

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

LOCALIZAÇÃO DOS BARORRECEPTORES NO TAMBAQUI,
***COLOSSOMA MACROPOMUM* (TELEOSTEI: SERRASALMINAE)**

VINICIUS ARAÚJO ARMELIN

SÃO CARLOS – SP
2015

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

**LOCALIZAÇÃO DOS BARORRECEPTORES NO TAMBAQUI,
COLOSSOMA MACROPOMUM (TELEOSTEI: SERRASALMINAE)**

VINICIUS ARAÚJO ARMELIN

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

SÃO CARLOS – SP
2015

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

A728Lb Armelin, Vinicius Araújo.
Localização dos barorreceptores no tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei: Serrasalminae) / Vinicius Araújo Armelin. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
55 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

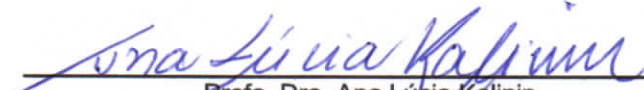
1. Fisiologia comparada. 2. Barorreflexo. 3. Tambaqui (Peixe). 4. Teleósteos. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Vinicius Araújo Armelin, realizada em 05/03/2015:



Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
UFSCar



Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego
UNESP



Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho
UNIFESP

Dedico esse trabalho aos meus pais Cláudio e Vigoneti, por todo o amor a mim concedido e pelo exemplo de perseverança e honestidade. Também o dedico ao meu irmão Leonardo, que sempre fez muita questão de estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Ana Lúcia Kalinin. Pela oportunidade, confiança, ensinamentos, exemplo profissional e admirável simpatia e bom humor – tanto quanto pela amizade.

Ao meu coorientador, Luiz Henrique Florindo, pelas inúmeras oportunidades proporcionadas desde a minha graduação. Assim como pela confiança, incentivo, paciência, ensinamentos, discussões, exemplo profissional e pela amizade.

Aos professores vinculados ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fisiologia Comparada, especialmente àqueles que eu tive a oportunidade de conviver, ainda que por um curto período de tempo: André, Augusto, Bill, Cléo, David, José Eduardo, Kênia, Luciane, Tadeu, Ted, Tobias e Wilfred.

Aos companheiros de laboratório, pelo trabalho em conjunto, convívio e amizade: Amanda, Ariela, Carlos, Daniele, Gabriel Banov, Gabriel Ferreira, Gabrielle, Isadora, Leonardo, Maria Laura, Mariana, Natália, Pelicano, Rafael, Rogério, Victor Braga e Vitor Ianelli.

Aos meus amigos, sempre presentes em momentos inesquecíveis: Alice, Cássio, Fábio, Gauy, Gisele, Ivã, Kaio, Lara, Larissa, Lidiane, Luís Felipe, Maitê, Marcela, Nathalia, Poatan, Rafael, Rodolfo, Rogério Botion, Willian e Yuri.

Aos colegas do Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas e do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar: Diana, Elinton, Felipe, Lays, Lucas Ferro, Lucas Zena, Luis Gustavo, Naiara, Nathan, Rafael “Z”, Thiago e Vivian.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. E também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP) pelo financiamento da presente pesquisa (Processo Conjunto CNPq/FAPESP 08/57712-4) (Processo FAPERP 001/20143).

A todos aqui não citados, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal nesses dois anos.

“Para cada problema em fisiologia existe um animal modelo adequado ao seu estudo”.

(Schack August Steenberg Krogh)

“Nada em biologia faz sentido, exceto à luz da evolução”.

(Theodosius Hryhorovych Dobzhansky)

RESUMO

O sistema cardiovascular possui a fundamental função de suprir as necessidades dos tecidos corporais dos animais, fornecendo às células diversos elementos essenciais a seu funcionamento e drenando substâncias potencialmente nocivas (metabólitos). Todos esses fatores são transportados por meio do sangue, o qual tem sua propulsão determinada por um gradiente de pressão criado pelo coração. Além de promover a circulação, a pressão sanguínea também é diretamente relacionada à manutenção de vários outros processos fisiológicos, fazendo com que a preservação dessa variável em níveis satisfatórios seja pré-requisito para a vitalidade de um organismo. Frente a essa necessidade de valores pressóricos ideais, importantes mecanismos reguladores da pressão sanguínea foram selecionados durante a história evolutiva dos vertebrados, e como importante exemplo temos o barorreflexo. Tal reflexo se inicia com o monitoramento da pressão arterial pelos barorreceptores, os quais informam constantemente a condição dessa variável ao sistema nervoso central, o qual é capaz de alterar a frequência cardíaca e a resistência vascular sistêmica de modo a normalizar rapidamente a pressão arterial caso seja necessário. Enquanto o funcionamento do barorreflexo já foi amplamente entendido e os barorreceptores pontualmente localizados em mamíferos, essas questões encontram-se pouco elucidadas e controversas em peixes, originando o objetivo do presente trabalho: localizar os barorreceptores e suas aferências em um teleósteo, o *Colossoma macropomum*. Para isso, foram analisadas a ocorrência e a eficiência do barorreflexo induzido por desbalanceamentos pressóricos em peixes intactos (IN), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Os desbalanceamentos pressóricos foram promovidos por meio da administração do agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina e do antagonista α_1 -adrenérgico prazosina, e o barorreflexo foi avaliado utilizando-se um eletrocardiograma que permitiu a derivação da frequência cardíaca (bpm), da relação entre a frequência cardíaca pré- e pós-administração farmacológica (%), do tempo decorrido até a resposta barorreflexa cronotrópica máxima (s) e da variabilidade total da frequência cardíaca (ms). Os resultados evidenciaram que o reflexo barostático encontrava-se atenuado no grupo G1, ao passo que inexistia no grupo G4 – indicando que os barorreceptores localizam-se exclusivamente nos arcos branquiais dos tambaquis e estão distribuídos por todos eles.

Palavras-chave: Barorrecepção. Barorreceptores. Barorreflexo. Tambaqui. Teleósteo.

ABSTRACT

The cardiovascular system plays the fundamental role of supplying the needs of the animals' bodily tissues. It both provides the cells with a variety of elements that are essential to their functioning and drains potentially harmful substances, such as metabolites. All of these items are transported through the blood, the propulsion of which is determined by the pressure gradient created by the heart. In addition to promoting circulation, blood pressure is also directly involved in the maintenance of many other physiological processes, making the preservation of this variable at satisfactory levels a prerequisite for an organism's vitality. In light of this need for ideal pressure levels, important mechanisms for blood pressure regulation have been selected during the evolutionary history of vertebrates, and the baroreflex serves as a clear example. These reflexes begin with the monitoring of arterial pressure by baroreceptors, which constantly inform the central nervous system (CNS) of the condition of this variable. The CNS is thus able to change heart rate and systemic vascular resistance in order to normalize arterial pressure when necessary. Though the operation of the baroreflex is already widely understood and though baroreceptors have been located in mammals, these issues are not elucidated and remain quite controversial when it comes to fishes. Thus, the objective of this work was to locate the baroreceptors and their afferences in a teleost, the *Colossoma macropomum*. To do so, the occurrence and efficiency of the baroreflex were analyzed when this mechanism was induced by pressure imbalances in intact fish (IN), fish with the first pair of gill arches denervated (G1) and fish with all four pairs of gill arches denervated (G4). The pressure imbalances were promoted by the administration of the α_1 -adrenergic agonist phenylephrine and the α_1 -adrenergic antagonist prazosin, and the baroreflex was assessed using an electrocardiogram that measured heart rate (bpm), relation between pre- and post-pharmacological manipulation heart rates (%), the time required to reach maximum chronotropic baroreflex response, and total heart rate variability (ms). The results revealed that the barostatic reflex was attenuated in the G1 group and non-existent in G4 group – indicating that baroreceptors may be exclusively located in the gill arches of teleosts.

Keywords: Baroreception. Baroreceptor. Baroreflex. Tambaqui. Teleost.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática demonstrando a relação entre a área de secção transversa vascular total (diretamente proporcional à resistência vascular) e a velocidade linear do fluxo sanguíneo (A), assim como a pressão média do sangue em cada região da vasculatura sistêmica humana (B). Note que embora a área de secção transversal de um capilar individual seja diminuta, a ocorrência desse tipo de vaso no organismo é tão grande que sua área de secção transversa total é superior à de qualquer outro tipo de vaso. Fonte: adaptada de Hill et al. (2011)..... 16
- Figura 2** – Esquema demonstrando as alças de retroalimentação do barorreflexo frente às situações de pressão arterial reduzida e aumentada (A), e os efeitos das modificações da pressão arterial na taxa de disparo dos barorreceptores carotídeos de mamíferos (modo pelo qual esses receptores se comunicam com o sistema nervoso central) (B). DC: débito cardíaco; RVS: resistência vascular sistêmica; SNC: sistema nervoso central. Fonte: adaptada de Klabunde (2011)..... 20
- Figura 3** – Fotografia da bacia hidrográfica amazônica (A) e de um exemplar adulto de tambaqui, *Colossoma macropomum* (B). Fonte: (A) <<http://www.america.de/wp-content/uploads/rio-purus.jpg>> Acesso em janeiro de 2015; (B) <GNU – General Public Licence>..... 23
- Figura 4** – Fotografia de um exemplar de *Colossoma macropomum* obtida logo após o término da implantação dos eletrodos de eletrocardiograma e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está conectado ao cabo vermelho, enquanto o eletrodo de referência (-) está conectado ao cabo branco. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta. A pequena mangueira inserida na cavidade oro-branquial fornece ao peixe solução de benzocaína aerada, mantendo a anestesia e as trocas gasosas do mesmo. Fonte: elaborada pelo autor..... 27

Figura 5 – Esquema do encéfalo e nervos cranianos de tambaqui (A), com os nervos glossofaríngeo (IX) e vago (X) em detalhe (B). As fotografias das autópsias mostram que no grupo G1 o nervo glossofaríngeo e o primeiro ramo do nervo vago foram seccionados bilateralmente (C) (D), enquanto que no grupo G4 os nervos seccionados foram o glossofaríngeo e todos os ramos branquiais do vago (E) (F). Fonte: adaptado de Milsom et al. (2002).28

Figura 6 – Eletrocardiograma de *C. macropomum* intacto e não tratado. Fonte: elaborada pelo autor.29

Figura 7 – Representação esquemática demonstrando os grupos experimentais, o número de réplicas em cada grupo (N) e a ordem do protocolo experimental com os tempos de recuperação. Fonte: elaborada pelo autor.30

Figura 8 – Gráficos descritivos mostrando a f_H dos animais intactos (IN), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). O asterisco indica diferença significativa entre a f_H anterior à administração de prazosina e a f_H quinze minutos após a administração da mesma (Teste t pareado bicaudal; $p \leq 0,05$). Fonte: elaborada pelo autor.32

Figura 9 – f_H de *Colossoma macropomum* antes e depois das manipulações farmacológicas. O gráfico apresenta informações acerca dos animais intactos (IN) (A), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) (B) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) (C). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Fonte: elaborada pelo autor.33

Figura 10 – f_H pós administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré administração farmacológica (f_H pós / f_H pré X 100), em animais intactos (IN) (A), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) (B) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) (C). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$); Um asterisco indica diferença significativa para com uma linha de base de 100%. Fonte: elaborada pelo autor.34

Figura 11 – Tempo decorrido até a resposta cronotrópica barorreflexa máxima em animais intactos (IN) e com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Não há dados acerca dos indivíduos submetidos à desnervação dos quatro pares de arcos branquiais (G4) porque esses não apresentaram reflexo barostático. Fonte: elaborada pelo autor. 34

Figura 12 – Desvio padrão dos intervalos R-R de *Colossoma macropomum* contidos nos 5 minutos que precederam as manipulações farmacológicas e nos 5 minutos que sucederam tais manipulações (variabilidade total da f_H). O gráfico apresenta informações acerca dos animais intactos (IN) (A), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) (B) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) (C). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Fonte: elaborada pelo autor. 35

Figura 13 – Gráficos descritivos mostrando a f_H dos animais intactos (IN), com a inervação branquial exposta (SH) e intactos porém tratados com os veículos dos fármacos (VE). Fonte: elaborada pelo autor. 36

Figura 14 – Localização da artéria branquial aferente (A) e do sistema arteriovenoso caudal (B) em teleósteos. Fonte: (A) Imagem modificada de Sandblom e Axelsson (2005); (B) Esquema adaptado de <<http://people.eku.edu/ritchisong/342notes2.htm>> Acesso em janeiro de 2015..... 38

Figura 15 – Amplitude espectral da variação dos intervalos R-R em diversos momentos pós-cirúrgicos em *Myoxocephalus scorpius* (A), e a modificação do desvio padrão dos intervalos R-R nesses mesmos momentos (B). A área da amplitude espectral é diretamente proporcional à variabilidade da f_H . Note que tal variabilidade é prejudicada pela cirurgia e retorna a normalidade ao longo de cinco dias. Fonte: Campbell et al. (2004). 39

Figura 16 – Resultados do experimento-piloto acerca dos efeitos da fenilefrina (A) e prazosina (B) na pressão arterial de tambaqui. Note que a infusão de fenilefrina promoveu um aumento da pressão arterial acompanhado por uma bradicardia (observe a menor quantidade de pulsos pressóricos), enquanto a prazosina induziu uma redução da pressão arterial acompanhada por uma taquicardia. Fonte: elaborada pelo autor. 40

Figura 17 – Tacogramas expressando a duração dos intervalos R-R de *Colossoma macropomum* contidos nos 5 minutos que precederam as manipulações farmacológicas e nos 5 minutos que sucederam tais manipulações. Note a característica ondulatória dos tacogramas similares às ondas vasomotoras de Mayer, assim como a abolição de suas influencias na f_H com a desnervação dos quatro pares de arcos branquiais (G4). As ondas de Mayer já foram descritas em um teleósteo por Wood (1974). Fonte: elaborada pelo autor.44

Figura 18 – Esquema sumarizando a localização dos barorreceptores nos principais grupos de vertebrados estudados até a atualidade, quando em fase adulta. Fonte: adaptada de Bagshaw (1985).46

Figura 19 – Diagrama ilustrando a distribuição dos barorreceptores nos principais grupos de vertebrados, suas inervações e suas origens embrionárias. Círculos vermelhos: derivação do 3º arco faríngeo embrionário; Círculos amarelos: derivação do 4º arco faríngeo embrionário; Círculos verdes: derivação do 5º arco faríngeo embrionário; Círculos azuis: derivação do 6º arco faríngeo embrionário; AF: arco faríngeo embrionário; SRA: superfície de respiração aérea. Fonte: adaptada de Milsom e Burlison (2007).47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – f_H (bpm) dos animais intactos (IN), falso-operados (SH) e tratados com veículo (VE).37
- Tabela 2** – f_H (bpm) pós-administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré-administração farmacológica (f_H pós-administração / f_H pré-administração \times 100) em animais intactos (IN), submetidos à falsa operação (SH) e tratados com veículo (VE).37
- Tabela 3** – Tempo necessário (s) para que a respostas barorreflexas cronotrópicas, induzidas pelos desbalanceamentos pressóricos, atingissem o seu máximo. A tabela apresenta dados dos animais intactos (IN) e submetidos à falsa operação (SH) apenas, visto que os animais tratados com veículo (VE) não apresentaram reflexo barostático.37
- Tabela 4** – Desvio padrão dos intervalos R-R (ms) de *Colossoma macropomum* contidos nos 5 minutos que precederam as manipulações farmacológicas e nos 5 minutos que sucederam tais manipulações. A tabela apresenta dados dos animais intactos (IN), submetidos à falsa operação (SH) e tratados com veículo (VE).37
- Tabela 5** – Regiões barossensíveis em vertebrados, suas origens embrionárias e inervações.46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Arco(s) faríngeo(s)
bpm	Batimento(s) por minuto
cm	Centímetro(s)
CAUNESP	Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista
DC	Débito cardíaco
DP	Desvio padrão
EPM	Erro padrão médio
f_H	Frequência cardíaca
G1	Grupo de peixes com o primeiro par de arcos branquiais desnervados
G4	Grupo de peixes com os quatro pares de arcos branquiais desnervados
h	Hora(s)
Hz	Hertz
IN	Grupo de peixes com os arcos branquiais intactos
kg	Quilograma(s)
l	Litro(s)
mg	Miligrama(s)
min	Minuto(s)
mmHg	Milímetro(s) de mercúrio
ms	Milissegundo(s)
mV	Milivolt(s)
N	Número de réplicas
PE20	Polietileno calibre 20
RVS	Resistência vascular sistêmica
s	Segundo(s)
SH	Grupo de peixes com as inervações branquiais expostas e não desnervadas
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Superfície de respiração aérea
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VE	Grupo de peixes intactos e tratados com os veículos dos fármacos

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
1.1 – O SISTEMA CARDIOVASCULAR E A PRESSÃO SANGUÍNEA	15
1.2 – CONTROLE DA PERFUSÃO TECIDUAL E A PRESSÃO ARTERIAL	17
1.3 – MECANISMOS DE CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL	18
1.4 – O BARORREFLEXO E AS REGIÕES BAROSENSÍVEIS EM PEIXES	21
1.5 – ACERCA DO MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO	23
2 – OBJETIVOS	25
3 – MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 – OS ANIMAIS	26
3.2 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS	26
3.3 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL	29
3.4 – ANÁLISE DAS RESPOSTAS BARORREFLEXAS	30
3.5 – TRATAMENTO ESTATÍSTICO (INFERENCIAL) DOS DADOS	31
4 – RESULTADOS	32
4.1 – GRUPOS IN, G1 E G4	32
4.2 – GRUPOS SH E VE	36
5 – DISCUSSÃO	38
5.1 – CRÍTICA AOS MÉTODOS	38
5.2 – O BARORREFLEXO E AS REGIÕES BAROSENSÍVEIS EM TAMBAQUI	40
5.3 – EVOLUÇÃO DA BARORRECEPÇÃO EM VERTEBRADOS	45
6 – CONCLUSÕES	48
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – O SISTEMA CARDIOVASCULAR E A PRESSÃO SANGUÍNEA

O sistema cardiovascular possui a fundamental função de suprir as necessidades dos tecidos corporais dos animais, transportando rapidamente oxigênio, dióxido de carbono, nutrientes, metabólitos, hormônios, agentes do sistema imune, calor e outros fatores para todo o corpo. Isso faz desse sistema um dos grandes responsáveis pelo funcionamento ótimo de um organismo, pois mantém um ambiente apropriado em todos os tecidos para que as células possam sobreviver e realizar suas funções (HILL et al., 2012).

O sangue, tecido conjuntivo líquido pelo qual os diversos fatores citados acima são transportados, é conduzido através de vasos sanguíneos e sua propulsão é determinada por um gradiente de pressão criado, nos vertebrados e em alguns invertebrados, por um órgão contrátil que atua como bomba, o coração (HILL et al., 2012). Esses vasos sanguíneos podem apresentar características morfofuncionais distintas, motivo pelo qual os mesmos são classificados de acordo com o exposto abaixo, baseado em Guyton e Hall (2011):

- **Artérias:** constituem a fase inicial do transporte sanguíneo, recebendo o sangue bombeado pelo coração a altas pressões e direcionando-o para todas as partes do corpo (figura 1). Além de promover a circulação sanguínea, a pressão arterial também está intimamente relacionada a vários processos fisiológicos, como a filtração glomerular renal, movimentação de plasma do sangue para os espaços intersticiais através do endotélio capilar, manutenção do fluxo linfático, entre outros.
- **Arteriolas e Metarteriolas:** são os ramos finais do sistema arterial, os quais possuem seu diâmetro constantemente controlado pelos tecidos adjacentes de acordo com as demandas metabólicas dos mesmos, regulando o fluxo sanguíneo liberado para os capilares que os irrigam. Tanto as artérias quanto as arteriolas e metarteriolas possuem paredes vasculares robustas e com espessa camada de músculo liso.
- **Capilares:** são ductos ultrafinos e muito permeáveis, cuja principal função é permitir a difusão de gases respiratórios, líquidos, nutrientes, eletrólitos, hormônios e outras substâncias entre o sangue e os tecidos circundantes. A região capilar é a que mais possui resistência vascular e, portanto, a que mais promove redução da pressão sanguínea proveniente do sistema arterial – essa resistência também é responsável por fazer com que o fluxo sanguíneo capilar seja lento, permitindo uma maior difusão dos fatores supracitados (figura 1).

- **Vênulas:** coletam o sangue dos capilares e coalescem progressivamente formando as **veias** que transportam o sangue de volta ao coração. Por fazerem parte da circulação pós-capilar apresentam pressão sanguínea baixa, porém quase sempre suficiente para promover o retorno venoso (figura 1). As vênulas e veias possuem paredes pouco robustas e com camada reduzida de músculo liso.

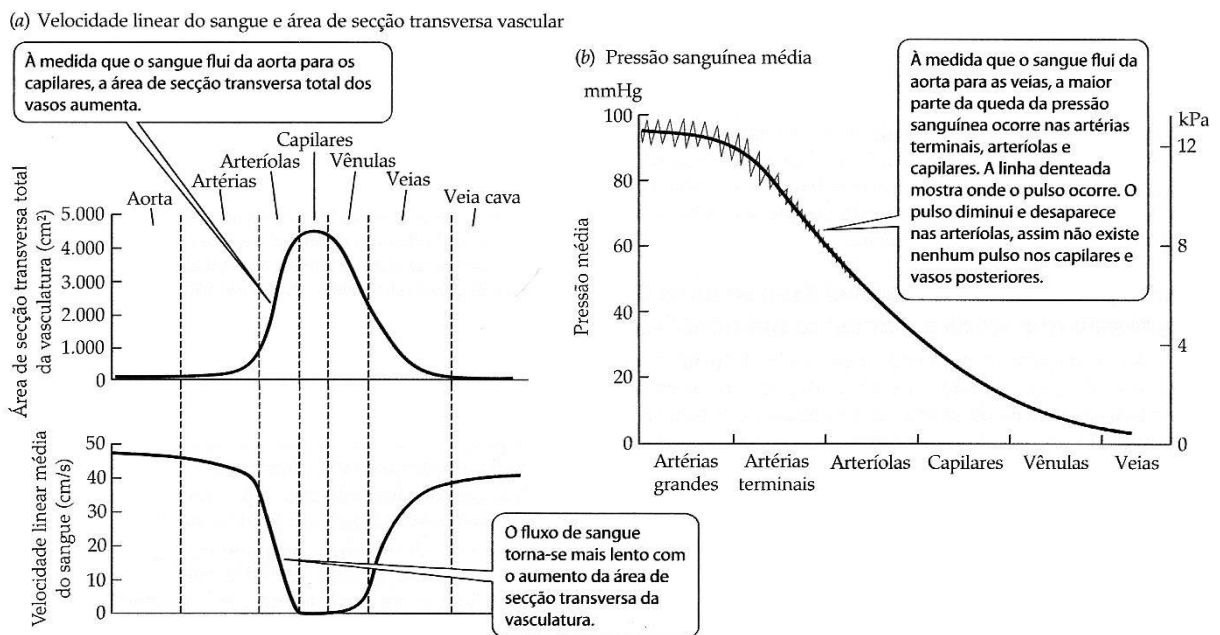


Figura 1. Representação esquemática demonstrando a relação entre a área de secção transversa vascular total (diretamente proporcional à resistência vascular) e a velocidade linear do fluxo sanguíneo (A), assim como a pressão média do sangue em cada região da vasculatura sistêmica humana (B). Note que embora a área de secção transversal de um capilar individual seja diminuta, a ocorrência desse tipo de vaso no organismo é tão grande que sua área de secção transversa total é superior à de qualquer outro tipo de vaso. Fonte: adaptada de Hill et al. (2011).

Para que a perfusão de órgãos e tecidos seja mantida, a pressão arterial deve ser suficiente para superar a resistência ao fluxo sanguíneo derivada de toda a vasculatura, assim como para sobrepujar a força da atração gravitacional naqueles vasos em que o fluxo sanguíneo é ascendente (LILLYWHITE, 1996; GUYTON; HALL, 2011). Contudo, tal pressão também não pode ser demasiadamente alta, sob a pena de provocar edemas, desequilíbrio hidroeletrolítico, rompimento de vasos sanguíneos e danos severos a órgãos particularmente sensíveis à hipertensão (como os rins e o encéfalo) (GUYTON; HALL, 2011; KLABUNDE, 2011).

Dessa forma, é simples deduzir que a preservação da pressão arterial em valores ideais trata-se de uma condição *sine qua non* para a manutenção das funções de um organismo, condição que muito provavelmente impôs pressões seletivas ao longo da história evolutiva dos vertebrados, induzindo a fixação dos importantes mecanismos reguladores da pressão arterial que são atualmente conhecidos.

1.2 – CONTROLE DA PERFUSÃO TECIDUAL E A PRESSÃO ARTERIAL

Antes de detalhar os mecanismos de controle pressórico, é importante entender a regulação da perfusão sanguínea tecidual e sua relação com a pressão arterial. Sabe-se que a magnitude do fluxo sanguíneo para os tecidos não é constante, pois caso fosse, o mesmo teria de ser mantido alto o suficiente para suprir as necessidades teciduais ainda que em momentos de elevada atividade metabólica – situação que poderia exigir um fluxo de sangue maior do que o coração é capaz de bombear. Assim, o fluxo sanguíneo para cada tecido é precisamente mantido no nível mínimo necessário para o suprimento de suas necessidades, fazendo com que a carga de trabalho do coração seja sempre a menor possível (GUYTON; HALL, 2011).

O controle do fluxo sanguíneo tecidual é realizado por meio de constrições e dilatações das metarteríolas, que podem ser induzidas tanto por substâncias vasoativas secretadas pelos tecidos adjacentes quanto por um déficit nutricional local *per se*. A primeira possibilidade ocorre quando o aumento metabólico tecidual reduz a disponibilidade de nutrientes no local, situação que induz as células a liberarem substâncias vasodilatadoras que se difundem até as metarteríolas e promovem um aumento do fluxo sanguíneo naquela região. Já a segunda possibilidade é caracterizada por uma vasodilatação ocasionada apenas pela escassez nutricional local, que faz com que o músculo liso das metarteríolas perca tonificação até que o maior fluxo sanguíneo nutrifique os tecidos novamente (GUYTON E HALL, 2011).

Severas demandas por trabalho cardíaco podem ser impostas pelo controle do fluxo sanguíneo tecidual, como verificado em situações de exercício físico e digestão por exemplo. Durante o exercício, a resistência vascular nos músculos esqueléticos encontra-se extremamente baixa devido à alta atividade metabólica desses tecidos, o que aumenta o fluxo sanguíneo para os mesmos e, conseqüentemente, exige um maior trabalho cardíaco – pois a quantidade de vasos dilatados é muito grande (LAUGHLIN, 1999). Semelhantemente, em período pós-prandial, a taxa metabólica do sistema gastrointestinal encontra-se aumentada por conta dos diversos processos mecânicos e fisiológicos relacionados ao *modus operandi* da digestão (a chamada ação dinâmica específica), o que resulta em uma dilatação na enorme quantidade de vasos sanguíneos que o sistema gastrointestinal possui (SECOR, 2009).

À vista do exposto, as vasodilatações e vasoconstrições locais promovidas pelo controle do fluxo sanguíneo tecidual podem alterar significativamente a pressão arterial de um indivíduo, de acordo com a magnitude das modificações na resistência vascular. E considerando que as demandas teciduais oscilam de forma ininterrupta, fica estabelecido mais um motivo pelo qual os mecanismos de controle da pressão arterial são requeridos para manter a perfusão sanguínea adequada em todo o organismo, qualquer que seja o momento.

1.3 – MECANISMOS DE CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL

Os mecanismos de controle da pressão arterial visam manter a estabilidade pressórica frente às inúmeras situações e adversidades que podem alterá-la, garantindo que todas as funções fisiológicas relacionadas a essa variável não sejam prejudicadas. Esses mecanismos podem atuar a longo ou a curto prazo, cada qual operando em cenários próprios, de formas diferentes e com participação de mediadores distintos.

A regulação a longo prazo da pressão arterial é intimamente relacionada ao balanço hidroeletrólítico de um organismo, com uma atuação que se inicia dentro de minutos a horas, e tendo como principais controladores os mecanismos neurais da sede e do apetite por sal, o sistema rins-líquidos corporais e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (LENT, 2002; GUYTON; HALL, 2011). A ingestão de sal e água possui grande impacto na pressão arterial, basicamente porque a osmolaridade e o volume do meio extracelular possuem relação direta com a volemia. Portanto, o controle da sede e do desejo por sal realizado pelo sistema nervoso central, com base nas informações captadas por osmorreceptores e mecanorreceptores que monitoram a osmolaridade e o volume do sangue, é particularmente importante para manter o equilíbrio hidrossalino e, conseqüentemente, a pressão arterial de um indivíduo (LENT, 2002).

Apesar do controle da ingestão hidrossalina, há situações em que o volume sanguíneo aumenta em demasia e eleva a pressão arterial, o que induz um aumento na excreção de sais e água pelos rins – a chamada natriurese e diurese por pressão. Esse aumento na excreção de sal e água tende a normalizar a pressão arterial, e ocorre pelo simples fato de a intensidade da filtração glomerular ser diretamente proporcional à pressão de perfusão sanguínea dos rins (GUYTON; HALL, 2011). Concomitantemente atua a vasopressina, hormônio hipofisário cuja quantidade secretada é inversamente proporcional à pressão arterial. Esse hormônio reduz a excreção hídrica renal por favorecer a reabsorção de água nos túbulos dos néfrons, o que resulta em uma atenuação da perda de volume sanguíneo em situações de hipotensão. Além de restringir a queda pressórica derivada da perda de volume sanguíneo, a vasopressina ainda suscita uma moderada vasoconstrição sistêmica que aumenta a pressão arterial. Como praticamente não há secreção de vasopressina quando a pressão arterial está elevada, a excreção hídrica renal não se encontra inibida por esse hormônio nesses momentos (KLABUNDE, 2011).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona completa os principais mecanismos de regulação a longo prazo da pressão arterial. A cascata de reações desse sistema se inicia com a secreção de renina pelas células justaglomerulares renais em períodos de hipotensão. Essa enzima é secretada na corrente sanguínea e age sobre o angiotensinogênio plasmático dando origem à angiotensina I, que por sua vez é convertida em angiotensina II por uma enzima especializada presente no endotélio dos vasos sanguíneos pulmonares. A angiotensina II tem poderosa ação vasoconstritora, ela também inibe a excreção hidrossalina renal e induz a liberação de aldosterona pelo córtex da adrenal – hormônio que também possui efeito inibitório sobre a excreção renal de sal e água (KLABUNDE, 2011).

Apesar da existência de pouca informação sobre a presença dos mecanismos até aqui mencionados em espécies não pertencentes à classe dos mamíferos, é sabido que todos os vertebrados osmorreguladores possuem formas de manter o balanço hidroeletrolítico de seu organismo, realizando um controle a longo prazo da pressão arterial por meio da modulação da ingestão e excreção de sal e água (HILL et al., 2012).

Diferentemente dos mecanismos que atuam a longo prazo, a regulação a curto prazo da pressão arterial opera dentro de milissegundos a minutos, e é mediada exclusivamente pelo sistema nervoso autônomo. Também conhecida por barorreflexo, tal regulação tem início no monitoramento da pressão arterial por barorreceptores, os quais possuem conexões neurais aferentes para o cérebro, e proveem constantemente ao sistema nervoso central informações sobre o estado dessa variável. Qualquer aumento ou redução da pressão em relação a seu ponto de funcionamento normal promove uma resposta extremamente rápida, caracterizada principalmente por: (1) alteração da frequência cardíaca e da força contrátil do coração, de forma a modular a quantidade de sangue que esse órgão envia para a circulação a cada minuto, o chamado débito cardíaco; (2) vasodilatação ou vasoconstrição sistêmica, que tendem a retornar a pressão arterial ao seu estado normal modificando a resistência vascular (figura 2) (KLABUNDE, 2011).

A taquicardia, a bradicardia e as regulações vasomotoras associadas aos barorreflexos são respostas induzidas pelo sistema nervoso autônomo através de duas vias antagônicas, a simpática e a parassimpática, que operam respectivamente por meio da liberação de noradrenalina e acetilcolina pelas suas terminações nervosas (RANDALL et al., 2000). O aumento reflexo da pressão arterial é ocasionado por uma diminuição do tônus parassimpático cardíaco aliado a uma ampliação do tônus simpático cardíaco e vascular, que resulta em vasoconstrição sistêmica e elevação da frequência cardíaca / força de contratilidade miocárdica. Em contrapartida, a redução reflexa da pressão arterial é consequência dos efeitos inversos (figura 2) (KLABUNDE, 2011).

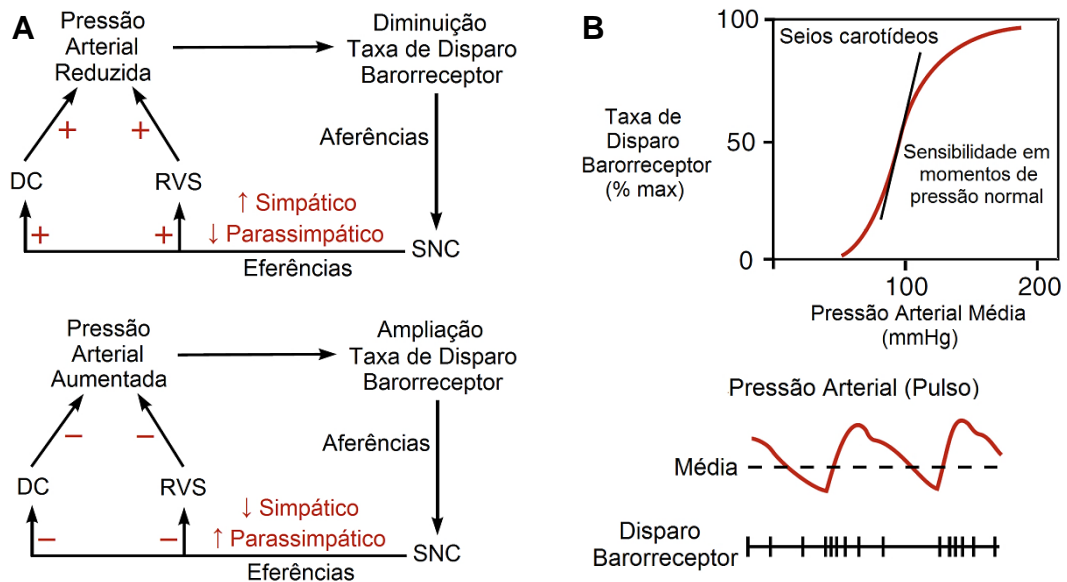


Figura 2. Esquema demonstrando as alças de retroalimentação do barorreflexo frente às situações de pressão arterial reduzida e aumentada (A), e os efeitos das modificações da pressão arterial na taxa de disparo dos barorreceptores carotídeos de mamíferos (modo pelo qual esses receptores se comunicam com o sistema nervoso central) (B). DC: débito cardíaco; RVS: resistência vascular sistêmica; SNC: sistema nervoso central. Fonte: adaptada de Klabunde (2011).

Tais respostas são desencadeadas pela interação da noradrenalina e da acetilcolina com receptores específicos, particularmente os α_1 -adrenérgicos, β_1 -adrenérgicos e os muscarínicos-colinérgicos – sendo que os dois primeiros apresentam afinidade pela noradrenalina e o último pela acetilcolina. Os receptores α_1 -adrenérgicos estão localizados na vasculatura sistêmica e quando estimulados promovem vasoconstrição, já os receptores β_1 -adrenérgicos e muscarínicos-colinérgicos são encontrados no coração e modulam a frequência cardíaca, aumentando-a ou diminuindo-a, respectivamente, quando estimulados (RANG et al., 2007).

A atuação do barorreflexo é tão rápida e eficiente que até mesmo alterações mínimas na pressão arterial, derivadas de oscilações praticamente irrisórias na demanda por fluxo sanguíneo de algum órgão ou tecido, induzem modificações cronotrópicas que podem ocorrer no período compreendido entre um batimento do coração e outro. Assim, como as demandas por fluxo sanguíneo de órgãos e tecidos oscilam constantemente, o mesmo acontece com a frequência cardíaca por conta do barorreflexo, constituindo diferenças no tempo de duração de cada ciclo cardíaco – a chamada variabilidade de curto prazo (ou de alta frequência) da frequência cardíaca. Há outros fatores que também podem exercer grande influência sobre essa variabilidade, tais como a arritmia sinusal respiratória e o quimiorreflexo, porém o barorreflexo constitui um de seus componentes majoritários (ALTIMIRAS, 1999).

Finalmente, ressalta-se que a regulação a curto prazo da pressão arterial parece ser evolutivamente conservada nos vertebrados, atuando como acima descrito em uma grande quantidade de animais dos táxons inclusos nesse subfilo, excetuando-se os ciclostomados (BAGSHAW, 1985; WEST; VAN VLIET, 1994; NILSSON, 2011; TAYLOR et al., 2014).

1.4 – O BARORREFLEXO E AS REGIÕES BAROSENSÍVEIS EM PEIXES

As primeiras suspeitas acerca da existência do barorreflexo em peixes são advindas de trabalhos que verificaram a ocorrência de bradicardia em resposta a estimulações branquiais em elasmobrânquios e teleósteos. McWilliam (1885) observou que estimulações elétricas, mecânicas, químicas e térmicas nas brânquias de *Anguilla anguilla* induzia uma bradicardia reflexa de origem autonômica, a qual podia ser abolida por desnervações branquiais. Similarmente, Lutz (1930) constatou que estimulações elétricas e mecânicas realizadas nas brânquias e no coração de *Scyllium canicula* também resultavam em uma bradicardia transiente, determinada por um aumento na atividade parassimpática vagal.

Após alguns anos, valendo-se de uma metodologia que permitia a manipulação da perfusão sanguínea nas brânquias, Lutz e Wyman (1932a) demonstraram a ocorrência de uma redução na frequência cardíaca relacionada ao aumento abrupto da pressão de perfusão branquial em *Squalus acanthias*. Quase concomitantemente, Irving et al. (1935) revelaram uma proporcionalidade direta entre a taxa de disparo das inervações branquiais e a pressão arterial em *S. acanthias* e *Mustelo canis*, que de acordo com os resultados de Sudak e Wilber (1960), Opdyke et al. (1972) e Ogilvy e Dubois (1982) não parece ter relação com mecanismos de controle pressórico. Décadas depois, Mott (1951) deu continuidade à pesquisa de McWilliam (1885), confirmando que a estimulação elétrica das inervações branquiais ou do ramo cardíaco do vago não só incitava uma bradicardia, mas também diminuía a pressão arterial em *A. anguilla*.

Apesar dos estudos supracitados fornecerem poucos indícios que relacionem os fenômenos observados com o barorreflexo, eles evidenciaram a existência de um controle rápido da frequência cardíaca em elasmobrânquios e teleósteos, que é essencial para a ocorrência de regulação a curto prazo da pressão arterial – além da possível presença de barorreceptores nas brânquias. As primeiras evidências que sugeriram a presença de controle a curto prazo da pressão arterial em peixes foram resultantes de observações secundárias, feitas durante estudos farmacológicos que possuíam outros objetivos centrais. Esses estudos verificaram, em *Oncorhynchus kisutch*, *O. nerka*, *Ophiodon elongatus* e *Gadus morhua*, que administrações de agonistas adrenérgicos produziam um aumento na pressão arterial que era seguido de uma bradicardia transitória de origem parassimpática (RANDALL; STEVENS, 1967; STEVENS et al., 1972; HELGASON; NILSSON, 1973) – algo que foi corroborado posteriormente por Wood e Shelton (1980).

Nesse meio tempo, Ristori (1970) e Ristori e Dessaux (1970) induziram um aumento na pressão sanguínea intrabranquial em *Cyprinus carpio* e mostraram que tal manipulação resultava em uma bradicardia reflexa, a qual era passível de abolição pelo antagonista muscarínico-colinérgico atropina ou pela desnervação do ramo cardio-visceral do vago. Um resultado similar foi obtido mais tarde por Sandblom e Axelsson (2005), que por meio de oclusões temporárias das aortas ventral e dorsal, reduziam e aumentavam a pressão sanguínea intrabranquial de *O. mykiss*, produzindo uma taquicardia ou bradicardia reflexa. Juntos, esses estudos indicaram que, assim como Lutz (1930) e Lutz e Wyman (1932a) haviam demonstrado para elasmobrânquios, a possível localização dos barorreceptores em teleósteos seria os arcos branquiais.

Bagshaw (1985) comenta que as artérias carótidas e os corpos aórticos são as áreas responsáveis pela barorrecepção na maioria dos vertebrados terrestres, cujas aferências são constituídas pelos nervos glossofaríngeo e vago. Essas áreas barossensíveis originam-se, respectivamente, do terceiro e quarto arcos faríngeos embrionários, os quais também dão origem aos dois primeiros arcos branquiais dos peixes – estruturas homólogas que compartilham inclusive as mesmas inervações (nervos glossofaríngeo e vago) (MILSOM; BURLESON, 2007). Assim sendo, caso os barorreceptores dos peixes estejam de fato localizados nas brânquias, a homologia comentada acima permitirá a realização de importantes inferências acerca da evolução da barorrecepção em vertebrados.

A despeito dos esforços, ainda há muito que se investigar acerca do controle a curto prazo da pressão arterial em peixes, inclusive no que diz respeito à localização de seus barorreceptores, pois apesar de grande parte dos estudos acima indicarem as brânquias como provável sítio barossensível, essa questão ainda se mantém pouco elucidada e controversa.

Tal controvérsia é estabelecida pelo fato de estimulações realizadas diretamente nas brânquias ou em suas inervações, como na metodologia de McWilliam (1885), Lutz (1930) e Mott (1951), serem capazes de induzir bradicardia por conta da excitação das aferências de quimiorreceptores branquiais, visto que os mesmos podem desencadear tal resposta quando estimulados em algumas espécies (FLORINDO et al., 2006; LEITE et al., 2007; LOPES et al., 2010). Além disso, a manipulação direta da pressão sanguínea intrabranquial, como realizada por Lutz e Wyman (1932a), Ristori (1970), Ristori e Dessaux (1970) e Sandblom e Axelsson (2005), não se trata de uma metodologia adequada para verificar se os barorreceptores são exclusivamente branquiais, pois manipulações pressóricas nessa região também alteram a pressão de toda a vasculatura anterior e posterior a elas, onde pode haver barorreceptores.

Dessa forma, a presente pesquisa se insere no contexto com o principal objetivo de verificar se os barorreceptores realmente se localizam exclusivamente nos arcos branquiais de um teleósteo (o tambaqui, *Colossoma macropomum*), por meio do emprego de uma metodologia mais adequada que aquelas utilizadas até então. Contribuindo para a elucidação dos mecanismos de controle a curto prazo da pressão arterial em peixes, resolução de controvérsias e entendimento da evolução da barorrecepção.

1.5 – ACERCA DO MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

O tambaqui é um teleósteo que habita as planícies aluviais da bacia amazônica, ambiente muito susceptível à hipóxia (figura 3). A concentração de oxigênio presente nos corpos d'água dessa bacia geralmente é comprometida pela eutrofização derivada da grande quantidade de matéria orgânica ali presente, e somado a isso, a vegetação extremamente densa da Amazônia muitas vezes tem efeito inibitório sobre a fotossíntese aquática (KRAMER et al., 1978). Florindo et al. (2006) e Sundin et al. (2000) demonstraram que, assim como outros teleósteos, os tambaquis apresentam uma forte redução da frequência cardíaca quando submetidos à hipóxia, condição que pode reduzir o débito cardíaco e gerar uma drástica hipotensão nesses animais. Porém, de acordo com os resultados de Sundin et al. (2000), a pressão sistêmica do tambaqui é minimamente afetada pela bradicardia hipóxica, o que caracteriza esse animal como um excelente barorregulador e, conseqüentemente, um modelo experimental que está em consonância com o Princípio de August Krogh para estudos que envolvem regulação a curto prazo da pressão arterial em peixes (KREBS, 1975).

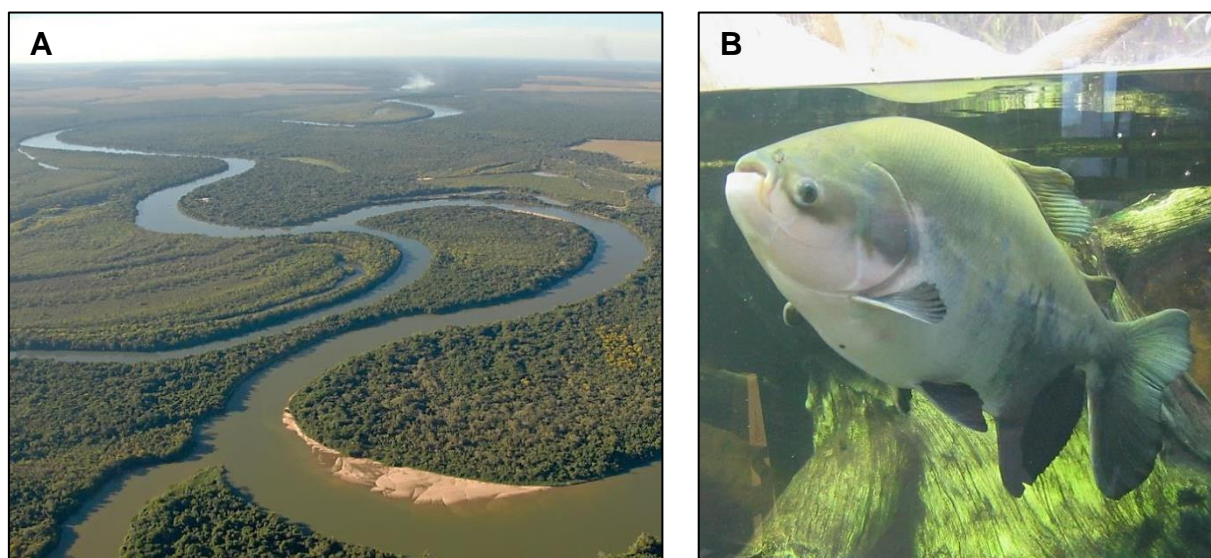


Figura 3. Fotografia da bacia hidrográfica amazônica (A) e de um exemplar adulto de tambaqui, *Colossoma macropomum* (B). Fonte: (A) <<http://www.america.de/wp-content/uploads/rio-purus.jpg>> Acesso em janeiro de 2015; (B) <GNU – General Public Licence>.

Outro motivo para a escolha dessa espécie se sustentou no fato de que o recente aumento da temperatura global pode modificar severamente os corpos d'água que os tambaquis habitam. Essa condição eleva a atividade e a abundância de uma grande variedade de microrganismos aquáticos, o que resulta em uma redução ainda maior na concentração de oxigênio e em uma ampliação da disponibilidade de metabólitos bacterianos tóxicos na água, como o sulfeto de hidrogênio (AFFONSO et al., 2002; ANTTILA et al., 2013). Além disso, o calor também promove um aumento no metabolismo dos peixes, o que juntamente a possíveis contaminações ambientais com xenobióticos, podem induzir profundas alterações nas demandas teciduais por fluxo sanguíneo, de forma a comprometer a estabilidade do sistema cardiovascular desses animais. Contudo, o melhor entendimento da fisiologia dessa espécie torna-se muito importante para a fundamentação de estudos posteriores relacionados à tolerância desse peixe às mudanças ambientais e à sua conservação.

2 – OBJETIVOS

- a. Determinar a localização dos barorreceptores em *Colossoma macropomum*, verificando se os mesmos são intrabranquiais, extrabranquiais ou de localização mista.
- b. Caso sejam estritamente branquiais ou de localização mista, investigar a possibilidade de os mesmos se encontrarem restritos a um único arco branquial ou dispersos por todos os arcos branquiais.
- c. Confirmar se as aferências da barorrecepção correspondem aos nervos glossofaríngeo e vago (cranianos IX e X), assim como na maioria dos vertebrados.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – OS ANIMAIS

Foram utilizados 32 espécimes de *C. macropomum* (Cuvier, 1818) de ambos os sexos, com massa de $229,7 \pm 6,8$ gramas (média \pm EPM), obtidos no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). Os animais passaram por um período de aclimatação mínimo de dois meses em tanques de 500 litros sob fotoperíodo natural, abastecidos com água sem cloro, normóxica (apresentando uma pressão parcial de oxigênio próxima de 140 mmHg, mantida por meio de aeração constante), com potencial hidrogeniônico de aproximadamente 6,5 e temperatura que oscilava entre 20°C e 30°C. A água dos tanques era substituída a cada 72 horas e a densidade populacional máxima por tanque de criação foi de 10 indivíduos.

Os animais foram alimentados até a saciedade em dias alternados com ração comercial para peixes (32% de proteína), exceto nas 72 horas que precediam a realização dos experimentos, de forma a evitar a eliminação de fezes na câmara experimental e impedir a ocorrência de alterações metabólicas decorrentes da digestão. Além disso, devido a possíveis influências das variações ambientais sazonais nas variáveis fisiológicas da espécie estudada, os experimentos foram suspensos durante o inverno. A presente pesquisa foi realizada no campus de São José do Rio Preto da Universidade Estadual Paulista (UNESP), mais especificamente no Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados do Departamento de Zoologia e Botânica. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição supracitada (Protocolo 056/2013).

3.2 – PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS

Para indução anestésica, os peixes foram mantidos submersos em solução aquosa de benzocaína (100 mg.l^{-1}) até apresentarem perda de equilíbrio e ausência de movimentos operculares. Posteriormente, eles foram transferidos para uma mesa cirúrgica com um sistema de recirculação de solução de benzocaína, aerada e de concentração menor que a anterior (50 mg.l^{-1}), a qual irrigava as brânquias dos animais constantemente para manter a anestesia. Então, dois eletrodos-agulha de eletrocardiograma foram implantados nos peixes, o primeiro (+) ventralmente entre os opérculos e o coração, e o segundo (-) lateralmente alguns centímetros acima da nadadeira pélvica – como descrito por Glass et al. (1991). Objetivando-se

a administração de fármacos, uma cânula PE20 preenchida com solução salina 0,9% foi inserida na cavidade peritoneal dos animais através de uma punção por agulha realizada um centímetro abaixo do eletrodo de referência, de acordo com os procedimentos empregados por McKenzie et al. (2007). Tanto os eletrodos quanto a cânula foram suturados à pele dos animais (Figura 4).



Figura 4. Fotografia de um exemplar de *Collossoma macropomum* obtida logo após o término da implantação dos eletrodos de eletrocardiograma e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está conectado ao cabo vermelho, enquanto o eletrodo de referência (-) está conectado ao cabo branco. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta. A pequena mangueira inserida na cavidade oro-branquial fornece ao peixe solução de benzocaína aerada, mantendo a anestesia e as trocas gasosas do mesmo. Fonte: elaborada pelo autor.

Depois da implantação dos eletrodos de eletrocardiograma e da cânula intraperitoneal, o opérculo dos animais foi mantido aberto com um afastador autostático e uma pequena incisão foi realizada no epitélio do teto opercular logo acima do primeiro e segundo arcos branquiais, permitindo acesso às inervações das brânquias – nervo craniano IX (glossofaríngeo) e nervo craniano X (vago) (Figura 5AB). Para a desnervação do primeiro arco branquial (grupo G1, $N = 8$), o nervo craniano IX e o ramo pretremático do nervo craniano X que inerva o referido arco foi cuidadosamente exposto e cortado com uma tesoura oftalmológica (Figura 5 CD). Semelhantemente, para desnervação branquial completa (grupo G4, $N = 8$), as inervações de todos os arcos branquiais foram expostas e seccionadas (nervo craniano IX e ramo pretremático do nervo craniano X que inerva os quatro arcos branquiais) (Figura 5 EF). No grupo intacto (grupo IN, $N = 8$) a cavidade opercular não passou por nenhum procedimento.

Houve também a preparação de outros dois grupos experimentais, o sham-operated (grupo SH, $N = 4$) e o veículo (grupo VE, $N = 4$). No primeiro as inervações branquiais foram expostas e não transeccionadas, enquanto no segundo a cavidade opercular e as inervações foram mantidas intactas. É importante salientar que *C. macropomum* não apresenta pseudobrânquias, e que os ramos cardíaco e visceral do nervo vago foram mantidos intactos em todos os casos (Figura 5 A-F). Os métodos para desnervação foram inteiramente baseados nos estudos de Sundin et al. (2000), Milsom et al. (2002), Florindo et al. (2004) e Florindo et al. (2006). Ao final dos experimentos, todas as desnervações foram confirmadas *post-mortem* por autópsia e fotografadas.

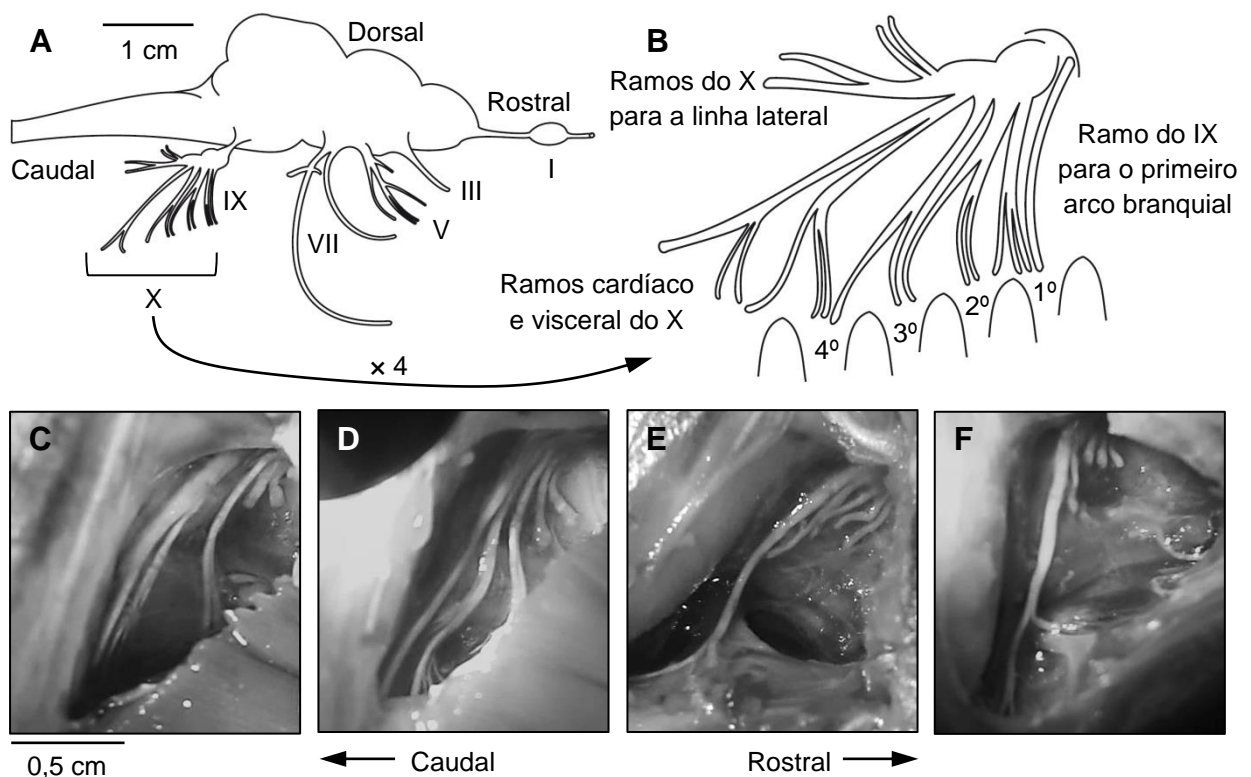


Figura 5. Esquema do encéfalo e nervos cranianos de tambaqui (A), com os nervos glossofaríngeo (IX) e vago (X) em detalhe (B). As fotografias das autópsias mostram que no grupo G1 o nervo glossofaríngeo e o primeiro ramo do nervo vago foram seccionados bilateralmente (C) (D), enquanto que no grupo G4 os nervos seccionados foram o glossofaríngeo e todos os ramos branquiais do vago (E) (F). Fonte: adaptado de Milsom et al. (2002).

Ao findar dos procedimentos supracitados os animais foram transferidos para câmaras experimentais individuais com volume de 20 litros (20 cm X 50 cm X 20 cm), abastecidas com água sem cloro, normóxica (apresentando uma pressão parcial de oxigênio próxima de 140 mmHg, mantida por meio de aeração constante), com potencial hidrogeniônico de aproximadamente 6,5 e temperatura de $25,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (média \pm EPM; mantida com auxílio de um aquecedor com termostato). Essa água era constantemente renovada a uma taxa de $100 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para evitar o acúmulo de qualquer metabólito na mesma, e o fotoperíodo dos animais foi mantido permitindo-se a entrada de luz solar pelas janelas do laboratório.

Em prosseguimento, os eletrodos fixados aos peixes foram conectados a um sistema de aquisição de dados BIOPAC MP36, o qual permitiu a aquisição contínua do eletrocardiograma dos mesmos (Figura 6) – coletado a uma taxa de amostragem de 1000 Hz, com um filtro passa-altos de 10 Hz para eliminar a interferência da respiração no sinal. O cabo de aterramento do eletrocardiograma era acoplado a uma placa de aço inoxidável localizada no fundo da câmara experimental. Logo após o término dos procedimentos pré-experimentais, os quais foram realizados em ~25 minutos, os animais passaram por um período de recuperação pós-cirúrgica de 24 horas anteriormente ao início dos experimentos.

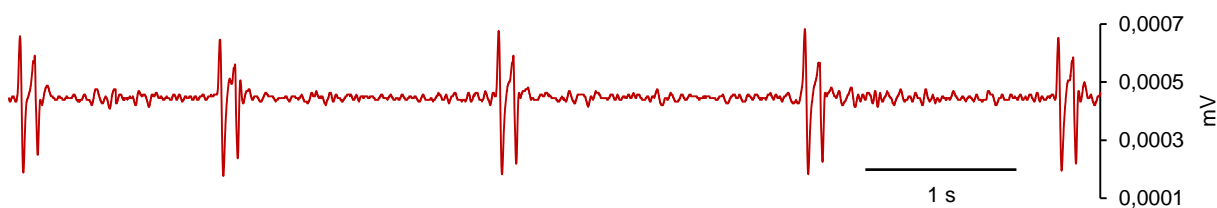


Figura 6. Eletrocardiograma de *C. macropomum* intacto e não tratado. Fonte: elaborada pelo autor.

3.3 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Posteriormente a recuperação pós-cirúrgica, o eletrocardiograma dos animais foi coletado e monitorado até que a frequência cardíaca (f_H) dos mesmos permanecesse constante por 30 minutos. Logo após, $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ do agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina (Sigma-Aldrich – concentração de $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$) foi administrado *in bolus* via cânula intraperitoneal, seguido da infusão de 0,4 ml de solução salina isotônica para que o fármaco não ficasse contido no interior da mesma, e a aquisição do eletrocardiograma perdurou por mais 15 minutos. Posteriormente, os animais foram submetidos a outro período de recuperação de 24 horas para que as variáveis fisiológicas dos mesmos retornassem aos valores observados antes da administração farmacológica.

No dia seguinte, o eletrocardiograma dos animais foi novamente monitorado por 30 minutos verificando-se a estabilidade da f_H , e logo em seguida 1 mg.kg^{-1} do antagonista α_1 -adrenérgico prazosina (Sigma-Aldrich – concentração de $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) foi administrado *in bolus* via cânula intraperitoneal, também sucedido de 0,4 ml de solução salina isotônica e 15 minutos de aquisição de dados. As administrações de fenilefrina e prazosina tiveram a finalidade de induzir desequilíbrios na pressão arterial dos animais (aumentá-la e reduzi-la, respectivamente) para que a via cronotrópica do barorreflexo pudesse ser observada. Os grupos IN, G1 e G4 foram submetidos ao protocolo experimental até aqui descrito – assim como o grupo SH, com o qual se objetivou verificar se a simples exposição das inervações branquiais ao ambiente externo não produzem efeito nas variáveis e respostas observadas.

Para verificar se houveram efeitos induzidos pelo excipiente dos fármacos utilizados ou pelo estresse relacionado à administração dos mesmos, o grupo VE foi submetido a um protocolo experimental praticamente idêntico ao acima descrito, apenas substituindo-se a infusão de fenilefrina e prazosina pelos seus veículos puros. A administração de fenilefrina foi substituída por 1 ml.kg⁻¹ de solução salina isotônica, enquanto a de prazosina foi substituída por 2 ml.kg⁻¹ de solução salina isotônica alcoólica (5%). Todo o delineamento experimental encontra-se resumido no esquema abaixo (Figura 7).

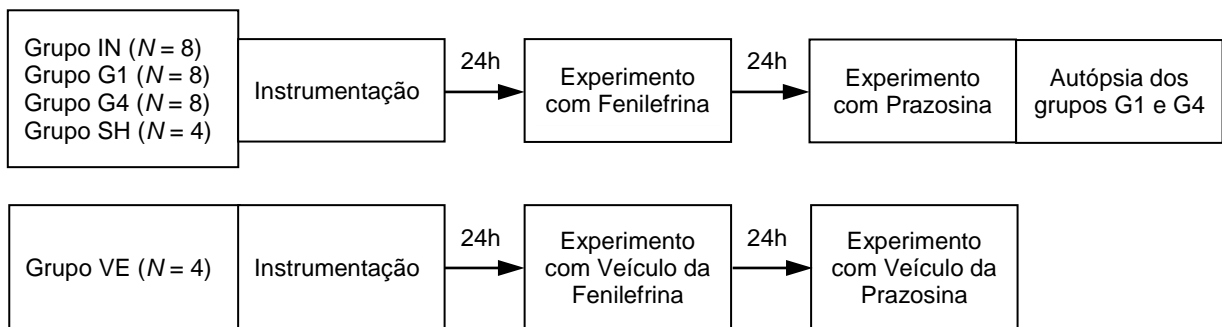


Figura 7. Representação esquemática demonstrando os grupos experimentais, o número de réplicas em cada grupo (N) e a ordem do protocolo experimental com os tempos de recuperação. Fonte: elaborada pelo autor.

3.4 – ANÁLISE DAS RESPOSTAS BARORREFLEXAS

As respostas barorreflexas induzidas pelas infusões farmacológicas foram analisadas, em todos os grupos experimentais, de diversas maneiras. Inicialmente, a f_H dos animais foi derivada do eletrocardiograma e os valores foram plotados em gráficos descritivos, para permitir uma observação completa dos resultados obtidos durante todo o protocolo experimental. Após, a média dos cinco minutos que antecederam as administrações farmacológicas e o valor de maior modificação na f_H contido nos cinco minutos que sucederam tais administrações (menor f_H para o experimento com fenilefrina e maior f_H para o experimento com prazosina) foram plotados em gráficos comparativos e utilizados na realização dos métodos estatísticos inferenciais. Ainda levando em conta esses valores, foi calculado para cada fármaco e grupo experimental, o valor da f_H pós-administração farmacológica em relação à f_H pré-administração, em porcentagem, por meio da equação abaixo – o que oportunizou a análise das respostas barorreflexas sem a interferência das influências que as desnervações possuem na f_H .

$$\frac{f_H \text{ pós administração farmacológica}}{f_H \text{ pré administração farmacológica}} \times 100 (\%)$$

Como uma forma de acessar a eficiência do reflexo barostático, o tempo necessário para que as respostas cronotrópicas induzidas pelos desbalanceamentos pressóricos atingissem o seu máximo também foi analisado, observando-se o tempo compreendido entre as infusões farmacológicas e a maior modificação na f_H contida nos cinco minutos após tais infusões (menor f_H para o experimento com fenilefrina e maior f_H para o experimento com prazosina).

Por fim, considerando a relação existente entre o barorreflexo e a variabilidade da f_H , foi calculado o desvio padrão da duração dos intervalos R-R contidos nos cinco minutos que antecederam as manipulações farmacológicas e nos cinco minutos que as sucederam, como método para se mensurar o quanto a f_H variou (batimento a batimento) nesses momentos. É conveniente notar que os dados contidos além dos cinco minutos que prosseguem as infusões farmacológicas não foram utilizados em nenhuma análise, padronização que foi estabelecida para assegurar que quaisquer mecanismos de controle a longo prazo da pressão arterial não exercessem influência nas variáveis estudadas.

3.5 – TRATAMENTO ESTATÍSTICO (INFERENCIAL) DOS DADOS

Todas as variáveis estudadas foram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($p \geq 0,1$) e por ele definidas como paramétricas, além disso, assumiu-se que tais dados são homocedásticos. Desse modo, os outros procedimentos estatísticos adotados no presente estudo foram:

- A análise de variância one-way, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, que foi utilizada para se comparar as variáveis observadas nos grupos IN, G1 e G4 (uma análise para cada variável).
- A análise de variância one-way, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, que foi utilizada para se comparar as variáveis observadas nos grupos IN, SH e VE (uma análise para cada variável).

Em ambos os casos, na análise da f_H pós-administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré-administração farmacológica (f_H pós-administração / f_H pré-administração $\times 100$), os dados também foram comparados à uma linha de base de 100% – referente à ausência de modificação na f_H derivada da intervenção farmacológica. Um p de 0,05 foi empregado em todas as análises de variância. O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando-se o software InStat 3.0 (GraphPad Inc.) e os gráficos foram desenhados com auxílio do software Prism 5.0 (GraphPad Inc.). Todos os dados foram expressos como média \pm EPM.

4 – RESULTADOS

4.1 – GRUPOS IN, G1 E G4

Os gráficos descritivos abaixo (figura 8) mostram que a aplicação de fenilefrina promoveu uma bradicardia reflexa nos animais intactos (IN) e nos animais com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1), enquanto a de prazosina induziu uma taquicardia nos mesmos. Naqueles indivíduos com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4), a infusão de fenilefrina não provocou alteração na f_H , porém, a de prazosina suscitou uma redução gradativa da f_H que se estabeleceu ao longo dos 15 minutos subsequentes à manipulação farmacológica; um teste t pareado bicaudal ($p \leq 0,05$) revelou que essa bradicardia é estatisticamente significativa. Também é possível observar nestes gráficos que a f_H dos grupos IN e G1 são semelhantes, ao passo que a do grupo G4 encontra-se mais elevada.

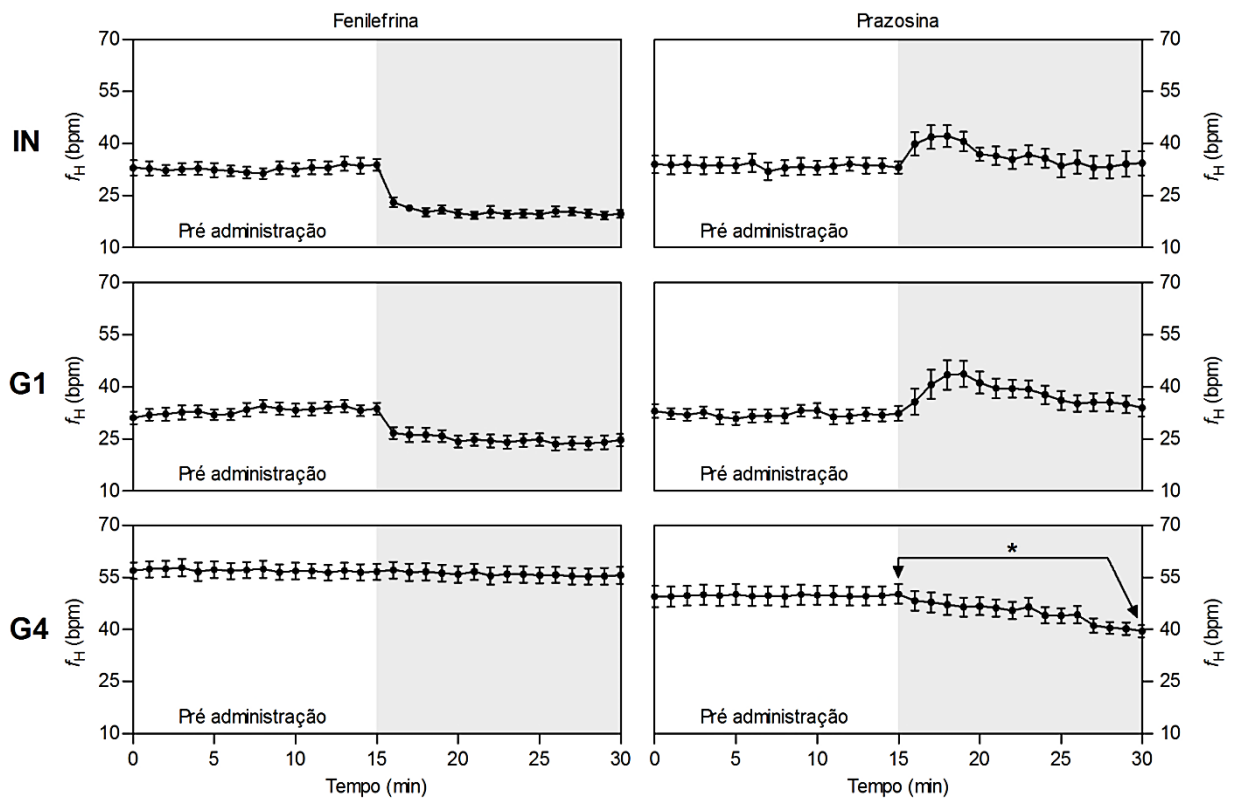


Figura 8. Gráficos descritivos mostrando a frequência cardíaca (f_H) dos animais intactos (IN), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). O asterisco indica diferença significativa entre a f_H anterior à administração de prazosina e a f_H quinze minutos após a administração da mesma (Teste t pareado bicaudal; $p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pelo autor.

Na figura 9 encontram-se expostos os valores da f_H antes e depois das administrações farmacológicas nos grupos IN, G1 e G4. Os animais intactos (IN) apresentaram uma f_H basal de $33,5 \pm 1,9$ bpm, a qual reduziu para $19,1 \pm 1,1$ bpm com a infusão de fenilefrina, normalizou após 24 horas ($33,6 \pm 2,0$ bpm), e aumentou para $45,3 \pm 3,1$ bpm com a infusão de prazosina. De forma muito similar, os animais do grupo G1 expressaram uma f_H inicial de $33,8 \pm 1,6$ bpm, que decresceu para $23,8 \pm 1,5$ bpm em resposta a fenilefrina, retornou aos valores prévios 24 horas depois ($31,9 \pm 1,9$ bpm), e subiu para $45,0 \pm 3,9$ bpm em resposta a prazosina. Por sua vez, os animais do grupo G4 mostraram uma f_H significativamente mais alta que aquela dos demais grupos ($56,6 \pm 2,2$ bpm), a qual permaneceu inalterada independentemente da administração de fenilefrina ($57,1 \pm 2,3$ bpm), do período de 24 horas entre experimentos ($49,8 \pm 7,7$ bpm) e da administração de prazosina ($49,1 \pm 2,6$ bpm).

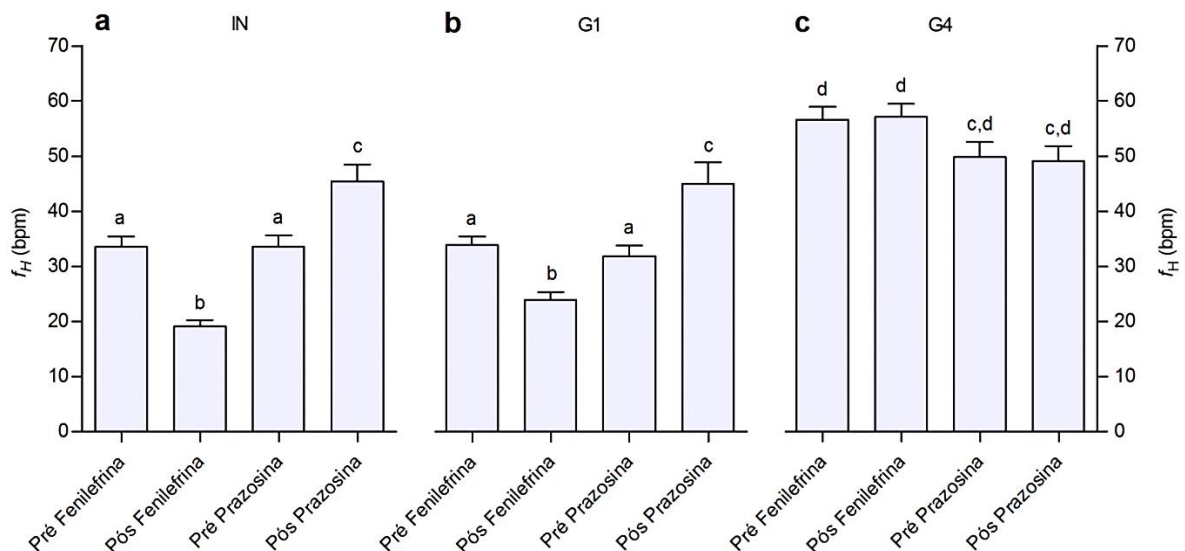


Figura 9. Frequência cardíaca de *Colossoma macropomum* antes e depois das manipulações farmacológicas. O gráfico apresenta informações acerca dos animais intactos (IN) (A), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) (B) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) (C). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pelo autor.

A figura 10 exibe os resultados referentes à análise em porcentagem da f_H . A administração de fenilefrina reduziu a f_H dos animais intactos (IN) para $58,1 \pm 4,3\%$ do valor verificado anteriormente a infusão do fármaco, já a administração de prazosina elevou essa variável para $135,0 \pm 3,5\%$ do valor previamente observado. No grupo G1, a manipulação farmacológica com fenilefrina diminuiu a f_H para $70,4 \pm 3,0\%$ de seu valor inicial, enquanto a manipulação com prazosina a aumentou para $140,6 \pm 9,0\%$. A f_H dos animais com os quatro arcos branquiais desnervados (G4) permaneceu incólume às aplicações das drogas ($98,2 \pm 1,0\%$ pós fenilefrina e $98,9 \pm 2,4\%$ pós prazosina).

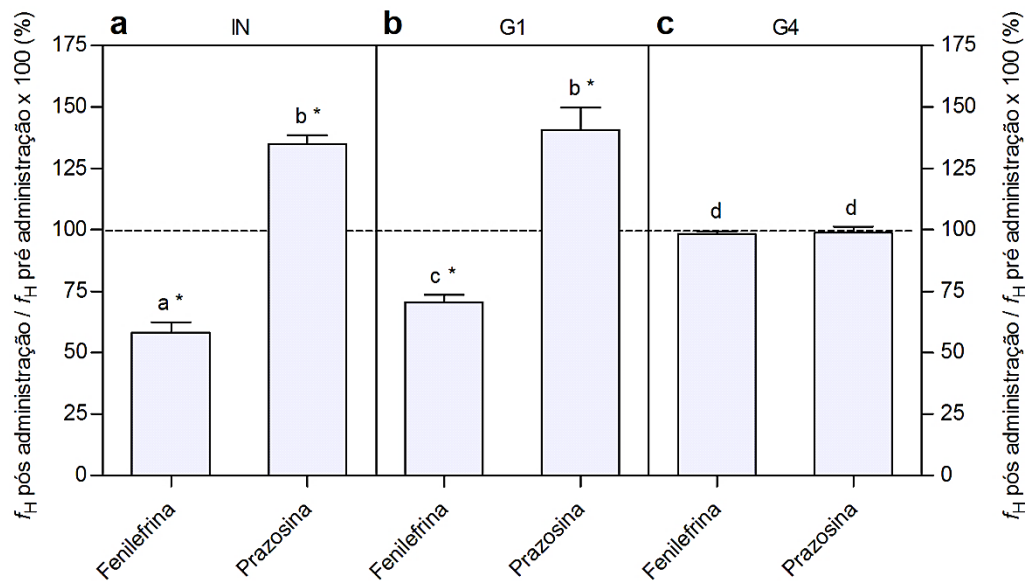


Figura 10. Frequência cardíaca (f_H) pós administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré administração farmacológica (f_H pós / f_H pré X 100), em animais intactos (IN) (A), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) (B) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) (C). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$); Um asterisco indica diferença significativa para com uma linha de base de 100%. Dados expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pelo autor.

Os resultados relativos ao tempo decorrido até a resposta cronotrópica barorreflexa máxima encontram-se plotados no gráfico abaixo (figura 11). Frente à administração de fenilefrina, os indivíduos do grupo IN levaram $110,1 \pm 30,4$ s para atingir o auge da mudança na f_H , enquanto que os indivíduos do grupo G1 levaram $220,0 \pm 26,1$ s. No que concerne a manipulação farmacológica com prazosina, o grupo IN atingiu a pico da resposta em $165,6 \pm 30,6$ s e o grupo G1 em $187,5 \pm 21,2$ s.

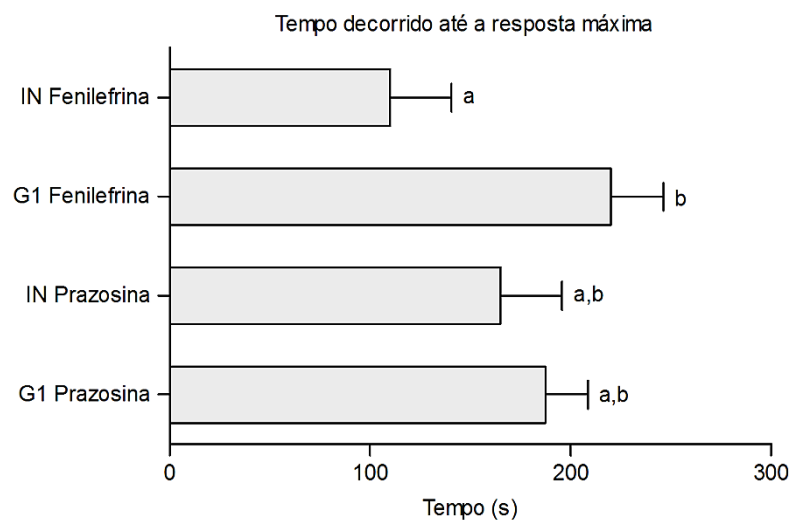


Figura 11. Tempo decorrido até a resposta cronotrópica barorreflexa máxima em animais intactos (IN) e com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Não há dados acerca dos indivíduos submetidos à desnervação dos quatro pares de arcos branquiais (G4) porque esses não apresentaram reflexo barostático. Dados expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados acerca do desvio padrão da duração dos intervalos R-R (variabilidade total da f_H) estão organizados na figura 12. Os indivíduos intactos (IN) manifestaram um desvio padrão de intervalo R-R basal de $531,2 \pm 61,7$ ms, o qual praticamente dobrou após a infusão de fenilefrina ($807,7 \pm 67,9$ ms). Depois das 24 horas de recuperação entre experimentos, esses animais mostraram um desvio padrão de $471,5 \pm 38,0$ ms, que permaneceu praticamente inalterado após a aplicação de prazosina ($418,5 \pm 39,1$ ms).

Anteriormente às manipulações farmacológicas, os animais com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) apresentaram um desvio padrão de $348,4 \pm 31,3$ ms, valor significativamente menor que aquele observado no grupo IN na mesma situação. Esse desvio padrão aumentou para $563,7 \pm 53,9$ ms após a administração de fenilefrina, e no dia seguinte encontrava-se num nível ($417,5 \pm 43,5$ ms) estatisticamente idêntico ao basal dos animais IN. A prazosina não modificou de forma significativa o desvio padrão de intervalo R-R desses animais ($350,4 \pm 38,9$ ms) – no entanto, é interessante notar que esse fármaco tendeu a reduzir a variabilidade da f_H tanto do grupo IN quanto do grupo G1.

Finalmente, os indivíduos com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) demonstraram um desvio padrão de intervalos R-R inicial extremamente reduzido ($64,6 \pm 14,4$ ms), o qual não se alterou significativamente sob nenhuma circunstância. Os valores apresentados foram de $71,9 \pm 15,5$ ms após a fenilefrina, de $105,8 \pm 21,5$ ms anteriormente a prazosina e de $124,2 \pm 45,6$ ms posteriormente a prazosina.

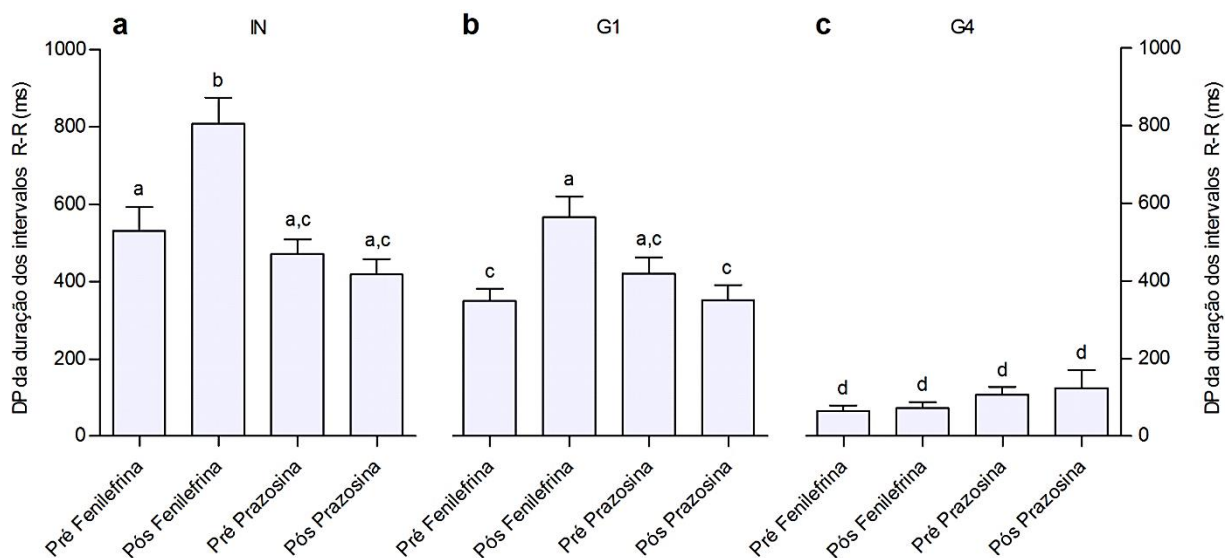


Figura 12. Desvio padrão dos intervalos R-R de *Colossoma macropomum* contidos nos 5 minutos que precederam as manipulações farmacológicas e nos 5 minutos que sucederam tais manipulações (variabilidade total da f_H). O gráfico apresenta informações acerca dos animais intactos (IN) (A), com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) (B) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) (C). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 – GRUPOS SH E VE

Nos gráficos descritivos abaixo (figura 13) encontram-se os resultados dos experimentos realizados com os animais intactos (IN), falso-operados (SH) e tratados com os veículos dos fármacos (VE). Nota-se que os dados referentes ao grupo SH são muito semelhantes a aqueles do grupo IN, ambos demonstrando uma bradicardia reflexa em reação a infusão de fenilefrina e uma taquicardia em reação a prazosina. Também é possível observar que a substituição dos fármacos pelos veículos que os dissolviam não provocou alteração na f_H do grupo experimental VE.

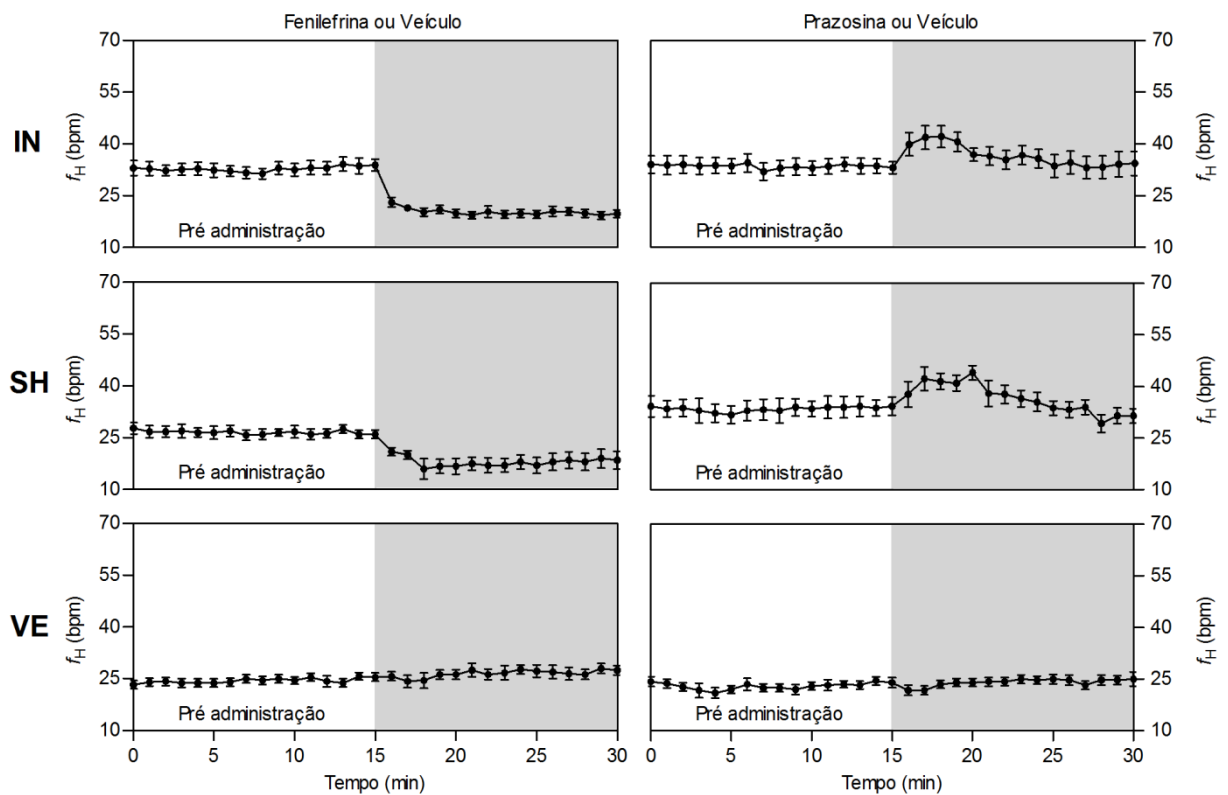


Figura 13. Gráficos descritivos mostrando a frequência cardíaca dos animais intactos (IN), com a inervação branquial exposta (SH) e intactos porém tratados com os veículos dos fármacos (VE). Dados expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser observado nas tabelas 1 a 4, os métodos estatísticos inferenciais não revelaram diferenças significativas entre os grupos IN e SH nas análises da f_H bruta, da f_H em porcentagem, do tempo decorrido até a resposta barorreflexa máxima e do desvio-padrão dos intervalos R-R (variabilidade da f_H). Também é possível observar nessas tabelas que os veículos dos fármacos não induziram alterações nas variáveis do grupo VE.

Tabela 1. Frequência cardíaca dos animais intactos (IN), falso-operados (SH) e tratados com veículo (VE).

	Pré Fenilefrina ou Veículo	Pós Fenilefrina ou Veículo	Pré Prazosina ou Veículo	Pós Prazosina ou Veículo
IN (N = 8)	33,5 ± 1,8 a	19,1 ± 1,1 b,c	33,6 ± 1,9 a	45,3 ± 3,1 d
SH (N = 4)	26,3 ± 1,1 a,b	13,5 ± 1,8 c	34,0 ± 2,8 a	47,2 ± 1,7 d
VE (N = 4)	24,9 ± 1,0 a,c	23,2 ± 2,1 a,c	23,7 ± 1,1 a,c	24,5 ± 0,6 a,c

Dados expressos em média ± EPM. Valores que não compartilham uma letra superscrita apresentam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Frequência cardíaca (f_H) pós-administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré-administração farmacológica (f_H pós-administração / f_H pré-administração × 100) em animais intactos (IN), submetidos à falsa operação (SH) e tratados com veículo (VE).

	Fenilefrina ou Veículo	Prazosina ou Veículo
IN (N = 8)	58,1 ± 4,2 a *	135,0 ± 3,5 b *
SH (N = 4)	50,8 ± 6,1 a *	140,5 ± 7,9 b *
VE (N = 4)	92,7 ± 5,5 c	104,0 ± 4,6 c

Dados expressos em média ± EPM. Valores que não compartilham uma letra superscrita apresentam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); Um asterisco indica diferença estatisticamente significativa para com uma linha de base de 100% ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Tempo necessário (s) para que a respostas barorreflexas cronotrópicas, induzidas pelos desbalanceamentos pressóricos, atingissem o seu máximo. A tabela apresenta dados dos animais intactos (IN) e submetidos à falsa operação (SH) apenas, visto que os animais tratados com veículo (VE) não apresentaram reflexo barostático.

	Fenilefrina ou Veículo	Prazosina ou Veículo
IN (N = 8)	110,0 ± 30,4 a	165,0 ± 30,6 a
SH (N = 4)	124,6 ± 27,1 a	158,3 ± 34,2 a
VE (N = 4)	--	--

Dados expressos em média ± EPM. Valores que não compartilham uma letra superscrita apresentam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Desvio padrão dos intervalos R-R (ms) de *Colossoma macropomum* contidos nos 5 minutos que precederam as manipulações farmacológicas e nos 5 minutos que sucederam tais manipulações. A tabela apresenta dados dos animais intactos (IN), submetidos à falsa operação (SH) e tratados com veículo (VE).

	Pré Fenilefrina ou Veículo	Pós Fenilefrina ou Veículo	Pré Prazosina ou Veículo	Pós Prazosina ou Veículo
IN (N = 8)	531,2 ± 61,7 a	807,7 ± 67,9 b	471,5 ± 38,0 a	418,5 ± 39,1 a
SH (N = 4)	462,8 ± 78,3 a	1327,7 ± 189,3 b	445,9 ± 120,4 a	382,0 ± 63,1 a
VE (N = 4)	552,3 ± 60,8 a	586,1 ± 77,4 a	527,9 ± 71,3 a	563,8 ± 65,2 a

Dados expressos em média ± EPM. Valores que não compartilham uma letra superscrita apresentam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

5 – DISCUSSÃO

5.1 – CRÍTICA AOS MÉTODOS

No presente estudo, é notória a ausência de dados acerca da pressão arterial dos animais, abstenção que é justificada por diversos fatores. A metodologia utilizada para se adquirir tal variável em peixes consiste basicamente em um transdutor de pressão conectado a uma cânula de polietileno inserida numa artéria, em um sentido contrário ao do fluxo sanguíneo. Para que isso possa ser feito necessita-se de uma artéria de fácil acesso, cujos valores da pressão sanguínea reflitam aqueles encontrados nos vasos da circulação central, visto que essa é a responsável por estabelecer o gradiente pressórico que mantém a circulação do sangue por todo o organismo. Na maioria dos estudos em teleósteos e elasmobrânquios, duas artérias geralmente são escolhidas para se aferir a pressão arterial: a artéria branquial aferente e a artéria caudal (figura 14) (AXELSSON; FRITSCHÉ, 1994).

A canulação da artéria branquial aferente trata-se de um procedimento extremamente rápido e eficaz, que inclusive já foi executado anteriormente em *C. macropomum* por Sundin et al. (2000). Todavia, a inserção de uma cânula num vaso sanguíneo de calibre tão pequeno certamente resulta em sua oclusão, o que não é desejável em um estudo que hipotetiza que os barorreceptores localizam-se exclusivamente nas brânquias – mesmo que tal método bloqueie a circulação apenas num único arco branquial.

Do mesmo modo, a canulação da artéria caudal não se mostrou uma alternativa viável, pois para acessar essa artéria, é necessária a exposição lateral do arco hemal da cauda dos animais e a inserção da cânula praticamente às cegas, uma vez que a artéria caudal se localiza muito próxima de sua respectiva veia, dificultando muito a realização desse procedimento em animais de pequeno porte (AXELSSON; FRITSCHÉ, 1994; GILMOUR et al., 2005). A dificuldade dessa prática estende drasticamente o tempo de realização dos procedimentos pré-experimentais, assim como é diretamente relacionada a uma grande chance de ocorrência de hemorragia nesse momento (que altera rapidamente a volemia de indivíduos tão pequenos).

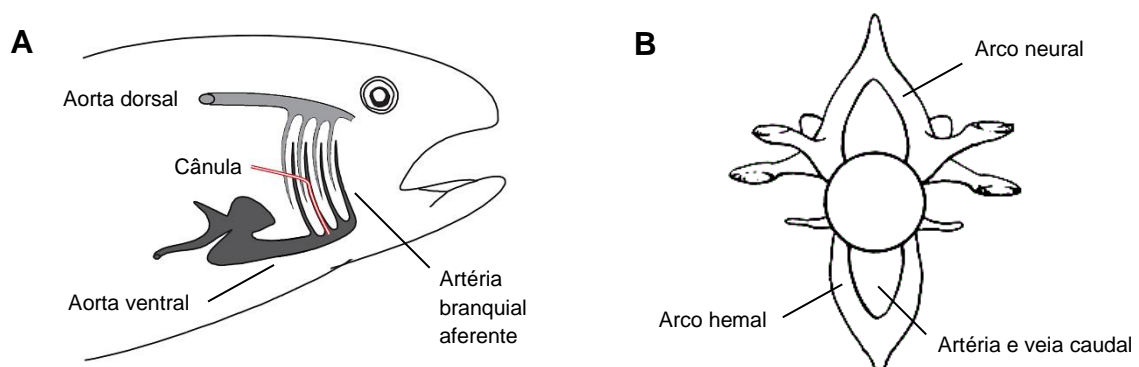


Figura 14. Localização da artéria branquial aferente (A) e do sistema arteriovenoso caudal (B) em teleósteos. Fonte: (A) Imagem modificada de Sandblom e Axelsson (2005); (B) Esquema adaptado de <<http://people.eku.edu/ritchisong/342notes2.htm>> Acesso em janeiro de 2015.

Campbell et al. (2004) realizaram um experimento com o teleósteo *Myoxocephalus scorpius*, em que os mesmos foram anestesiados com metanossulfonato de tricáina e submetidos a uma rápida cirurgia para implantação de eletrodos de eletrocardiograma. Depois, os peixes foram monitorados por 144 horas, adquirindo-se a f_H e sua variabilidade logo após o término do efeito do anestésico e, posteriormente, a cada 24 horas. Os autores observaram que a f_H dos animais encontrava-se elevada ao passo que sua variabilidade era praticamente nula após a cirurgia, e que as influências dos procedimentos pré-experimentais nessas variáveis se esvaíam gradativamente ao longo de 120 horas (figura 15). Assim, considerando que uma variabilidade da f_H inexistente ou reduzida indica ausência ou deficiência na modulação autonômica do coração, aumentar o tempo de instrumentação dos animais para se canular a artéria caudal não pareceu ser factível por conta do que a exposição prolongada ao estresse cirúrgico poderia causar.

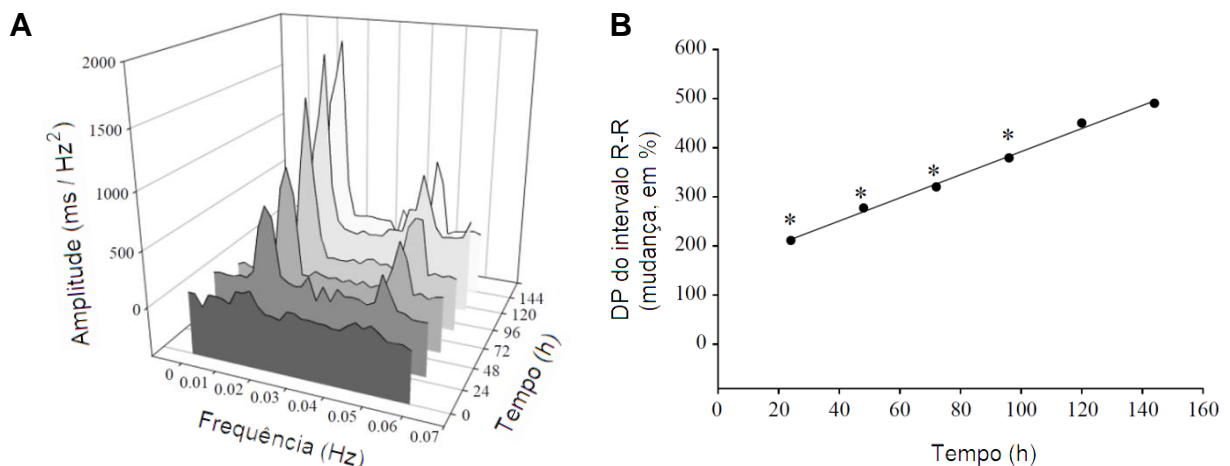


Figura 15. Amplitude espectral da variação dos intervalos R-R em diversos momentos pós-cirúrgicos em *Myoxocephalus scorpius* (A), e a modificação do desvio padrão dos intervalos R-R nesses mesmos momentos (B). A área da amplitude espectral é diretamente proporcional à variabilidade da f_H . Note que tal variabilidade é prejudicada pela cirurgia e retorna a normalidade ao longo de cinco dias. Fonte: Campbell et al. (2004).

Em razão das adversidades discutidas acima, optou-se pela não aquisição da pressão arterial nesse trabalho, como uma maneira de garantir maior confiabilidade nos resultados obtidos. Entretanto, ainda é possível argumentar que sem os valores da pressão arterial, não é possível ter certeza sobre a ocorrência dos efeitos vasomotores esperados com a administração dos fármacos. Contudo, todas as respostas observadas na f_H após as administrações farmacológicas condizem com as características padrões do barorreflexo, as quais são extremamente bem definidas: incitação de bradicardia por um vasoconstritor (fenilefrina) e de taquicardia por um vasodilatador (prazosina). Além do mais, um experimento-piloto realizado com um único animal, inferindo-se a pressão sanguínea na artéria branquial aferente esquerda, demonstrou que os fármacos utilizados realmente eram capazes de induzir os seus efeitos nessa espécie (figura 16).

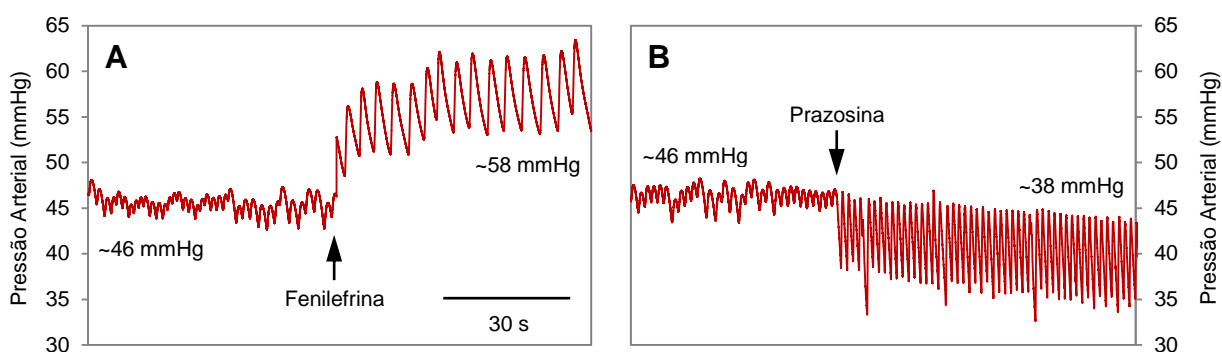


Figura 16. Resultados do experimento-piloto acerca dos efeitos da fenilefrina (A) e prazosina (B) na pressão arterial de tambaqui. Note que a infusão de fenilefrina promoveu um aumento da pressão arterial acompanhado por uma bradicardia (observe a menor quantidade de pulsos pressóricos), enquanto a prazosina induziu uma redução da pressão arterial acompanhada por uma taquicardia. Fonte: elaborada pelo autor.

Outra possível crítica está na utilização de prazosina como fármaco indutor de hipotensão, ao invés do nitroprussiato de sódio que é largamente usado na grande maioria dos estudos sobre barorreflexo. O nitroprussiato de sódio é um sal cuja degradação ocorre rapidamente quando em contato com tecidos biológicos, reação que produz um gás solúvel com potente ação vasodilatadora chamado óxido nítrico – no entanto essa reação também libera cianeto, um agente bloqueador da cadeia respiratória (BATES et al., 1991). Em tambaquis, o cianeto causa uma hipóxia tecidual severa que resulta em forte bradicardia, reflexo inverso àquele induzido pelos barorreceptores frente à queda da pressão arterial (SUNDIN et al., 2000). Com isso, para se evitar a ocorrência de um quimiorreflexo de ação cronotrópica contrária ao do barorreflexo, o nitroprussiato de sódio foi substituído nesse estudo pelo antagonista α_1 -adrenérgico prazosina.

5.2 – O BARORREFLEXO E AS REGIÕES BAROSSENSÍVEIS EM TAMBAQUI

Como observado nos gráficos descritivos e inferenciais, tanto os animais intactos (IN) quanto os animais com o primeiro par de arcos branquiais desnervados (G1) apresentaram notável resposta cronotrópica às manipulações farmacológicas (figuras 8 e 9). Nesses dois grupos, a infusão do vasoconstritor fenilefrina promoveu rapidamente uma bradicardia, ao passo que a administração do vasodilatador prazosina suscitou uma taquicardia (figuras 8 e 9AB). Essas respostas indicam a ocorrência de um aumento e de uma redução na pressão arterial, desencadeados respectivamente pela administração de fenilefrina e prazosina. Os dados também evidenciam que a desnervação bilateral do primeiro arco branquial não aboliu o reflexo barostático apresentado pelos tambaquis.

Os indivíduos com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4), por sua vez, não manifestaram reação cronotrópica reflexa aos efeitos dos fármacos, demonstrando ausência de reflexo barostático (figura 8 e 9C). A única alteração relacionada às manipulações farmacológicas foi o estabelecimento gradual de uma bradicardia após a administração de prazosina, o que não caracteriza um barorreflexo por se tratar de uma mudança na f_H demasiadamente lenta e contrária a aquela que ocorre frente à queda da pressão arterial (figura 8). Existem duas possíveis explicações para tal acontecimento:

- (1) Baseado na premissa de que as células marca-passo do coração dos vertebrados são sensíveis a estiramento, havendo uma relação direta entre esse fator e a taxa de disparo do nodo sinoatrial, é concebível que a vasodilatação sistêmica produzida pela prazosina tenha diminuído o retorno venoso e a pressão de enchimento do coração dos animais, reduzindo o estiramento nodal e conseqüentemente a f_H – apesar de a fenilefrina não ter produzido o efeito inverso, como seria esperado (FARRELL, 1991; FRANKLIN; AXELSSON, 1994).
- (2) Levando em conta que o miocárdio necessita de constante provisão sanguínea para suprir suas altas demandas por oxigênio, a diminuição do retorno venoso e do enchimento cardíaco promovido pela prazosina pode ter prejudicado a oferta desse gás aos cardiomiócitos, provocando uma queda na f_H e na força de contração do coração devido à isquemia ou ajustes fisiológicos de proteção miocárdica – situação que não é compatível com o efeito da fenilefrina, que aumenta o enchimento cardíaco (DAVIE; FARRELL, 1991; LILLYWHITE et al., 1999; FARRELL, 2007). É importante ressaltar que o miocárdio ventricular do coração dos tambaquis é predominantemente esponjoso com reduzida circulação coronariana, sendo muito dependente da oxigenação por difusão do sangue luminal (DAVIE; FARRELL, 1991; SIMÕES et al., 2002). Somado a isso, o coração dos peixes abriga apenas sangue desoxigenado em seu lúmen, o que torna o miocárdio dos tambaquis ainda mais susceptível à isquemia em situações de enchimento cardíaco limitado (DAVIE; FARRELL, 1991). Independentemente do motivo que levou à queda da f_H após a administração de prazosina, as proposições acima são passíveis de ocorrência apenas nos animais do grupo G4, que não dispõem do barorreflexo para regular a pressão arterial (e conseqüentemente o retorno venoso e o enchimento cardíaco).

A f_H do grupo G4 ter se mostrado mais alta que a dos grupos IN e G1 (figura 9C) indica que os barorreceptores, quimiorreceptores e mecanorreceptores branquiais provavelmente auxiliam na manutenção de um tônus colinérgico basal nesses animais, o qual foi retraído com a desnervação das brânquias. Essa possível relação já foi observada em estudos que realizaram desnervações branquiais tanto em tambaquis quanto em outras espécies (REID et al., 2000; LEITE et al., 2007; FLORINDO et al., 2006; BOIJINK et al., 2010).

A análise em porcentagem das mudanças na f_H frente às intervenções farmacológicas, também demonstrou que as infusões de fenilefrina e prazosina nos animais IN e G1 reduziram e aumentaram a f_H , respectivamente (figura 10AB). Mais uma vez, tais respostas não foram observadas nos indivíduos do grupo G4, em que a f_H posterior às administrações farmacológicas foram idênticas à linha de base de 100% (referente a f_H anterior as administrações) (figura 10C). Assim, em conjunto com a avaliação da f_H bruta, esses dados ratificam a ocorrência do reflexo barostático nos grupos IN e G1, mas não no grupo G4.

A avaliação da f_H em percentual revelou ainda que a modificação reflexogênica induzida pela fenilefrina, mas não pela prazosina, foi mais amena no grupo G1 que no grupo IN (figura 10AB). Além disso, a análise do tempo decorrido até a resposta barorreflexa máxima apontou que a reação do grupo IN à fenilefrina foi mais imediata que a do grupo G1, enquanto nenhuma diferença foi observada com relação ao tempo de reação à prazosina (figura 11). Com base nesses resultados é possível concluir que a desnervação do primeiro par de arcos branquiais prejudica o reflexo barostático, certamente por conta da presença de barorreceptores nesses locais.

A equidade da resposta reflexa à prazosina entre os grupos IN e G1 pode ser explicada levando-se em conta a existência de um período de 24 horas entre os experimentos com cada fármaco vasoativo, o que possibilita formular a hipótese de que a ausência dos barorreceptores do primeiro par de arcos branquiais é compensada posteriormente pelos barorreceptores que ainda restam. Esse fenômeno já foi considerado por West e Van Vliet (1994), sob a argumentação de que o sistema nervoso central pode ser capaz de se adaptar a um novo perfil de atividade aferente, de modo que as informações advindas dos barorreceptores remanescentes são mais ponderadas certo tempo depois da desnervação.

Uma hipótese alternativa consiste no cenário de a modificação na pressão arterial incitada pela fenilefrina ser muito mais intensa que àquela promovida pela prazosina, de maneira que o barorreflexo do grupo G1 é capaz de equilibrar o desequilíbrio pressórico causado pela prazosina, mas não o causado pela fenilefrina, tão eficazmente quanto o grupo IN. Essa pressuposição também é aceitável haja vista que o efeito vasodilatador da prazosina depende da existência prévia de um tônus adrenérgico vascular, proporcionando apenas uma leve redução na pressão arterial caso haja pouco trabalho adrenérgico nos vasos sanguíneos para antagonizar – o que não acontece com a fenilefrina por conta de essa estimular diretamente os receptores α_1 -adrenérgicos. Entretanto, os resultados pertinentes à variabilidade da f_H favorecem a possibilidade da compensação barorreceptora, como será esclarecido adiante.

É possível observar nos gráficos que mostram a variabilidade da f_H que, nos animais IN, o valor dessa variável praticamente dobra em relação à sua grandeza basal após a administração de fenilefrina, indicando que uma demanda maior por regulação a curto prazo da f_H foi instaurada por esse fármaco (figura 12A). Já no grupo G1, a variabilidade da f_H se apresenta aproximadamente 30% menor que a do grupo IN, e também se eleva após a infusão de fenilefrina, mas sem chegar ao patamar alcançado pelos animais IN (figura 12AB). Essa menor variabilidade da f_H pré e pós fenilefrina no grupo G1 indica um prejuízo à regulação da f_H nesses animais, ou seja, respalda a ideia de que a desnervação do primeiro arco branquial reduz a eficiência do reflexo barostático.

Vinte e quatro horas depois, a variabilidade da f_H nos grupos IN e G1 encontrava-se equivalente àquela observada no grupo IN previamente a administração de fenilefrina (figura 12AB). Isso significa que a redução na variabilidade da f_H que os animais G1 apresentaram inicialmente foi revertida, corroborando a hipótese de que os barorreceptores remanescentes são capazes de compensar os barorreceptores desassociados com o passar do tempo. Ademais, a infusão de prazosina promoveu apenas uma leve diminuição, não significativa, na variabilidade da f_H nos grupos IN e G1 (figura 12AB).

O motivo pelo qual a fenilefrina aumentou a variabilidade da f_H e a prazosina tendeu a reduzi-la parece ter relação com o fenômeno das ondas de Mayer. Essas ondas são caracterizadas por oscilações cíclicas e constantes na pressão arterial, que provavelmente são originadas por flutuações intrínsecas do tônus adrenérgico vascular dos animais. Visto que o barorreflexo se empenha continuamente em tamponar essas variações pressóricas, as ondas de Mayer também podem ser observadas na f_H , possuindo correlação com a variabilidade de curto prazo dessa variável (JULIEN, 2006). Julien (2006) ainda comenta em sua revisão que a amplitude dessas ondas é influenciada positivamente por agonistas α -adrenérgicos e negativamente por antagonistas desses mesmos receptores, situação que é compatível com os resultados do presente estudo. Nos tacogramas abaixo, extraídos de três animais representativos, é perceptível a ocorrência de oscilações rítmicas na f_H similares às ondas de Mayer – com exceção do animal G4 por conta da ausência de reflexo barostático (figura 17).

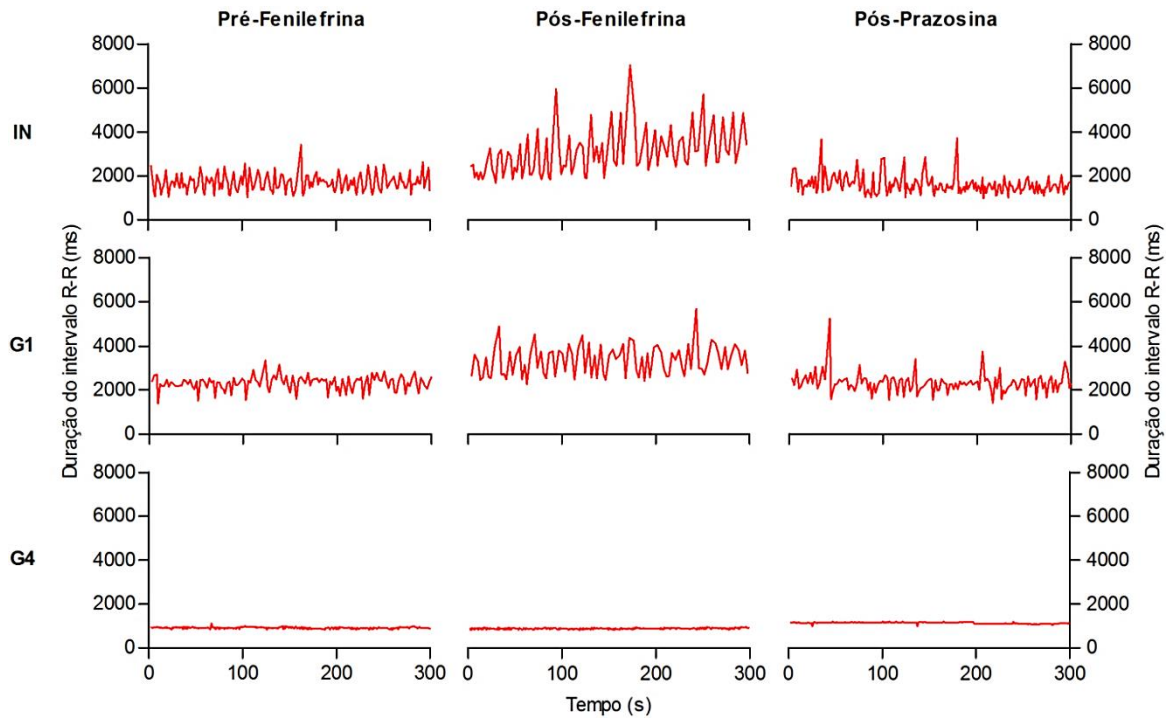


Figura 17. Tacogramas expressando a duração dos intervalos R-R de *Colossoma macropomum* contidos nos 5 minutos que precederam as manipulações farmacológicas e nos 5 minutos que sucederam tais manipulações. Note a característica ondulatória dos tacogramas similares às ondas vasomotoras de Mayer, assim como a abolição de suas influências na f_H com a desnervação dos quatro pares de arcos branquiais (G4). As ondas de Mayer já foram descritas em um teleosteo por Wood (1974). Fonte: elaborada pelo autor.

Os indivíduos com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) manifestaram uma variabilidade da f_H praticamente inexistente, condição que aponta para a quase abstenção de controle a curto prazo da f_H . Tal resultado, juntamente àqueles da f_H bruta e em porcentagem, atesta a ausência de reflexo barostático nos animais que constituem esse grupo experimental e, conseqüentemente, a localização estritamente branquial dos barorreceptores na espécie em questão.

É importante ter em mente que a baixa variabilidade da f_H apresentada pelo grupo G4 não se deve apenas à desassociação dos barorreceptores e abolição do barorreflexo, visto que os tambaquis também apresentam quimiorreceptores branquiais que modulam a f_H (FLORINDO et al., 2004; FLORINDO et al., 2006). Além disso, a desnervação branquial pode ter extirpado mecanorreceptores relacionados a um possível acoplamento cardiorrespiratório (CAMPBELL et al., 2005; LEITE et al., 2009). De qualquer forma, tais fatores não invalidam a inferência de que a variabilidade da f_H do grupo G4 reafirma a inexistência de barorreflexo nesses animais, pois as infusões de fenilefrina e prazosina não alteraram essa variável no grupo G4 como alteraram nos grupos IN e G1 (aumento e tendência a redução, respectivamente). A variabilidade remanescente nesse grupo experimental provavelmente deriva da ação de outras aferências, como por exemplo, quimiorreceptores centrais e orobranquiais (MILSOM et al., 2002; FLORINDO et al., 2006).

Os experimentos com o grupo falso-operado (SH) mostrou que as variáveis e as respostas observadas nesses animais são idênticas àquelas apresentadas pelo grupo IN, confirmando que a exposição das inervações branquiais ao meio externo não interferiu no presente estudo (tabelas 1-4). No que concerne os experimentos com o grupo VE, observa-se que os veículos que carrearam os fármacos não produziram alterações nas variáveis analisadas, sendo realmente inertes (tabelas 1-4).

Em resumo, todas as análises realizadas forneceram evidências de que os barorreceptores são exclusivamente branquiais no teleósteo *C. macropomum*, uma vez que elas não exibiram qualquer sinal de reflexo barostático nos animais com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Essas análises também permitiram concluir que os barorreceptores muito provavelmente estão dispersos por todas as brânquias, pois revelaram que a desnervação do primeiro par de arcos branquiais ocasionou leve prejuízo às respostas barorreflexas dos animais (G1). O presente estudo, então, confirma as observações anteriormente documentadas que apontam para as brânquias como o principal sítio barossensível em peixes – somando também indícios de que é o único.

5.3 – EVOLUÇÃO DA BARORRECEPÇÃO EM VERTEBRADOS

O presente estudo demonstrou que a transecção do nervo glossofaríngeo e dos ramos branquiais do nervo vago eliminou o reflexo barostático em *C. macropomum*, impedindo que a informação barorreceptora ascendesse ao sistema nervoso central dos animais. Isso indica que os nervos cranianos IX e X são os únicos responsáveis pela interconexão entre as regiões barorreceptoras e o encéfalo nesse teleósteo.

Como revisado por West e Van Vliet (1994), uma grande quantidade de evidências indica que os barorreceptores dos anfíbios anuros também se localizam na vasculatura central, mais especificamente nos arcos aórticos, arcos pulmocutâneos e artérias carótidas. Em relação aos urodelos, os únicos relatos existentes apontam para as brânquias e para a vasculatura pulmonar como notáveis sítios barossensíveis (LUTZ; WYMAN, 1932b; JOHANSEN, 1963). Já em gimnofiônios, nenhum trabalho parece ter tratado sobre esse assunto até o momento.

Fedele (1937) e Adams (1962) propuseram que o *truncus arteriosus* constitui a região barorreceptora mais importante nos quelônios, alegação que não foi suportada pelos resultados de Stephens et al. (1975) e Stephens et al. (1983). As poucas investigações em lacertílios também determinaram essas mesmas artérias como responsáveis pela barorrecepção (BAGSHAW, 1985). De forma similar, os barorreceptores nas serpentes parecem estar igualmente dispostos no *truncus arteriosus* (LILLYWHITE; DONALD, 1994; SEYMOUR; ARNDT, 2004). Nenhuma informação acerca da barorrecepção em crocodilianos foi encontrada na literatura científica.

Por fim, uma quantidade considerável de estudos mostra que, tanto nas aves quanto nos mamíferos, os barorreceptores parecem estar localizados nos arcos aórticos e nas artérias carótidas (BAGSHAW, 1985). A figura abaixo sumariza as principais regiões barossensíveis dos grandes grupos de vertebrados (figura 18).

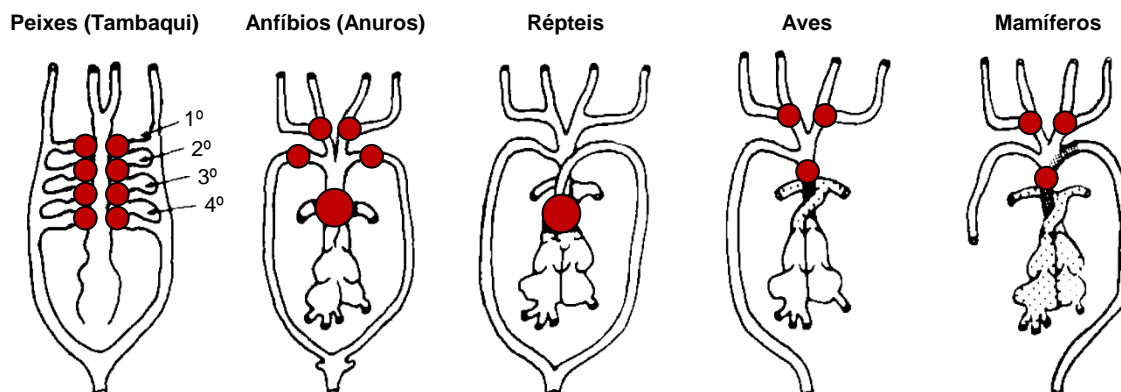


Figura 18. Esquema sumarizando a localização dos barorreceptores nos principais grupos de vertebrados estudados até a atualidade, quando em fase adulta. Fonte: adaptada de Bagshaw (1985).

É interessante notar que as aferências de praticamente todas as regiões de barorrecepção acima citadas são constituídas pelos nervos glossofaríngeo e vago (cranianos IX e X), assim como o presente estudo permitiu observar nos tambaquis. Destaca-se também que os locais barossensíveis dos tetrápodes são todos homólogos aos arcos branquiais dos peixes, como pode ser verificado na tabela 5 (MILSON; BURLESON, 2007; KARDONG, 2008).

Tabela 5. Regiões barossensíveis em vertebrados, suas origens embrionárias e inervações.

Estrutura Embrionária	Origina em peixes	Origina em tetrápodes	Inervação
3º Arco Faríngeo	1º Arco Branquial	Artéria Carótida	Cranianos IX e X
4º Arco Faríngeo	2º Arco Branquial	Aorta e <i>Truncus arteriosus</i>	Craniano X
5º Arco Faríngeo	3º Arco Branquial	Obliteração Embrionária*	Craniano X
6º Arco Faríngeo	4º Arco Branquial	Artéria Pulmocutânea	Craniano X

* Exceto nos anfíbios urodelos (KARDONG, 2008).

Levando em conta as homologias existentes entre as regiões barossensíveis citadas acima, é possível traçar um panorama sobre a evolução da barorrecepção em vertebrados, como exposto na figura 19. Inicialmente, nota-se que apenas peixes e anfíbios urodelos possuem a zona barorreceptora originada pelo 5º arco faríngeo do embrião-base de vertebrados, pois essa estrutura é obliterada durante o desenvolvimento embrionário dos demais grupos (KARDONG, 2008). Também é possível constatar que os répteis, as aves e os mamíferos não apresentam a região barossensível originada pelo 6º arco faríngeo do embrião-base, indicando uma possível perda desse caráter em um ancestral comum a esses grupos. Também é importante observar que os répteis são os únicos vertebrados que não exibem os locais barossensíveis originários do 3º arco faríngeo embrionário, e que todos os grupos apresentam as populações de barorreceptores que derivam do 4º arco faríngeo.

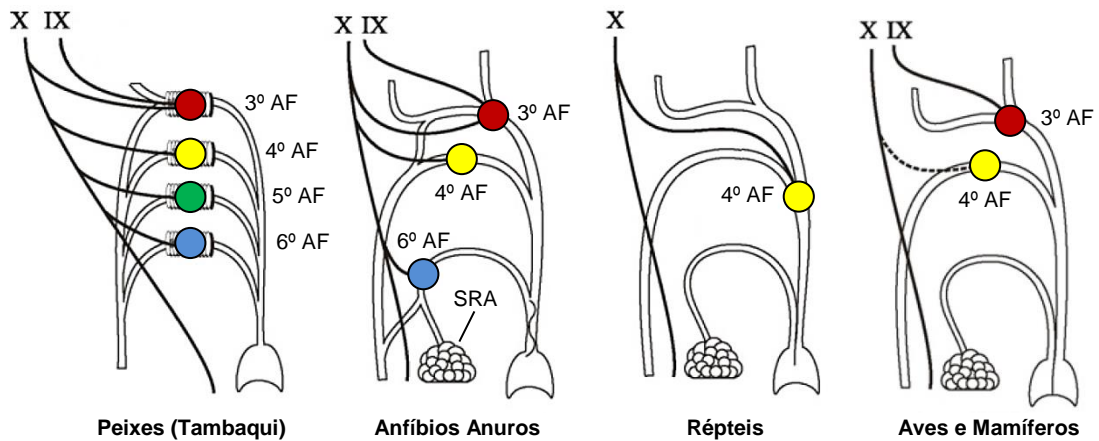


Figura 19. Diagrama ilustrando a distribuição dos barorreceptores nos principais grupos de vertebrados, suas inervações e suas origens embrionárias. Círculos vermelhos: derivação do 3º arco faríngeo embrionário; Círculos amarelos: derivação do 4º arco faríngeo embrionário; Círculos verdes: derivação do 5º arco faríngeo embrionário; Círculos azuis: derivação do 6º arco faríngeo embrionário; AF: arco faríngeo embrionário; SRA: superfície de respiração aérea. Fonte: adaptada de Milsom e Bureson (2007).

Duas explicações distintas poderiam justificar a inobservância de barorreceptores nas regiões derivadas do 3º arco faríngeo embrionário em répteis: (1) originalmente os répteis possuíam essa área barossensível, a qual foi herdada pelas aves e mamíferos e posteriormente perdida nos táxons mais recentes de répteis; (2) esses receptores foram perdidos durante o período de transição anfíbios-répteis, e posteriormente reapareceram em aves e mamíferos – configurando nessa última opção, um atavismo (homoplasia).

Por fim, reitera-se a escassez de estudos acerca da localização dos barorreceptores em não-mamíferos, a qual dificulta muito a realização de mais inferências sobre a história evolutiva da barorrecepção em vertebrados – especialmente porque pouquíssimas espécies, de táxons restritos, foram investigadas até o momento. Estudos em crocodilianos e peixes com respiração aérea, por exemplo, contribuiriam muito para o avanço dessa reconstrução histórica, ajudando a verificar se realmente nenhum réptil apresenta barorreceptores nas regiões derivadas do 3º arco faríngeo embrionário, e quais pressões evolutivas poderiam induzir possíveis migrações ou desaparecimento de áreas barossensíveis.

6 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- a. Em *Colossoma macropomum*, os barorreceptores são exclusivamente intrabranquiais.
- b. Os barorreceptores encontram-se dispersos por todos os arcos branquiais em tambaqui.
- c. Similarmente à maioria dos vertebrados, as aferências barorreceptoras são constituídas pelos nervos glossofaríngeo e vago (cranianos IX e X) no teleósteo em questão.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. E. The carotid sinus – carotid body problem in the Chelonia (with a note on a foramen of Panizza in *Dermochelys*). **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 139, p. 28 – 37, 1962.

AFFONSO, E. G.; POLEZ, V. L. P.; CORRÊA, C. F.; MAZON, A. F.; ARAÚJO, M. R. R.; MORAES, G.; RANTIN, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 133, p. 375 – 382, 2002.

ALTIMIRAS, J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 447 – 460, 1999.

ANTTILA, K.; DHILLON, R. S.; BOULDING, E. G.; FARRELL, A. P.; GLEBE, B. D.; ELLIOT, J. A. K.; WOLTERS, W. R.; SCHULTE, P. M. Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 1183 – 1190, 2013.

AXELSSON, M.; FRITSCHKE, R. Cannulation techniques. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes: Analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 1994. v. 3, p. 17 – 36.

BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60, p. 121 – 162, 1985.

BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA JR, R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue: evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. S157 – S165, 1991.

BOJINK, C. L.; FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Hypercarbic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): the role of branchial CO₂ chemoreceptors. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 2797 – 2807, 2010.

CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; EGGINTON, S. The use of power spectral analysis to determine cardiorespiratory control in the short-horned sculpin *Myoxocephalus Scorpius*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 1969 – 1976, 2004.

CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; EGGINTON, S. Does respiratory sinus arrhythmia occur in fishes? **Biology Letters**, v. 1, p. 484 – 487, 2005.

DAVIE, P. S.; FARRELL, A. P. The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, p. 1993 – 2001, 1991.

FARRELL, A. P. From hagfish to tuna: a perspective on cardiac function in fish. **Physiological Zoology**, v. 64, p. 1137 – 1164, 1991.

FARRELL, A. P. Tribute to P. L. Lutz: a message from the heart – why hypoxic bradycardia in fishes? **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 1715 – 1725, 2007.

FEDELE, M. I nervi del tronco arterioso nel quadro della innervazione cardiaca nei rettili e il problema del depressore nei vertebrata. **Accademia dei Lincei, Atti Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali, Memorie**, v. 6, p. 387 – 520, 1937.

FLORINDO, L. H.; REID, S. G.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Cardiorespiratory reflexes and aquatic surface respiration in the Neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): acute responses to hypercarbia. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 174, p. 319 – 328, 2004.

FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; REID, S. G.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 1709 – 1715, 2006.

FRANKLIN, C. E.; AXELSSON, M. The intrinsic properties of an *in situ* perfused crocodile heart. **The Journal of Experimental Biology**, v. 186, p. 269 – 288, 1994.

GILMOUR, K. M.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T.; REID, S. G.; PERRY, S. F. Cardiorespiratory responses to hypercarbia in tambaqui *Colossoma macropomum*: chemoreceptor orientation and specificity. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 1095 – 1107, 2005.

GLASS, M. L.; RANTIN, F. T.; VERZOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N.; KALININ, A. L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 39, p. 143 – 149, 1991.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. A Circulação. In: _____. (Eds.). **Tratado de Fisiologia Médica**. Décima Segunda Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 165 – 297.

HELGASON, S. C.; NILSSON, S. Drug effects on pre- and post-branchial blood pressure and heart rate in a free-swimming marine teleost, *Gadus morhua*. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 88, p. 533 – 540, 1973.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. Circulação. In: _____. (Eds.). **Fisiologia Animal**. Segunda Edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012. p. 611-642.

IRVING, L.; SOLANDT, D. Y.; SOLANDT, O. M. Nerve impulses from branchial pressure receptors in the dogfish. **Journal of Physiology**, v. 84, p. 187 – 190, 1935.

JOHANSEN, K. Intravascular pressure in the intact, free-moving amphibian, *Amphiuma tridactylum*. **Acta Physiological Scandinavica**, v. 60, p. 18 – 29, 1963.

JULIEN, C. The enigma of Mayer waves: facts and models. **Cardiovascular Research**, v. 70, p. 12 – 21, 2006.

KARDONG, K. V. Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution. Terceira Edição. New York: McGraw Hill, 2008. 800 p.

KLABUNDE, R. E. Neurohumoral control of heart and circulation. In: _____. (Ed.). **Cardiovascular Physiology Concepts**. Segunda Edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 117-139.

KRAMER, D. L.; LINDSEY, C. C.; STEVENS, E. D. The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 717 – 729, 1978.

KREBS, H. A. The August Krogh Principle: “For many problems there is an animal on which it can be most conveniently studied”. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 194, p. 221 – 226, 1975.

LAUGHLIN, M. H. Cardiovascular response to exercise. **Advances in Physiology Education**, v. 277, p. S244 – S259, 1999.

LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Physiology Part A**, v. 193, p. 1001 – 1011, 2007.

LEITE, C. A. C.; TAYLOR, E. W.; GUERRA, C. D. R.; FLORINDO, L. H.; BELÃO, T.; RANTIN, F. T. The role of the vagus nerve in the generation of cardiorespiratory interactions in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Physiology Part A**, v. 195, p. 721 – 731, 2009.

LENT, R. Neurociência dos estados corporais. In: _____. (Ed.). **Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência**. Segunda Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. p. 466 – 608.

LILLYWHITE, H. B. Gravity, blood circulation, and the adaptation of form and function in lower vertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 275, p. 217 – 225, 1996.

LILLYWHITE, H. B.; DONALD, J. A. Neural regulation of arterial blood pressure in snakes. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1260 – 1283, 1994.

LILLYWHITE, H. A.; ZIPPEL, K. C.; FARRELL, A. P. Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 369 – 382, 1999.

LOPES, J. M.; BOIJINK, C. L.; FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Hypoxic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): role of branchial O₂ chemoreceptors. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 180, p. 797 – 811, 2010.

LUTZ, B. R. Reflex cardiac and respiratory inhibition in the elasmobranch, *Scyllium canicula*. **Biological Bulletin**, v. 59, p. 170 – 178, 1930.

LUTZ, B. R.; WYMAN, L. C. Reflex cardiac inhibition of branchio-vascular origin in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. **Biological Bulletin**, v. 62, p. 10 – 16, 1932a.

LUTZ, B. R.; WYMAN, L. C. The evolution of a carotid sinus reflex and the origin of vagal tone. **Science**, v. 75, p. 590 – 591, 1932b.

MCKENZIE, D. J.; CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; MICHELI, M.; RANTIN, F. T.; ABE, A. S. The autonomic control and functional significance of the changes in heart rate associated with air breathing in the jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 4224 – 4232, 2007.

MCWILLIAM, J. A. On the structure and rhythm of the heart in fishes, with especial reference to the heart of the eel. **Journal of Physiology**, v. 6, p. 232 – 245, 1885.

MILSOM, W. K.; BURLESON, M. L. Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 157, p. 4 – 11, 2007.

MILSOM, W. K.; REID, S. G.; RANTIN, F. T.; SUNDIN, L. Extrabranchial chemoreceptors involved in the respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 1765 – 1774, 2002.

MOTT, J. C. Some factors affecting the blood circulation in the common eel (*Anguilla anguilla*). **Journal of Physiology**, v. 114, p. 387 – 398, 1951.

NILSSON, S. Comparative anatomy of the autonomic nervous system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 165, p. 3 – 9, 2011.

OGILVY, C. S.; DUBOIS, A. B. Effect of tilting on blood pressure and interstitial fluid pressures of blue fish and smooth dogfish. **American Journal of Physiology**, v. 242, p. R70 – R76, 1982.

OPDYKE, D. F.; MCGREENHAN, J. R.; MESSING, S.; OPDYKE, N. E. Cardiovascular responses to spinal cord stimulation and autonomically active drugs in *Squalus acanthias*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 42, p. 611 – 620, 1972.

RANDALL, D. J.; STEVENS, E. D. The role of adrenergic receptors in cardiovascular changes associated with exercise in salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 21, p. 415 – 424, 1967.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Comportamento: Iniciação, Padrões e Controle. In: _____. (Eds.). **Eckert - Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações**. Quarta Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. p. 374-430.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Mediadores Químicos e Sistema Nervoso Autônomo. In: _____. (Eds.). **Farmacologia**. Sexta Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 131-143.

REID, S. G.; SUNDIN, L.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*): CO₂/pH chemoresponses. **Respiration Physiology**, v. 120, p. 47 – 59, 2000.

RISTORI, M. T. Réflexe de barosensibilité chez un poisson téléostéen (*Cyprinus carpio* L.). **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 164, p. 1512 – 1516, 1970.

RISTORI, M. T.; DESSAUX, G. Sur l'existence d'un gradient de sensibilité dans les récepteurs branchiaux de *Cyprinus carpio* L. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 164, p. 1517 – 1519, 1970.

SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 821-829, 2005.

SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology Part B**, v. 179, p. 1 – 56, 2009.

SEYMOUR, R. S.; ARNDT, J. O. Independent effects of heart-head distance and caudal blood pooling on blood pressure regulation in aquatic and terrestrial snakes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 1305 – 1311, 2004.

SIMÕES, K.; VICENTINI, C. A.; ORSI, A. M.; CRUZ, C. Morphological characteristics of the ventricular myocardium of tambaqui (*Colossoma macropomum*; Characidae, Cuvier, 1818). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 74 – 77, 2002.

STEPHENS, G. A.; SHIRER, H. W.; TRANK, J. W.; GOETZ, K. L. Absence of an arterial barostatic reflex in the turtle. **Federal Proceedings**, v. 34, p. 406 – 406, 1975.

STEPHENS, G. A.; SHIRER, H. W.; TRANK, J. W.; GOETZ, K. L. Arterial baroreceptor reflex control of heart rate in two species of turtle. **American Journal of Physiology**, v. 244, p. R544 – R552, 1983.

STEVENS, E. D.; BENNION, G. R.; RANDALL, D. J.; SHELTON, G. Factors affecting arterial pressures and blood flow from the heart in intact unrestrained lingcod, *Ophiodon elongatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 43, p. 681 – 695, 1972.

SUDAK, F. N.; WILBER, C. G. Cardiovascular responses to hemorrhage in the dogfish. **Biological Bulletin**, v. 119, p. 342 – 342, 1960.

SUNDIN, L.; REID, S. G.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **The Journal of Experimental Biology**, V. 203, n. 7, p. 1225-1239, 2000.

TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; SARTORI, M. R.; WANG, T.; ABE, A. S.; CROSSLEY II, D. A. The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 690 – 703, 2014.

WEST, N. H.; VAN VLIET, B. N. The role of arterial baroreceptors in the undivided circulation of anuran amphibians. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1305 – 1324, 1994.

WOOD, C. M. Mayer waves in the circulation of a teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 189, p. 267 – 274, 1974.

WOOD, C. H. M.; SHELTON, G. Cardiovascular dynamics and adrenergic responses of the rainbow trout *in vivo*. **The Journal of Experimental Biology**, V. 87, n. 1, p. 247-270, 1980.