumento tanto da f_R quanto da V_{amp} .

6. Bibliografia

- ANDRADE, D.R., VIDAL, M.V.J., SHIMODA, E. 1998. Criação do trairão *Hoplias lacerdae*. Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, (Boletim Técnico, v.3), 32p.
- AXELSSON, M. & FRITSCHÉ, R. 1994. Cannulation techniques. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, vol. 3. Ed: P.W. Hochachka, T.P. Mommsen. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo, pp. 17-36.
- BAMFORD, O.S. 1974. Oxygen reception in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 48:69-76.
- BARRETT, D.J. & TAYLOR, E.W. 1984. Changes in heart rate during progressive hyperoxia in the dogfish *Scyliorhinus canicula*: Evidence for a venous oxygen receptor. Comp. Biochem. Physiol. 78A: 697-703.
- BISGARD, G.E. & NEUBAUER, J.A. 1995. Peripheral and central effects of hypoxia. In: Regulation of Breathing, Ed: J.A. Dempsey, A.I. Pack, New York, pp. 617-618.
- BURLESON, M.L. 1991. Oxygen-sensitive chemoreceptors and cardiovascular and respiratory control in rainbow trout. PhD Thesis University of British Columbia, Vancouver, Canada.
- BURLESON, M.L. & SMATRESK, N.J. 1990a. Effects of sectioning cranial nerves IX and X on cardiovascular and ventilatory reflex responses to hypoxia and NaCN in channel catfish. J. Exp. Biol., 154: 407-420.
- BURLESON, M.L., SMATRESK, N.J., MILSOM, W.K. 1992. Afferent inputs associated with cardioventilatory control in fish. In: Fish Physiology, vol. XIIB, Ed: W. S. Hoar, D. J. Randall, A. P. Farrell. Academic Press, New York, pp. 389-426.

- BURLESON, M.L. & SMATRESK, N.J. 1993. Effects of branchial nerve section on responses to hypercapnic acidosis in channel catfish. *FASEB J.* 7: A23.
- BURLESON, M.L., & MILSOM, W.K. 1993. Sensory Receptors in the 1st Gill Arch of Rainbow-Trout. *Resp. Physiol.* 93:97-110.
- BURLESON, M.L. & MILSOM, W.K. 1995. Cardio-Ventilatory Control in Rainbow-Trout .2. Reflex Effects of Exogenous Neurochemicals. *Respiration Physiology*, 101: 289-299.
- BURLESON, M.L., MCKENZIE, D.J., RANDALL, D.J. 1990. Effects of Branchial Nerve-Section and Pseudobranch Ablation on Cardioventilatory Reflex Responses of An Air-Breathing Fish to Hypoxia, NaCN and Catecholamines. *American Zoologist* 30, A30.
- BURLESON, M.L., SMATRESK, N.J., MILSOM, W.K. 1992. Afferent inputs associated with cardioventilatory control in fish. In: *Fish Physiology*, vol. XXIIB: The Cardiovascular System. Ed: W. S. Hoar, D. J. Randall, A. P. Farrell. Academic Press, New York, pp. 390-426.
- BURLESON, M.L., MERCER, S.E., WILK-BLASCZAK, M.A. 2006. Isolation and characterization of putative O₂ chemoreceptor cells from the gills of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Brain Res.*, 1092: 100-107.
- BRITISKI, H.A., SATO, Y., ROSA, A.B.S. 1984. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco. Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca. São Paulo. 143 p.
- BUTLER, P.J. & TAYLOR, E.W. 1971. Responses of the dogfish (*Scyliorhinus caniculata* L.) to slowly induced and rapidly induced hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 39A: 307-323.

- BUTLER, P.J., TAYLOR, E.W., SHORT, S. 1977. 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. 69: 223-245.
- CAMPBELL, H.A., TAYLOR, E.W., EGGINTON, S. 2004. The use of power spectral analysis to determine cardiorespiratory control in the short-horned sculpin *Myoxocephalus scorpius*. J. Exp. Biol. 207:1969-1976.
- DAXBOEK, C. & HOLETON G.F. 1978. Oxygen receptors in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can.J.Zool. 56: 1254-1259.
- DICKSON, K.A. & GRAHAM, J.B. 1986. Adaptations to hypoxic environments in the erythrinid fish *Hoplias microlepis*. Env. Biol. Fish. 15: 301-308.
- DONALD, J. 1984. Adrenergic innervation of the gills of brown and rainbow trout, *Salmo trutta* and *S. gairdneri*. J. Morphol. 182:307-316.
- DRIEDZIC, W.R., PHLEGER, C.F., FIELDS, J.H., FRENCH, C. 1978. Alterations in energy metabolism associated with the transitions from water to air-breathing in fish. Can. J. Zool. 56: 730-735.
- DUNEL-ERB, S., BAILLY, Y.S., LAURENT, P. 1982. Neuroepithelial cell in fish gill primary lamellae. J. Appl. Physiol. 53:R1324-R1353.
- FERNANDES, M.N. & RANTIN, F.T. 1985. Gill morphometry of the teleost *Hoplias malabaricus* (Bloch). Bol. Fisiol. Anim. USP, 9: 57-65.
- FERNANDES, M.N. & RANTIN, F.T. 1994. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. Aquaculture. 127: 339-346.

- FIDONE, S.J. & GONZÁLES, C. 1986. Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In: Handbook of Physiology, The respiratory System, vol. II, part.1. Ed: A.P. Fishman, N.S. Cherniack, J.S. Widdicombe, S.R. Geiger. American Physiology Society, Bethesda, MD, pp. 247-312.
- FLORINDO, L.H. 2002. O papel dos quimiorreceptores de O₂, CO₂/pH no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração na superfície aquática (ASR) em tambaqui, *Colossoma macropomum*: Resposta a longo prazo durante a hipóxia e hipercarbica. Tese de doutorado da Universidade Federal de São Carlos, 116 p.
- FRITSCHÉ, R. & NILSSON, S. 1989. Cardiovascular responses to hypoxia in the Antarctic cod, *Gadus morhua*. Exp. Biol. 48: 153-160.
- FRITSCHÉ, R. & NILSSON, S. 1993. Cardiovascular and respiratory control during hypoxia. In: Fish Ecophysiology. Ed: J.C. Rankin, F.B. Jensen. London, New York: Chapman & Hall. pp. 180-206.
- GODOY, M.P. 1975. Família Erythrinidae. In: GODOY, M.P. Peixes do Brasil, sub-ordem characoidei. v. 3, Ed. Franciscana, São Paulo.
- GRAHAM, J.B. 1997. Air-breathing fishes: evolution, diversity and adaptation. Academic Press. 299 p.
- HOCHACHKA, P.W., 1980. Living without oxygen. Closed and open systems in hypoxia tolerance. Cambridge University Press, Cambridge, 181 p.
- HOCHACHKA, P.W., GUPPY, M., GODERLEY, H.E., STOREY, K.B., HULBERT, W.C. 1978. Metabolic biochemistry of water vs. Air-breathing fishes: Muscles enzymes and ultrastructure. Can. J. Zool. 56: 736-750.

- HOLETON, G.F. & RANDALL, D.J. 1967. The effect of hypoxia upon the partial pressure of gases in the blood and water efferent to the gills of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 46: 317-327.
- HUGHES, G.M. 1966. The dimensions of fish gills in relation to their function. *J. Exp. Biol.* 45: 177-195.
- JONES, D.R. 1983. Ontogeny and phylogeny of the oxygen response. *Proc. Physiol. Soc. NZ.*, 3: 79-81.
- KALININ, A.L., RANTIN, F.R., FERNANDES, M.N., GLASS, M.L. 1996. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Ed: A.L. Val, V.M.F. Almeida-Val, D.J. Randall. Editora do INPA, Manaus, pp 191-202.
- LAURENT, P. 1984. Gill internal morphology. In: *Fish Physiology*, vol. XA. Ed: W. S. Hoar, D. J. Randall, A. P. Farrell. Academic Press, New York, pp. 73-183.
- LEITE, C.A.C. 2003. Localização e distribuição dos quimiorreceptores de O₂ relacionados com os reflexos cardio-respiratórios em pacu *Piaractus mesopotamicus*, em resposta à hipóxia. Dissertação de mestrado da Universidade Federal de São Carlos, 77p.
- LEITE, C.A.C.; Florindo, L.H.; Kalinin, A.L.; Milsom, W.K.; Rantin, F.T. 2007. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *J Comp Physiol A*, 193: 1001-1011.
- LOMHOLT, J.P. & JOHANSEN MK. 1979. Hypoxia acclimation in carp: how it effects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. *Physiol. Zool.* 52: 38-49.
- LOPES, J.M. 2003. Localização e orientação dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração aérea de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*

(Teleostei Erythrinidae) em resposta à hipóxia ambiental. Tese de doutorado da Universidade Federal de São Carlos, 87 p.

MCCRIMMON, D.R.; ZUPERKU, E.J.; HAYASHI, F. 1997. Modulation of the synaptic drive to respiratory premotor and motor neurons. *Respir. Physiol.*, 110: 161-176.

MCKENZIE, D. J., BURLESON, M. L., RANDALL, D. J. 1991. The Effects of Branchial Denervation and Pseudobranch Ablation on Cardioventilatory Control in an Air-Breathing Fish. *J. Exp. Biol.* 161: 347-365.

MCKENZIE, D.J., TAYLOR, E.W., BRONZI, P., BOLIS C.L. 1995. Aspects of cardioventilatory control in the adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Resp. Physiol.* 100: 45-53.

MILSOM, W.K. 1993. Afferent input regulating ventilation in vertebrates. In: The vertebrate gas transport cascade. Adaptations and mode of life. Ed: J.E.P. Bicudo, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 94-105.

MILSOM, W.K. 1997. Control of breathing in fish: role of chemoreceptors. In: Physiology and Biochemistry of the Amazon. Ed: A.L., Val; V.M.F. Almeida-Val, D.J. Randall, Manaus, pp 359-377.

MILSOM, W.K. & BRILL, R.W. 1986. Oxygen sensitive afferent information arising from the first gill arch of yellowfin tuna. *Resp. Physiol.* 66: 193-203.

MILSOM, W.K., SUNDIN, L., REID, S., KALININ, A.L., RANTIN, F.T. 1999. Chemoreceptor control of cardiovascular reflexes. In: Biology of tropical fishes. Ed: L. Val, V.M.F. Almeida-Val, Editora do INPA, Manaus, pp. 363-374.

- MILSOM, W.K., REID, S.G., RANTIN, F.T., SUNDIN, L. 2002. Extrabranhial chemoreceptors involved in respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). *J.Exp. Biol.* 205: 1765-1774.
- NIEMA, J., OJALA, K. 1964. Cytochemical demonstration of catecholamines in the human carotid body. *Nature* 203: 539-540.
- OLIVEIRA, R.D.; LOPES, J.M.; SANCHES, J.R.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. 2004. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae) exposed to graded ambient hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 139: 479-485.
- POWELL, F.L.; MILSOM, W.K., MITCHELL, G.S. 1998. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* 112: 123-134.
- RANDALL, D.J. 1982. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. *J. Exp. Biol.* 100: 275-288.
- RANDALL, D.J., BURGGREN W.W., FARRELL, A.P., HASWELL, M.S. 1981. The evolution of air-breathing in vertebrates. Cambridge University Press, Cambridge, 133 p.
- RANTIN, F.T. & JOHANSEN, K. 1984. Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. *Env. Biol. Fish.* 11: 221-228.
- RANTIN, F.R., KALININ, A.L., GLASS, M.L., FERNANDES, M.N. 1992. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J. Fish. Biol.* 41: 805-812.
- RANTIN, F.R., GLASS, M.L., KALININ, A.L., VERZOLA, R.M.M., FERNANDES, M.N. 1993. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias*

- malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. *Env. Biol. Fish.* 36: 93-97.
- SATCHELL, G.H. 1961. The response of the dogfish to anoxia. *J. Exp. Biol.* 32: 231-236.
- SAUNDERS, R.L. 1962. 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.* 40: 817-862.
- SAUNDERS, R. L. & SUTTERLIN, A. M. 1971. Cardiac and Respiratory responses to hypoxia in the Sea Raven, *Hemitripterus americanus*, and an Investigation of possible control mechanisms. *J.Fish.Res.Bd.Can.* 28: 491-503.
- SHELTON, G.; JONES, D.R.; MILSOM, W.K. 1986. Control of breathing in ectothermic vertebrates. In: *Handbook of Physiology, section 3, The respiratory system, vol II, Control of Breathing, part 2.* Ed: S.R. Geiger; A.P. Fishman; N.S. Cherniack; J.G. Widdicombe. Baltimore, Waverly Press, pp. 857-909.
- SMATRESK, N.J.; BURLESON, M.L.; AZIZI, S.Q. (1986). Chemoreflexive responses to hypoxia and NaCN in longnose gar: evidence for two chemoreceptor loci. *Am.J.Physiol* 251, R116-R125.
- SMATRESK, N.J. 1989. Chemoreflex control of respiration in an air breathing fish. In: *Chemoreceptors and chemoreflexes in breathing – Cellular and Molecular Aspects.* Ed: S. Lahiri; R.E. Foster II; R.O. Davies; A.I. Pack. London, Oxford University Press, pp. 29-52.
- SMITH, F.M. & JONES, D.R. 1978. Localization of receptors causing hypoxic bradycardia in trout (*Salmo gairdenri*) *Can. J. Zool.* 56: 1260-1265.
- SMITH, F.M. & DAVIE, P.S. 1984. Effects of sectioning cranial nerves IX and X on the cardiac response to hypoxia in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Can. J. Zool.* 62: 766-768.

- SUNDIN, L.I. 1995. Responses of the Branchial Circulation to Hypoxia in the Atlantic Cod, *Gadus-Morhua*. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 37: R771-R778.
- SUNDIN, L.I. & NILSSON, G. 1997. Neurochemical mechanisms behind gill microcirculatory responses to hypoxia in trout: *in vivo* microscopy study. Am. J. Physiol. 272: 576-585.
- SUNDIN, L., REID, S.G., KALANIN, A.L., RANTIN, F.T., MILSOM, W.K. 1999. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*). Resp. Physiol. 116: 181- 119.
- SUNDIN, L., REID, S.G., RANTIN, F.T., MILSOM, W.K. 2000. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). J. Exp. Biol. 203: 1225-1239.
- TAYLOR, E.W. 1992. Nervous control of heart and cardiorespiratory interactions. In: Fish Physiology vol. 12B. Ed: W.S. Hoar, D.J. Randall, A.P. Farrell. Academic Press, New York, pp. 343-387.
- WILKIES, P.R.H., WALKER, R.L., McDONALD, D.G. 1979. Respiratory, ventilatory and cardiovascular responses to experimental anaemia in the atarry flounder, *Platichthys stellatus*. J. Exp. Biol., 82: 139-162.