

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

**Modulação autonômica cardíaca durante o exercício no peixe de
respiração aérea bagre africano, *Clarias gariepinus***

Felipe Rocco Blasco

**São Carlos - SP
2015**

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

**Modulação autonômica cardíaca durante o exercício no peixe de
respiração aérea bagre africano, *Clarias gariepinus***

Felipe Rocco Blasco

**Dissertação apresentada ao Programa
Interinstitucional de Pós-graduação em
Ciências Fisiológicas/UFSCar-UNESP
Araraquara, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Tadeu
Rantin**

Co-Orientador: Dr. David J. McKenzie

**São Carlos - SP
2015**

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

B644ma

Blasco, Felipe Rocco.

Modulação autonômica cardíaca durante o exercício no peixe de respiração aérea bagre africano, *Clarias gariepinus* / Felipe Rocco Blasco. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
68 f.

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

1. Peixe. 2. Natação sustentada. 3. Tônus adrenérgico. 4. Tônus colinérgico. 5. Frequência cardíaca. I. Título.

CDD: 597 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

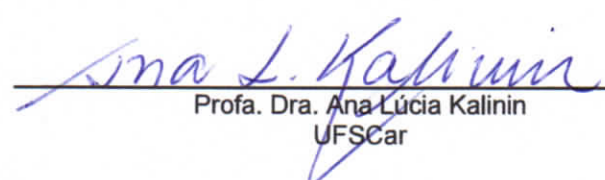
Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Felipe Rocco Blasco, realizada em 04/09/2015:



Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin
UFSCar

Prof. Dr. Augusto Shinya Abe
UNESP



Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais, Loreni e Eduardo e ao meu irmão Gustavo, que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir nesse caminho.

“Eu sei que alma de pescador já nasce entregue ao mar, vieste do pó ao pó hás de voltar” In memoriam com muito amor Tio Wandy e Yaya.

“Para cada problema biológico existe um organismo no qual é mais conveniente realizar o estudo”.

August Krogh

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pela oportunidade concedida, pela orientação prestada, confiança na realização do projeto e exemplo profissional.

Ao Dr. David J. McKenzie pelo enorme auxílio prestado no trabalho, desde dicas nas partes práticas até discussões aprofundadas sobre os resultados. Meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Cléo Alcântara Leite, Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo e Dra. Diana Amaral Monteiro pelas valiosas considerações no exame de qualificação. À Prof. Dr. Ana Kalinin pela ótima convivência e conversas no corredor do departamento.

Aos professores do PIPGCF, em especial àqueles que tive a oportunidade de conviver durante as disciplinas. Aos funcionários do PIPGCF e DCF, em especial Alexandre, Carmen, Sr. Ângelo e José Roberto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. À Universidade Federal de São Carlos pela infraestrutura para que o trabalho fosse realizado. Tenho orgulho em dizer que minha formação se fez aqui, aprendi muitas coisas e fiz muitos amigos nos últimos 8 anos.

À minha mãe, Loreni, e meu pai, Eduardo, por todo o amor, apoio, amizade, carinho e estrutura para que tal jornada pudesse ser trilhada. Ao meu irmão, Gustavo, meu grande amigo, por todas as conversas, diversões, viagens, ensaios, enfim, pela presença em minha vida.

À minha família de modo geral, avós, madrinha, padrinho, tios, tias, primos, primas, sempre atenciosos e carinhos.

À Marininha, pelo amor, companheirismo, ajuda nas intermináveis revisões dos textos e conversas sobre o trabalho. Tenho certeza que você se tornou um pouco fisiologista.

Aos amigos de Laboratório e Departamento, Thiaguinho, Vivs, Diana, Lucão, Zê, Nathan, Éliton, Carol, Raquel, Iaritcha, Morozesk, Nai, Dri, pela ótima companhia, conversas sobre trabalho e “papos furados”.

Aos parceiros Pedra 90, Créu, Fitão, Corvo, Léo, Magrão, Dé, Lucão, Nardo, Gabi, Bombinha, Guarani, Pizêra. Os melhores que eu poderia ter conhecido, sempre guardarei ótimas lembranças dos momentos em que passamos juntos. Aos amigos de São Paulo que apesar da distância os elos se mantêm firmes e fortes. Gabiru, Marcião, Pedroca, Wander, Lê, Dibs, Ed, Bolinha, Kaks, Tati, Porps, Carol, Aninha, Laureta, Nii, Paulinha.

Aos parceiros da melhor banda de São Carlos e região, As Véia Loka: Nathan, Hulkinho, Bunda, Binhada e Rodrigão. Keep ´n ´Rocking.

Aos bagres que possibilitaram a realização do trabalho e dentre outras coisas me ensinaram a cultivar belos longos bigodes.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, mesmo não citados nominalmente, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

Os peixes teleósteos foram os primeiros vertebrados a possuírem inervação autonômica dupla no coração, onde um balanço entre a ação adrenérgica e colinérgica determina a frequência cardíaca (f_H). Dentro dos teleósteos, peixes que realizam respiração aérea (RA) são interessantes modelos de estudo, uma vez que exibem notáveis alterações na f_H associadas a cada evento de RA, que parecem estar sob controle autônomo. Nessas espécies, o exercício aeróbico geralmente causa um aumento na frequência de respiração aérea (f_{RA}), mas os efeitos do exercício na f_H e na f_{RA} ainda não foram estudados. Assim, o presente estudo, utilizando-se de exemplares de bagre africano, *Clarias gariepinus*, um respirador aéreo facultativo, teve por objetivo investigar o papel do controle autonômico para os ajustes de f_H relacionados à atividade física e à respiração aérea. Após a anestesia em solução de benzocaína, foram implantados eletrodos de ECG, utilizados para medir a f_H em duas situações durante o exercício: Routine, medida entre eventos de RA, e f_H Pré-RA e f_H Pós-RA, em dois grupos de *C. gariepinus*. Uma cânula peritoneal foi inserida para realizar a injeção das drogas antagonistas, propranolol e atropina. No Grupo 1 ($n = 9$; 126 ± 6 g EPM), os animais foram submetidos a três testes sequenciais de natação, nas velocidades de 15, 30 e 45 cm.s^{-1} : Controle, Propranolol e Duplo Bloqueio. No Grupo 2 ($n = 9$; 137 ± 8 g EPM), os animais foram submetidos ao mesmo protocolo sequencial de natação, porém com uma inversão na injeção das drogas antagonistas: Controle, Atropina e Duplo Bloqueio. Adicionalmente, a f_H , f_{RA} e a % de ação do tônus adrenérgico e colinérgico foram calculadas, em cada velocidade, para cada teste. Uma clara relação positiva entre as velocidades de natação e a f_{RA} foi observada. O duplo bloqueio autonômico não teve efeitos na resposta da f_{RA} . Interessantemente, a injeção somente de propranolol, no Grupo 1, fez com que a f_{RA} observada nas duas últimas velocidades de natação, 30 e 45 cm.s^{-1} , fossem maiores do que os valores encontrados no Controle, um resultado que também foi observado a 45 cm.s^{-1} após o duplo bloqueio nesse grupo. Adicionalmente, no Grupo 1, a f_H Routine encontrada nos protocolos Controle e Propranolol apresentaram um aumento conforme aumentou-se velocidade de natação. Entretanto, após o duplo bloqueio, ou somente após injeção de atropina, no Grupo 2, a f_H Routine encontrada foi maior e não variou conforme aumentou-se a velocidade de natação. Esses resultados revelam uma grande dominância do tônus colinérgico no controle da f_H durante o exercício. Similarmente, no Grupo 1, a f_H Pré-RA aumentou conforme se aumentou a velocidade de natação nos protocolos Controle e Propranolol. A f_H Pós-RA, no Grupo 1, foi maior e variou menos conforme se aumentou a velocidade de natação nos protocolos Controle e Propranolol. Mais uma vez, no Grupo 2, os testes, após duplo bloqueio ou somente após injeção de atropina, aboliram todas as mudanças na f_H associadas a cada evento de RA, em todas as velocidades de natação, confirmando a dominância do tônus colinérgico inibitório no controle das respostas cardíacas. Os cálculos dos tônus autonômico em torno de cada evento de RA verificaram que o tônus adrenérgico não variou nos momentos Pré e Pós, sendo todas as mudanças na f_H devido à modulação da ação do tônus colinérgico. Portanto, *C. gariepinus* utiliza-se de eventos de RA para manter o metabolismo aeróbico durante o exercício físico sustentado. A modulação do tônus colinérgico inibitório foi responsável por todas as variações na f_H Routine durante o exercício e por todas as mudanças na f_H durante os eventos de RA. A abolição desse controle colinérgico não tem, porém, uma influência na frequência dos eventos de RA durante o exercício.

Palavras-chave: natação sustentada; tônus adrenérgico; tônus colinérgico; frequência cardíaca.

ABSTRACT

Teleost fishes were the first vertebrates to possess double autonomic innervation of the heart, where a balance between adrenergic and cholinergic actions determine heart rate (f_H). Among teleosts, air breathing (AB) fishes are unusual because they exhibit marked changes in f_H associated with each air-breathing event, which appear to be under autonomic control. In these species, aerobic exercise typically causes increases in air-breathing frequency (f_{AB}), but effects of exercise on f_H , and on the changes in f_H with AB events, have never been studied. This was, therefore, studied in the african catfish, *Clarias gariepinus*, a facultative air breathing species. In particular, to investigate autonomic control of cardiac responses to exercise, and whether pharmacological abolition of f_H control had an influence on f_{AB} responses to exercise. Two groups of *C.gariepinus* were implanted with ECG electrodes under benzocaine anaesthesia, used to measure f_H during exercise, routine between AB events, and f_H Pre-AB and f_H Post-AB. A peritoneal cannula was inserted to inject antagonist drugs, propranolol and atropine. In Group 1 ($n = 9$; 126 ± 6 g EPM), animals were submitted to three sequential swimming tests at speeds of 15, 30 and 45 cm.s^{-1} : Control, Propranolol and Double Blockade. Group 2 ($n = 9$; 137 ± 8 g EPM) were submitted to the same sequential swimming tests, however with a reversal in drug injections: Control, Atropine and Double Blockade. Additionally to f_H , f_{AB} and the % of adrenergic and cholinergic tones were calculated at each velocity for each test. A clear positive relation between swimming speed and f_{AB} was observed. Autonomic blockade did not have major effects on these f_{AB} responses. Interestingly, however, injection of propranolol alone, in group 1, caused f_{AB} to be higher than control values at speeds of 30 and 45 cm.s^{-1} , an effect that was still measured at 45 cm.s^{-1} after Double Blockade in that group. In group 1, the f_H Routine of Control and Propranolol protocols showed an increase with swimming speed. However, after Double Blockade, or just atropine in Group 2, f_H Routine was high and did not vary with swimming speed. This reveals a profound dominance of cholinergic tone on f_H during exercise. Similarly, in group 1, the f_H Pre-AB increased with swimming speed in Control and Propranolol tests. The f_H Post AB was high and varied less as speed was increased in Control and Propranolol test of Group 1. Once again Double Blockade tests, or just Atropine in Group 2, abolished all changes in f_H associated with air-breathing, at all swimming speeds, confirming a dominance of inhibitory cholinergic control of f_H responses. Calculation of autonomic tones around AB events verified that adrenergic tone does not vary from Pre to Post moments, all changes in f_H are due to modulation of tone action. Therefore, *C.gariepinus* relies on AB events to maintain aerobic metabolism during sustained exercise. Modulation of inhibitory cholinergic tone accounts for all variations in f_H Routine during exercise, and for all changes in f_H during AB events. Abolition of this cholinergic control did not, however, have a major influence on AB responses to exercise.

Keywords: sustained swimming; adrenergic tone; cholinergic tone; heart rate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Peixe hipotético contendo os diversos ORAs conhecidos atualmente, sendo: superfície epitelial modificada dentro da cavidade bucal (**B**); faringeal (**F**); esofágica (**E**); opercular (**O**) e branquial (**Br**); pele (**P**); estômago (**Est**); intestino (**Int**). Espaços modificados incluem a câmara suprabranquial (**Câm. SB**) ou sacos faríngeos (**SF**). Câmaras modificadas incluem o ducto pneumático (**DP**) e o pulmão ou bexiga natatória (**P-BN**). Projeções dentro desses espaços incluem o labirinto (**L**); dendritos e leques branquiais (**D-LB**). **Fonte:** Modificado de GRAHAM (1997)..... 15
- Figura 2:** Exemplar de *Clarias gariepinus* (**Foto:** Felipe Rocco Blasco) 16
- Figura 3:** Fotografias das estruturas morfofuncionais de RA de *Clarias gariepinus*. **A-** Vista dos arcos branquiais separados; **B-** Vista dos arcos branquiais unidos; **C-** Vista aproximada dos leques branquiais e ORA; LE – lado esquerdo, LD – lado direito. **Fonte:** Modificado de GLASS & RANTIN (2009) e BELÃO (2010)..... 17
- Figura 4:** Desenho representando as forças que influenciam na natação de peixes. **Fonte:** Modificado de SFAKIOTAKIS et al. (1999) 18
- Figura 5:** Visões representativas dos diferentes tipos musculares na carpa, *Cyprinus carpio* em visões **A** – Longitudinal, **B** - Dorsal e **C** – Transversal. O músculo vermelho está representado em vermelho e o músculo branco em cinza. **Fonte:** Modificado de ROME et al. (1988) 19
- Figura 6:** Comparação da anatomia do SNA entre mamíferos, peixes teleósteos e elasmobrânquios. **Fonte:** Modificado de NILSSON (2011) 22
- Figura 7:** Ilustração comparando a ação do SNA na modulação cardíaca em ciclóstomos, peixes teleósteos e elasmobrânquios. **Fonte:** Modificado de NILSSON (2011) 24
- Figura 8:** *C. gariepinus* após procedimentos cirúrgicos. **A)** Pontos de inserção dos eletrodos de ECG e cânula de polietileno na região ventral do animal. **B)** Ponto de sutura para fixação dos eletrodos e cânula na região dorsal, próxima à carapaça. **C)** Visão geral após enrolar fios e cânula em torno do material flutuante a fim de evitar que o animal se embarace na preparação durante o período de recuperação 29
- Figura 9:** Sistema de respirometria com rotor (1) e motor de velocidade controlada (2): composto por um tanque com uma câmara experimental (3), formada por um respirômetro (4) acoplado a um túnel de natação (5). O sistema possui entrada (6) e saída (7) principais de água, bem como uma entrada de água bombeada do tanque para a câmara experimental (8), mantida com fluxo e velocidade constante por uma estrutura alveolar (9). Por fim, uma coluna de ar na tampa da câmara (10) permite a realização da respiração aérea pelo animal experimental 30
- Figura 10:** Registro de eletrocardiograma (ECG) de um bagre africano, *C. gariepinus*, em normóxia, a uma velocidade de natação de 15 cm.s⁻¹ 34
- Figura 11:** Avaliação da Frequência de Respiração Aérea ($f_{RA} \cdot h^{-1}$) em *C. gariepinus* sob diferentes velocidades de natação. **A:** Controle I; **B:** Controle II; **C:** Após injeção de Propranolol; **D:** Após injeção de Atropina; **E:** Duplo Bloqueio I; **F:** Duplo Bloqueio II. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo

grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; n = 9 ($P \leq 0,05$) 39

Figura 12: Avaliação da Frequência Cardíaca Routine (f_H Routine) em *C.gariepinus* sob diferentes velocidades de natação. A: Controle I; B: Controle II; C: Após injeção de Propranolol; D: Após injeção de Atropina; E: Duplo Bloqueio I; F: Duplo Bloqueio II. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; n = 9 ($P \leq 0,05$) 42

Figura 13: Avaliação da Frequência Cardíaca Pré Respiração Aérea (f_H Pré-RA - Linhas Pretas) e Frequência Cardíaca Pós Respiração Aérea (f_H Pós-RA - Linhas Vermelhas) em *C.gariepinus* sob diferentes velocidades de natação. A: Controle I; B: Controle II; C: Após injeção de Propranolol; D: Após injeção de Atropina; E: Duplo Bloqueio I; F: Duplo Bloqueio II. Números diferentes indicam diferenças significativas entre f_H Pré RA e f_H Pós RA em um mesmo grupo e velocidade; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a f_H Pré RA de um mesmo grupo em velocidades diferentes e entre a f_H Pós RA de um mesmo grupo em velocidade diferentes; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro. Valores são médias $\pm$ EPM; n = 9 ($P \leq 0,05$) 46

Figura 14: Porcentagem de ação do Tônus Adrenérgico (Coluna Branca) e Tônus Colinérgico (Coluna Preta) sob diferentes velocidades de natação. A: Routine; B: 15 cm/s; C: 30 cm/s e D: 45 cm/s. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de um mesmo tônus no período Routine nas diferentes velocidades. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro de um mesmo parâmetro nas diferentes velocidades. (*) indica diferença significativa entre a atividade Pré-Respiração Aérea e Pós-Respiração Aérea de um tônus em uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; n = 9 ($P \leq 0,05$) 49

Figura 15: Porcentagem de ação do Tônus Adrenérgico (Coluna Branca) e Tônus Colinérgico (Coluna Preta) sob diferentes velocidades de natação. A: Routine; B: 15 cm/s; C: 30 cm/s e D: 45 cm/s. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de um mesmo tônus no período Routine nas diferentes velocidades. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro de um mesmo parâmetro nas diferentes velocidades. (*) indica diferença significativa entre a atividade Pré-Respiração Aérea e Pós-Respiração Aérea de um tônus em uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; n = 9 ($P \leq 0,05$) 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela I:** Frequência de Respiração Aérea (f_{RA} : resp.h⁻¹), avaliada em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA) 37
- Tabela II:** Frequência Cardíaca Routine (f_H Routine: bpm), avaliada em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA) 40
- Tabela III:** Frequência Cardíaca Pré e Pós Respiração Aérea (f_H Pré-RA/ f_H Pós-RA: bpm), avaliadas em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Números diferentes indicam diferenças significativas entre f_H Pré RA e f_H Pós RA em um mesmo grupo e velocidade; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a f_H Pré RA de um mesmo grupo em velocidades diferentes e entre a f_H Pós RA de um mesmo grupo em velocidade diferentes; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA) 43
- Tabela IV:** Porcentagem de ação dos tônus Adrenérgico e Colinérgico nos períodos Routine, Pré Respiração Aérea e Pós Respiração Aérea, avaliadas em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de um mesmo tônus no período Routine nas diferentes velocidades. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro de um mesmo parâmetro nas diferentes velocidades. (*) indica diferença significativa entre a atividade Pré-Respiração Aérea e Pós-Respiração Aérea de um tônus em uma mesma velocidade. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA) 47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A Origem do O ₂ e a Evolução da Respiração Aérea	12
1.2. Peixes de Respiração Aérea e a Família Clariidae	14
1.3. Características Gerais da Natação e Peixes de Respiração Aérea	18
1.4. Sistema Nervoso Autônomo e Modulação Cardíaca	21
1.4.1. Avaliação da atividade dos tônus adrenérgico e colinérgico por meio da aplicação de fármacos	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Coleta e manutenção em laboratório	28
3.2. Procedimentos cirúrgicos	28
3.3. Descrição do Sistema de Respirometria de Natação	29
3.4. Protocolo Experimental	31
3.4.1. Bloqueio da atividade autonômica	31
3.4.2. Grupo Experimental 1	31
3.4.3. Grupo Experimental 2	32
3.5. Parâmetros Avaliados	34
3.5.1. Frequência de Respiração Aérea (f_{RA})	34
3.5.2. Frequência Cardíaca (f_H)	34
3.5.3. Cálculo da atividade dos tônus Colinérgico e Adrenérgico	35
3.6. Análises Estatísticas	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Efeitos do Exercício e Administração dos fármacos no padrão de Respiração Aérea (f_{RA})	37
4.2. Efeitos do Exercício e Administração dos fármacos na Atividade Cardíaca	40
4.2.1. Frequência Cardíaca Routine	40
4.2.2. Frequência Cardíaca Pré Respiração Aérea (f_H Pré-RA) e Frequência Cardíaca Pós Respiração Aérea (f_H Pós-RA)	43
4.3. Efeitos do Exercício no Tônus	47
5. DISCUSSÃO	51
5.1 Frequência de Respiração Aérea e exercício físico	51
5.2 Bloqueio farmacológico e controle da Frequência de Respiração Aérea	53

5.3 Resposta cardíaca e controle cardíaco durante o exercício físico	54
5.4 Crítica ao método	57
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Origem do O₂ e a Evolução da Respiração Aérea

A atmosfera da Terra primitiva continha pouco ou nenhum oxigênio (O₂) livre. O aumento no O₂ atmosférico ocorreu inicialmente quando algumas bactérias fotossintetizantes tornaram-se aptas a usar água como fonte doadora de íons de hidrogênio para a fotossíntese. Assim, por meio do processo de fixação de gás carbônico (CO₂) e água, seres autotróficos clorofilados tornaram-se capazes de sintetizar carboidrato e liberar O₂ para o ambiente, como subproduto de suas reações. Esta nova reação fez com que a concentração de CO₂ na atmosfera diminuísse, causando um decréscimo da temperatura da Terra e também um aumento da concentração de O₂ atmosférico (PURVES, 2004). Assim, quando a concentração de O₂ atmosférico tornou-se alta o bastante, também tornou-se possível a existência de células maiores e organismos mais complexos (PURVES, 2004).

Tanto as diferenças físicas entre ar e água quanto os mecanismos ecológicos que afetam a pressão parcial de O₂ (PO₂) nos ambientes aquáticos nos ajudam a compreender os fatores que selecionaram os peixes de respiração aérea (RA). As diferenças físicas entre ar e água e como elas influenciaram no comportamento respiratório tem sido discutido por muitos autores (PIIPER, 1982; DEJOURS, 1988). A uma mesma temperatura (20 °C) a viscosidade da água é de cerca de 1 cP (centipoise) e a do ar é de 0,02 cP, correspondendo a uma viscosidade da água 50 vezes maior que a do ar. Assim, como o trabalho necessário para movimentar a massa inerte aumenta proporcionalmente à viscosidade, a ventilação aquática se torna mais dispendiosa em relação à aérea (SCHMIDT-NIELSEN, 2011). Outra diferença física entre os ambientes aéreo e aquático envolve a velocidade de difusão de O₂, onde, a uma mesma PO₂ esta ocorre cerca de 10.000 vezes mais rápido no ar do que na água (SCHMIDT-NIELSEN, 2011). Por fim, a solubilidade de O₂ nos dois meios também é diferente. O volume de qualquer gás dissolvido na água depende tanto de sua pressão parcial quanto de sua constante de solubilidade (α), como descrito pela lei de Henry. A constante de solubilidade do O₂ na água é baixa e diminui com o aumento da temperatura e salinidade (DEJOURS, 1981). Assim, a maior difusibilidade do O₂ no ar em relação à água, bem como sua solubilidade e concentração, de aproximadamente 30 vezes maior no ar do que na água, são algumas características importantes para compreender sua concentração atual nos ambientes terrestre (0,209 L de O₂ por L de ar) e aquático (0,007 L de O₂ por L de H₂O), bem como a sua disponibilidade para os organismos que habitam tais meios.

Além das propriedades físicas, a concentração de O₂ em ambientes aquáticos também pode ser alterada por fatores ambientais. Por exemplo, a fotossíntese executada por macro e microfitas pode causar grande elevação nos níveis de O₂ aquático durante o dia, fase clara da fotossíntese. Outras variáveis ambientais, como ventos e correntes de densidade vertical na água

são vitais para o equilíbrio do O_2 atmosférico com o da água bem como o transporte de O_2 para zonas profundas (DUNN, 1983). Por outro lado, o consumo de O_2 pelos processos metabólicos da biomassa pode produzir regiões hipóxicas localizadas e/ou generalizadas (RANDALL et al., 1997). Corpos de água onde há pouco fluxo, baixa mistura vertical e baixa taxa fotossintética também podem gerar condições de hipóxia aquática (GRAHAM, 1997). Adicionalmente, a variação na temperatura da água, tanto diária quanto sazonal, é considerada um fator importante, onde o aumento da mesma promove a difusão de O_2 para o ambiente aéreo, diminuindo sua disponibilidade na água. Em determinados locais, durante o verão, as águas podem até secar totalmente, tornando o ambiente inóspito aos animais aquáticos. Outros ambientes naturais com baixa pressão parcial de O_2 dissolvido são águas profundas, regiões de brejos ou pântanos (GRAHAM, 1983; KRAMER, 1987).

Dessa forma, o contínuo aumento de O_2 na atmosfera, somado às diferentes características deste gás nos meios aquático e aéreo possibilitou, no final do período Siluriano (438-245 milhões de anos), o aparecimento da primeira espécie de peixe adaptado à RA (GRAHAM, 1997), muito antes da evolução dos anfíbios e invasão dos tetrápodes na Terra (LONG, 1995).

Os peixes modernos de RA ocorrem em uma variedade de ambientes de água doce e em alguns habitats marinhos, como recifes de corais tropicais, zonas intertidais rochosas, estuários e baías. Muitos fatores podem ter desempenhado um papel importante na seleção da RA entre as espécies marinhas, como, por exemplo, a adoção de um comportamento anfíbio para explorar os recursos na interface ar-água, a exposição periódica aérea imposta pela maré baixa e mesmo a hipóxia aquática em certos habitats (GIBSON, 1982; SAYER & DAVENPORT, 1991).

Entre os peixes de água doce, a seleção para a RA parece ter vindo primariamente dos efeitos da hipóxia aquática (JOHANSEN, 1970; DUNN, 1983). A RA evoluiu em peixes que viviam sob o gelo e em outros ambientes hipóxicos (KLINGER et al., 1982), bem como em muitos ambientes tropicais de planície.

Na verdade, a maioria das espécies de peixes modernos que exibem RA ocorre em águas doces tropicais, que estão sujeitas a secas sazonais. A falta de chuva aquece e represa estas águas, podendo formar aglomerados de peixes em poças isoladas. A fotossíntese nestas áreas não é suficiente para manter a normóxia, pois essas águas geralmente são protegidas por macrófitas de superfície ou denso povoamento de árvores. Assim, aliando-se a produção limitada de O_2 , o aumento da temperatura e a grande demanda desse gás imposta pela aglomeração e decomposição de matéria orgânica, esse microambiente pode apresentar condições de hipóxia ou até mesmo anóxia. São nesses tipos de habitats, caracterizados por mudanças sazonais na quantidade de O_2 e volume de água, que a seleção natural tem agido repetidamente entre a diversa fauna de peixes tropicais de água doce, trazendo uma série de especializações diferentes entre as espécies, possibilitando viverem nesses ambientes (THOMSON, 1993; BRAY, 1985; LONG, 1995).

Os peixes com RA são usualmente classificados em dois grupos funcionais, os respiradores de ar “facultativos” e os “obrigatórios” (JOHANSEN, 1970; GRAHAM, 1997). Os facultativos são aqueles que, por definição, complementam a captação de O_2 na superfície, mas são capazes de sobreviver apenas com sua respiração branquial se não tiverem acesso ao ar em águas em condições de normóxia. Por outro lado, os respiradores aéreos obrigatórios, nos quais quase a totalidade da tomada de O_2 é facultada a órgãos de respiração aérea (ORA), são completamente dependentes de O_2 atmosférico, até mesmo em águas em condições normóxicas. Isso ocorre pelo fato destas espécies possuírem áreas de superfícies branquiais muito reduzidas, diminuindo assim a efetividade deste órgão na captação de O_2 . Apesar da considerável redução, as brânquias não foram completamente perdidas neste grupo de peixes, uma vez que estes órgãos possuem uma função central na excreção de CO_2 e amônia e também no balanço iônico, osmótico e ácido-base (RANDALL et al., 1981; GRAHAM, 1997; BRAUNER & VAL, 2006). Porém, deve-se ressaltar que a classificação facultativo/obrigatório não é absoluta. Existem peixes que utilizam as duas estratégias dependendo do estágio de vida ou das condições do ambiente onde vivem (REID et al., 2006).

A RA é, portanto, uma das respostas adaptativas utilizadas pelos peixes que habitam áreas onde o fornecimento de O_2 é escasso. Outros mecanismos acionados podem ser comportamentais, por exemplo, fuga de áreas hipóxicas (CALA, 1987) ou respiração aquática de superfície (ASR), a qual o peixe utiliza a fina camada de ar saturado da superfície para ventilar suas brânquias (KRAMER, 1983).

1.2 Peixes de Respiração Aérea e a Família Clariidae

Os peixes de RA apresentam uma grande variação interespecífica em relação ao grau de dependência da água ou do ar. Tais características estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento das brânquias e do ORA, assim como o ambiente em que vivem (JOHANSEN, 1966; FARBER & RAHN, 1970; GAREY & RAHN, 1970). Além dos fatores citados anteriormente, a relação $O_2:CO_2$ no meio aquático, a afinidade da hemoglobina pelo O_2 ($Hb-O_2$), a temperatura, o nível de perfusão das vias respiratórias e a presença de predadores podem influenciar na extração de O_2 do ar atmosférico (KRAMER et al., 1983; GRAHAM & BAIRD, 1984; GRAHAM, 1985; SHINGLES et al., 1985).

As descrições do ORA começaram no início do século 19, sendo uma das primeiras feita por HILAIRE (1802) para a espécie *Silurus* (= *Clarias*) *anguillaris*. Entre os teleósteos que realizam RA há uma grande diversidade de ORA e as principais características para o funcionamento desse órgão são a aquisição, retenção e absorção de O_2 atmosférico, onde poucas estruturas além da boca e mandíbula podem ser usadas para capturar ar (GRAHAM, 1997). Em relação ao aprisionamento do ar inspirado, cavidades espaçosas, com grande perfusão sanguínea

e sistema vascular ajustável são requisitos necessários e ocorrem ou podem se desenvolver na boca, região branquial ou trato digestivo (GRAHAM, 1997). Definiram-se então alguns tipos de ORA, como, pulmão (*Protopterus sp*, *Lepidoseren sp*), bexigas de gases respiratórios (*Amia sp*, *Arapaima sp*), ORA na região da cabeça, em câmaras bucais e faríngeas (*Hypopomus sp*), câmaras branquial e opercular (*Clarias sp*), ORA formados ao longo do trato digestivo, incluindo esôfago (*Dallia sp*), ducto pneumático (*Anguilla sp*), estômago (Loricariidae) e intestino (Cobitidae) e por fim a pele, servindo como uma estrutura auxiliar na RA em diversas espécies (*Symbranchus sp*) (GRAHAM, 1997) (Figura 1). Assim, embora a RA tenha evoluído diversas vezes e independentemente entre as espécies, observa-se que a localização dos lugares para as trocas gasosas tem permanecido amplamente sob influências conservativas de estruturas “predispostas” para a captação de ar, assim como os lugares no corpo onde o armazenamento e efetiva vascularização podem ser desenvolvidos (GRAHAM, 1997).

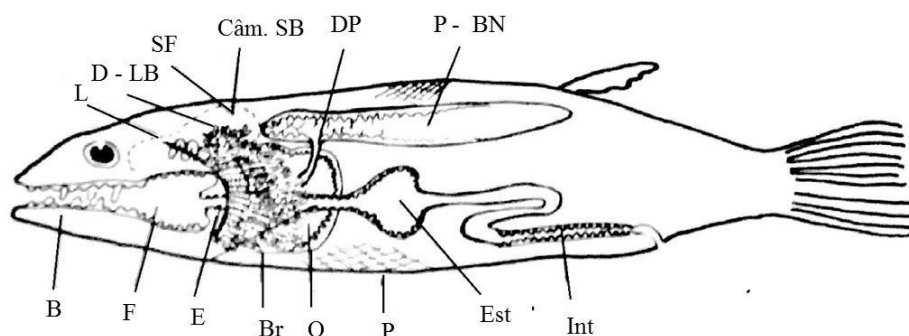


Figura 1: Peixe hipotético contendo os diversos ORA conhecidos atualmente, sendo: superfície epitelial modificada dentro da cavidade bucal (**B**); faríngea (**F**); esofágica (**E**); opercular (**O**) e branquial (**Br**); pele (**P**); estômago (**Est**); intestino (**Int**). Espaços modificados incluem a câmara suprabranquial (**Câm. SB**) ou sacos faríngeos (**SF**). Câmaras modificadas incluem o ducto pneumático (**DP**) e o pulmão ou bexiga natatória (**P-BN**). Projeções dentro desses espaços incluem o labirinto (**L**); dendritos e leques branquiais (**D-LB**). **Fonte:** Modificado de GRAHAM (1997).

Entre as diversas espécies de peixes de respiração aérea já catalogadas estão as da ordem Siluriformes. Esta é a segunda maior ordem do grupo de peixes tropicais, possuindo 36 famílias, 478 gêneros e mais de 3.000 espécies (FERRARIS JR, 2007). Os membros desta ordem são chamados de bagres ou “walking catfishes”, devido à presença de grandes barbilhões (bigodes como os de gatos) quimiossensitivos, os quais facilitam a procura de alimentos entre a vegetação e rochas em águas profundas, onde geralmente vivem, além de se locomoverem fora d’água com a ajuda de suas fortes nadadeiras peitorais e movimentos corpóreos (BURGESS, 1989; PAXTON & ESCHMEYER, 1995).

A família Clariidae encontra-se na ordem Siluriformes e é caracterizada por bagres de respiração aérea, possuindo aproximadamente 14 gêneros que se distribuem naturalmente por todo o território africano e sudeste asiático (TEUGELS et al., 1990; HEE, 1999; TEUGELS &

ADRIAENS, 2003). Atualmente estão distribuídos por muitas partes da América após introdução por piscicultores devido ao rápido crescimento, fácil adaptação a qualquer ambiente e boa qualidade da carne deste grupo (LACHNER et al., 1970; COURTENAY & STAUFFER, 1984). No Brasil sua introdução ocorreu em 1997, porém muitos peixes escaparam dos tanques das pisciculturas e invadiram rios e córregos adjacentes. Devido à rápida taxa de crescimento ocorreu uma ampla disseminação pelo território brasileiro e, por se tratar de uma espécie exótica e predadora, tem causado danos ecológicos à ictiofauna brasileira (ALVES et al., 1999).

As espécies do gênero *Clarias* são caracterizadas por possuir um corpo anguiliforme, nadadeiras dorsal e anal longas, cabeça achatada e boca larga, com 4 pares de barbilhões (HEE, 1999). O bagre africano, *Clarias gariepinus* (Figura 4), onívoro, alimenta-se desde material vegetal, plâncton, artrópodes, moluscos até animais de maior porte, como peixes, anfíbios e répteis (DE GRAAF & JANSSEN, 1996; YALÇIN et al., 2001). Estes animais possuem nadadeiras peitorais fortes, corpo alongado e a presença de um ORA, o que os possibilita saírem da água para forragear ou procurar por sítios reprodutivos (DONNELLY 1973; MILLI & TEIXEIRA, 2006). Assim, adaptam-se bem em rios com grande fluxo de água bem como em ambientes com água mais parada, como lagos (FAO, 1997; MILLI & TEIXEIRA, 2006).



Figura 2: Exemplar de *Clarias gariepinus*. (Foto: Felipe Rocco Blasco).

SINGH (1993) evidenciou que as brânquias ou tecidos branquiais não diferenciados contribuem para a formação de muitas estruturas de ORA que se desenvolvem na região da cabeça ou próxima a ela. Dessa forma, o ORA deste gênero é composto por um par de câmaras suprabranquiais localizadas dorso posterior à cavidade opercular e quase totalmente preenchido por “árvores respiratórias” (órgãos arbóreos), que correspondem a extensões das partes mais elevadas dos 2º e 4º arcos branquiais. A abertura de cada câmara possui válvulas que impedem a entrada de água, sendo extensões, em forma de leques, das últimas lamelas branquiais interiores de cada arco branquial (GRAHAM, 1997) (Figura 5). A superfície mais interna destas aberturas, a base, as paredes interiores da câmara e também as superfícies arborescentes são envolvidas por

um epitélio branquial modificado que também auxilia a função respiratória aérea (MOUSSA, 1956, 1957; MUNSHI, 1961, 1976; SINGH et al, 1982).

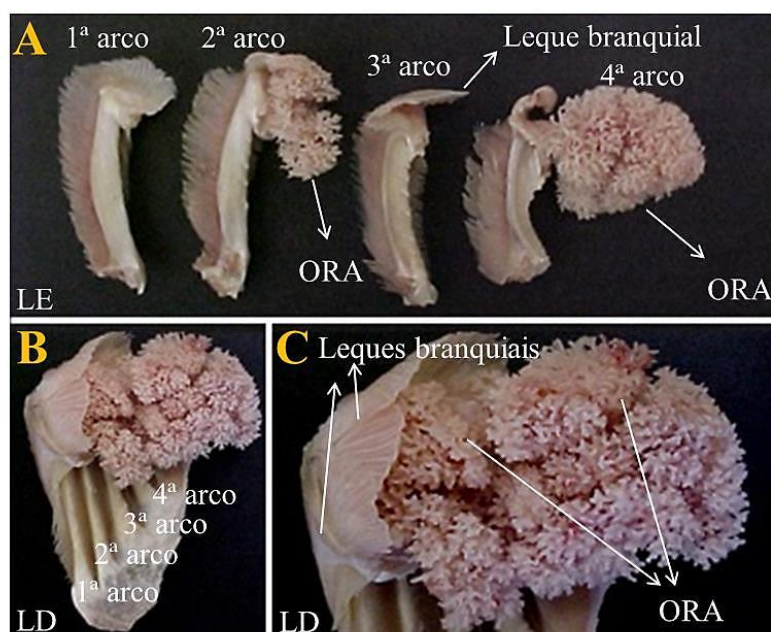


Figura 3: Fotografias das estruturas morfofuncionais de RA de *Clarias gariepinus*. **A-** Vista dos arcos branquiais separados; **B-** Vista dos arcos branquiais unidos; **C-** Vista aproximada dos leques branquiais e ORA; LE – lado esquerdo, LD – lado direito. **Fonte:** Modificado de GLASS & RANTIN (2009) e BELÃO (2010).

Estudos prévios de MOUSSA (1957) mostraram que o ORA de outra espécie do gênero, *Clarias lazera*, normalmente não entram em contato com a água. Nos clariídeos, a expiração de ar precede a inspiração e deve ocorrer durante a subida à superfície. A expiração é iniciada pela contração das câmaras faríngeas e suprabranquiais. Durante esse processo, a boca e abertura do ORA, entre os leques dos 2º e 3º arcos branquiais são mantidos fechados para forçar o ar velho, via abertura de expiração, à câmara opercular, onde as bolhas são liberadas. Após esse processo o ar engolido expande as cavidades bucais e faríngeas e desloca a posição do arco branquial de uma maneira que torna capaz o preenchimento do ORA. A compressão da boca e faringe então desloca o ar para dentro do ORA, enquanto o relaxamento da musculatura estabelece um vácuo parcial dentro da câmara facilitando a entrada de ar (MOUSSA, 1956; VANDEWALLE & CHARDON, 1991).

Em relação à perfusão do ORA de *Clarias sp*, não há registro de desvio ou perfusão seletiva das brânquias ou do ORA, sendo observada uma circulação paralela entre ambas as estruturas e o sangue que sai do ORA se dirige para a circulação sistêmica via aorta dorsal (GRAHAM, 1997).

1.3 Características Gerais da Natação e Peixes de Respiração Aérea

A natação é um comportamento característico do grupo dos peixes: todas as espécies nadam em algum momento de seu ciclo de vida. Os motivos pelos quais os peixes nadam são os mais variados, incluindo a busca por comida, fuga de predadores ou visando interações sociais, como defesa de território e/ou reprodução (McKENZIE, 2011). Além disso, muitas espécies nadam para mudar de habitat, seja por mudanças sazonais relacionadas à migração reprodutiva, bem como para evitar estressores ambientais.

A natação de peixes pode ser influenciada por diferentes forças, fazendo com que seja necessário um gasto de energia para que estas sejam superadas. Dentre elas, a força inercial exercida pela alta densidade e viscosidade da água age na direção horizontal, exigindo uma força de propulsão (impulso) do animal para que ocorra uma natação efetiva. Adicionalmente, as características de peso e flutuabilidade do animal agem na direção vertical, influenciando também na eficiência de natação do animal (Figura 4). Dessa forma, a maior parte da energia produzida é gasta pelos músculos ativos na natação, mas também há gastos energéticos relacionados à ventilação branquial e à contração cardíaca (SFAKIOTAKIS et al., 1999; McKENZIE, 2011).

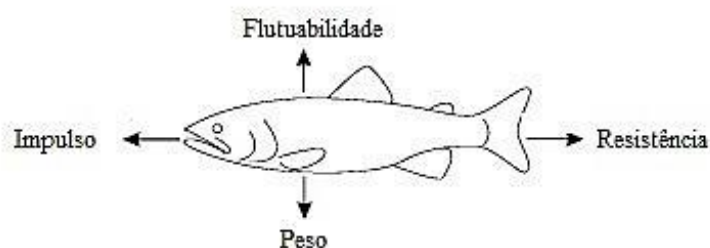


Figura 4: Desenho representando as forças que influenciam na natação de peixes. **Fonte:** Modificado de SFAKIOTAKIS et al. (1999).

Os peixes nadam utilizando dois tipos de musculatura estriada esquelética, a musculatura vermelha aeróbica, arranjada como duas tiras orientadas rostro-caudal abaixo da pele, próximo à linha média, e a musculatura branca anaeróbica, compreendendo os maiores blocos de miótomos, posicionados em ambos os lados da coluna dorsal (Figura 5).

A musculatura vermelha aeróbica, que representa geralmente cerca de 10 % (GREER-WALKER & PULL, 1975) da massa muscular total, é usada na natação estável de nível lento a moderado em atividades que devem ser sustentadas por períodos longos, como o forrageio, a migração para longas distâncias e a manutenção da posição em rios de fluxo contínuo. Dessa maneira, o desempenho no exercício aeróbico irá depender dos fatores que influenciam na taxa de fornecimento de substratos para o metabolismo aeróbico, sendo eles, a morfologia e área de

superfície das brânquias e a função cardíaca para contração e ejeção suficiente de sangue (McKENZIE, 2011).

A musculatura branca anaeróbica forma a maior parte de musculatura na maioria dos peixes, bem como compõe grande parte da massa corpórea, algumas vezes correspondendo a mais de 50% da massa total do animal. Esse tipo de musculatura é utilizado em breves arranques em natações a grandes velocidades, como, por exemplo, em perseguições presa-predador. As fibras dessa musculatura possuem pouca capacidade aeróbica e são pouco vascularizadas, quando comparadas às fibras da musculatura vermelha (McKENZIE, 2011) (Figura 5).

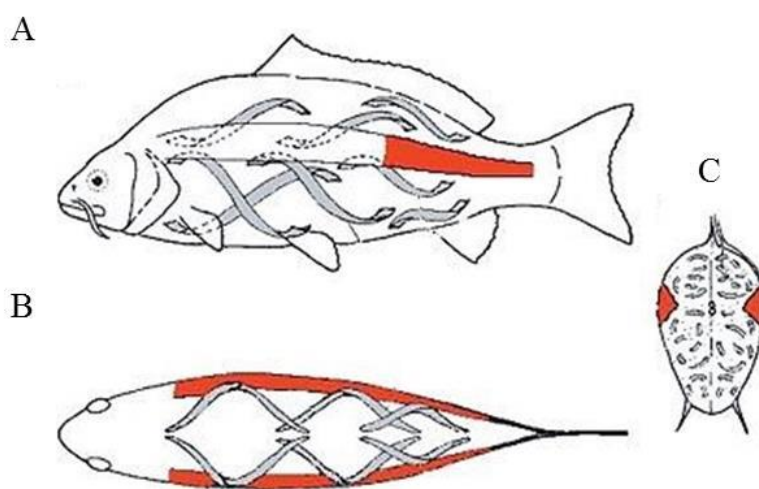


Figura 5: Visões representativas dos diferentes tipos musculares na carpa, *Cyprinus carpio* em visões **A** – Longitudinal, **B** - Dorsal e **C** – Transversal. O músculo vermelho está representado em vermelho e o músculo branco em cinza. **Fonte:** Modificado de ROME et al. (1988).

A capacidade de nadar aerobicamente depende da habilidade do peixe em prover O_2 e substratos para o músculo em atividade a uma taxa maior ou igual à suas necessidades metabólicas basais. Em peixes de respiração aquática observa-se um pronunciado aumento na ventilação branquial conforme a natação é efetuada, podendo aumentar em até 10 vezes o fluxo de água pelas brânquias, bem como um aumento na frequência cardíaca e também no débito cardíaco. Além das características anteriormente citadas, durante o exercício observa-se também uma redistribuição sanguínea, diminuindo a perfusão em órgãos do trato digestório e aumentando a perfusão da musculatura vermelha, cérebro e coração (McKENZIE, 2011).

Pode-se assumir que todos os peixes de RA usam natação aeróbica prolongada em algum momento de seus ciclos de vida, em especial durante atividades de rotina em regiões próximas a seu nicho (MLEWA et al., 2005) e durante migrações sazonais, como as migrações reprodutivas apresentadas pelos pangasídeos *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) e *Pangasius*

bocourti (Sauvage, 1880) no Rio Mekong, os quais nadam mais de 700 km rio acima para desovarem (SO et al., 2006; HOGAN et al., 2007). Durante a migração, os peixes provavelmente realizam eventos frequentes de RA, porém tal comportamento não é bem documentado, pois geralmente migram no período noturno ou então fazem uso de camuflagens para evitar predação aérea (SMITH & KRAMER, 1986; SHINGLES et al., 2005). Outros fatores que afetam a realização de RA são as condições ambientais, como temperatura e O_2 dissolvido (LEFEVRE et al., 2014).

Muitos estudos, visando a compreensão do desempenho de natação de peixes, são efetuados em aparelhos conhecidos como “Respirômetro de Natação” (seção 3.3), nos quais os peixes respondem à necessidade de manterem sua posição na coluna d’água em uma velocidade conhecida dentro de um sistema projetado para minimizar ao máximo a turbulência e produzir uma corrente com velocidade uniforme e laminar (McKENZIE et al., 2012; LEFEVRE et al., 2013).

Peixes que apresentam RA diferem no grau de dependência da respiração aérea para manter o metabolismo aeróbico. Nas espécies estudadas até o momento, exercícios aeróbicos realizados em respirômetro de natação estimularam o comportamento de respiração aérea (GRIGG, 1965; FARMER & JACKSON, 1998; SEYMOUR et al., 2004, 2007; McKENZIE et al., 2012; LEFEVRE et al., 2013). Dessa forma, os eventos de subida à superfície e o consumo de O_2 do ar estão relacionados com aumentos na velocidade de natação, levando a um aumento na frequência de respiração aérea (f_{AB}) e um decréscimo no intervalo entre respiração aérea (ABI) (FARMER & JACKSON, 1998).

Embora a importância da RA durante a atividade já seja conhecida para peixes bimodais (GRAHAM, 2006), a natação aeróbica em túneis de natação foi estudada em apenas 5 espécies: *Amia calva*, *Lepisosteus oculatus*, *Megalops cyprinoides*, *Gymnotus carapo* e *Pangasianodon hypophthalmus* (FARMER & JACKSON, 1998; SEYMOUR et al., 2004, 2007; McKENZIE et al., 2012; LEFEVRE et al., 2013).

1.4 Sistema Nervoso Autônomo e Modulação Cardíaca

O termo Sistema Nervoso Autônomo (SNA) foi primeiramente citado por John Newport Langley (LANGLEY, 1921) no final do século XIX e é bem estabelecido para mamíferos e vertebrados em geral. Em seu trabalho, Langley dividiu tal sistema em 3 partes: (1) sistema nervoso simpático, o qual consiste de fibras nervosas que se originam dos segmentos torácico e lombar da medula espinhal; (2) sistema nervoso parassimpático, o qual consiste de fibras nervosas que se originam na região cranial, sendo composto pelos nervos III (oculomotor), VII (facial), IX (glossofaríngeo) e X (vago) e também de nervos na região sacral; e (3) sistema nervoso entérico, o qual está presente na parede do intestino.

Os sistemas nervosos simpático e parassimpático consistem na ação conjunta de dois tipos neurais em série, os neurônios pré-ganglionares e os neurônios pós-ganglionares. Independentemente do tipo neural (simpático ou parassimpático), as fibras pré-ganglionares são colinérgicas (DALE, 1933). Adicionalmente, os axônios dos neurônios pré-ganglionares no sistema simpático são curtos, enquanto os axônios dos neurônios pós-ganglionares desse mesmo sistema são longos e liberam adrenalina/noradrenalina. O inverso se aplica para o sistema parassimpático, que possui neurônios pré-ganglionares longos e neurônios pós-ganglionares curtos, liberando acetilcolina e agindo próximo ou dentro da parede dos órgãos alvos (NILSSON, 2011).

Para vertebrados não mamíferos, a subdivisão proposta por Langley se torna imperfeita devido à dificuldade de separar as regiões lombar e sacral ao longo de medula espinhal, principalmente em peixes, os quais apresentam muitas variações entre os diferentes grupos (NILSSON, 2011). Assim, NILSSON (1983) propôs uma terminologia alternativa para descrever o SNA, criando o termo “vias craniais”, que são similares às vias craniais do sistema nervoso parassimpático na terminologia de Langley e o termo “vias espinhais”, referente a todas as vias que partem da medula espinhal, similar ao sistema nervoso simpático e o sistema parassimpático sacral na terminologia de Langley.

Como dito anteriormente, observam-se algumas diferenças no arranjo anatômico do SNA nos diferentes grupos de peixes. O padrão geral encontrado em vertebrados, no qual o sistema autônomo da medula espinhal parte de raízes ventrais dos nervos espinhais varia em Ciclostomos, onde, tanto em Petromyzontidae (lampreia) quanto em Myxinoideis (feiticeira), observa-se, além das raízes ventrais, eferências via raízes dorsais (BURNSTOCK, 1969; CAMPBELL, 1970).

Em Elasmobrânquios, a estrutura do SNA difere um pouco do padrão encontrado em outros vertebrados. Os gânglios paravertebrais do sistema autonômico espinal (simpático) estão orientados enfileirados, mas não estão longitudinalmente conectados para formar uma cadeia simpática, como no caso de teleósteos e na maioria dos tetrápodes (BURNSTOCK, 1969; NILSSON, 2011). Em relação aos nervos autonômicos craniais, só possuem eferências do nervo

III (oculomotor), que controla a íris, e nervo X (vago), que controla o coração e o intestino, mas o controle vagal nas brânquias ainda é incerto (YOUNG, 1933) (Figura 6).

Em Teleósteos, o arranjo geral do SNA está próximo do padrão apresentado por vertebrados mais derivados, como mamíferos. Uma das principais diferenças é a ausência de uma via autonômica parassimpática nos nervos craniais VII (facial) e IX (glossofaríngeo), principalmente devido à ausência de glândulas lacrimais e salivares, observado também em Elasmobrânquios. Há a presença de vias eferentes nos nervos craniais III e X, controlando, respectivamente, os olhos e o coração, brânquias, intestino e bexiga natatória, quando presente (NILSSON, 1983). A segunda diferença no padrão geral do SNA é a porção cefálica da cadeia simpática. Essa rede de neurônios se direciona para a região da cabeça, ocorrendo uma junção dos nervos craniais (parassimpático) com os nervos da cadeia espinal (simpático), sendo usual a utilização do termo “tronco simpato-vagal” para o nervo vago (X) (BURNSTOCK, 1969) (Figura 6).

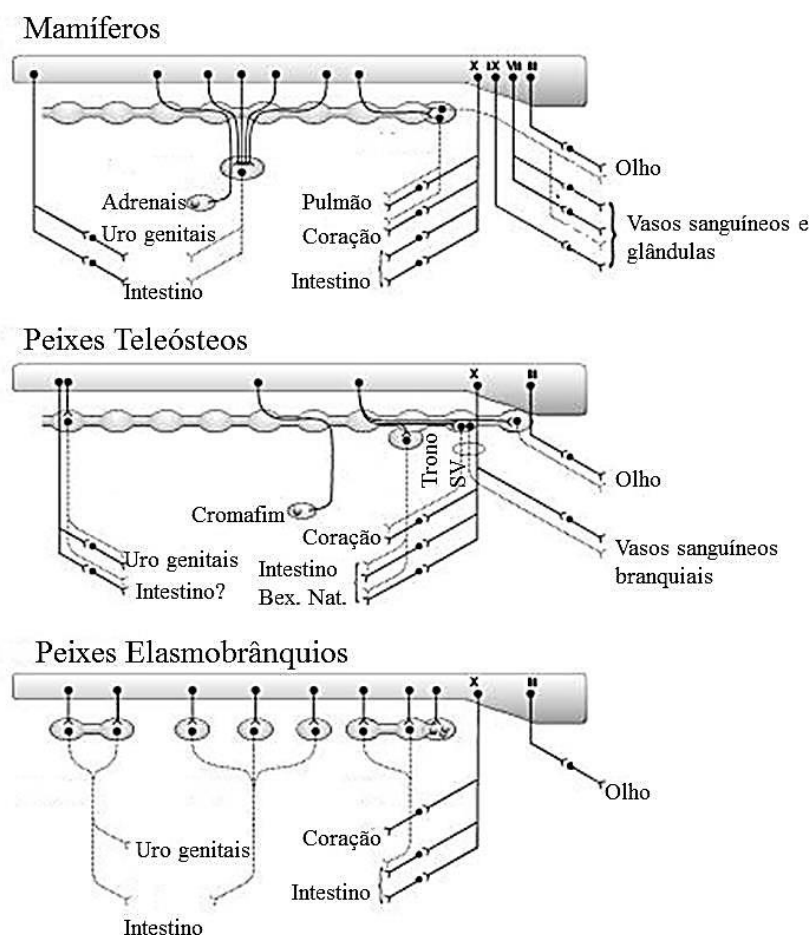


Figura 6: Comparação da anatomia do SNA entre mamíferos, peixes teleósteos e elasmobrânquios. **Fonte:** Modificado de NILSSON (2011).

Apesar de cada contração cardíaca ser iniciada por células marca-passo, o SNA representa o maior modulador da frequência cardíaca (f_H), agindo como um importante mediador do desempenho cardíaco, controlando também o fluxo sanguíneo e a pressão sanguínea (NILSSON, 2011).

Entre os diferentes grupos de vertebrados observa-se uma grande variação na atuação do SNA como modulador da f_H . Em tetrápodes, o coração é controlado por uma inervação vagal inibitória, composta por fibras colinérgicas que diminuem a f_H e o volume sistólico. Em contrapartida, ocorre uma inervação excitatória controlada por fibras adrenérgicas da cadeia simpática. Esses dois padrões antagonistas irão agir em sinergia modulando a frequência cardíaca (NILSSON, 2011).

Em Ciclostomos, variações morfológicas e fisiológicas cardiovasculares podem ser observadas entre Petromyzontidae (lampreias) e Myxinoidei (feiticeiras) (FARRELL, 2007). Observa-se em lampreias a presença de um único coração, o qual recebe inervação vagal excitatória devido à presença de receptores nicotínicos cardíacos (BURNSTOCK, 1969), contrastando do padrão geral cardio inibitório após estimulação vagal encontrado em todos os outros vertebrados. Já as feiticeiras possuem um coração sistêmico (branquial) e corações acessórios, dentre os quais o porta-hepático é o único composto por tecido miocárdico (FANGE et al., 1963). Adicionalmente, neste grupo não há inervação autonômica do coração, sendo o mesmo funcionalmente aneural, porém a f_H pode ser modulada por catecolaminas circulantes liberadas pelas células cromafim intra cardíacas (JOHNSON & AXELSSON, 1996) (Figura 7).

Uma condição similar às feiticeiras é observada em Elasmobrânquios, onde não há evidências que ocorra inervação adrenérgica no coração, podendo, entretanto, ocorrer um controle adrenérgico cardíaco via catecolaminas circulantes liberadas pelo tecido cromafim localizado na parte posterior do seio venoso (NILSSON & HOLMGREN, 1988). Em relação à inervação parassimpática, sabe-se que o coração de Elasmobrânquios possui uma inervação colinérgica vagal inibitória, via receptores muscarínicos (SANDBLOM & AXELSSON, 2011). As eferências vagais se localizam principalmente no nodo sinoatrial, onde provavelmente está localizado o marca-passo cardíaco (SANTER, 1985) (Figura 7).

Os peixes teleósteos são o primeiro grupo de vertebrados a apresentar uma inervação dupla no coração, sendo assim, encontram-se fibras excitatórias adrenérgicas e fibras inibitórias colinérgicas (NILSSON, 1983). As fibras adrenérgicas são encontradas em todas as partes do coração do teleósteo e chegam ao mesmo principalmente via tronco simpato-vagal e também via nervos espinais anteriores (NILSSON, 1983) (Figura 7). Diferentemente de mamíferos, onde a noradrenalina é a principal catecolamina neuronal liberada, em teleósteos tanto adrenalina quanto noradrenalina são liberadas pelos neurônios (SANDBLOM & AXELSSON, 2011) (Figura 7). As catecolaminas se ligam a receptores β -adrenérgicos presentes no miocárdio e tecido marca-passo e exercem efeitos cronotrópico e inotrópico positivos no coração (NILSSON, 1983). As fibras

cardíacas colinérgicas são levadas pelo nervo vago e são encontradas no seio venoso, onde se acredita estar localizado o tecido marca-passo (SANDBLOM & AXELSSON, 2011). A ação inibitória dessas fibras ocorre devido à liberação de acetilcolina, que se liga aos receptores muscarínicos presentes no tecido marca-passo (NILSSON, 2011).

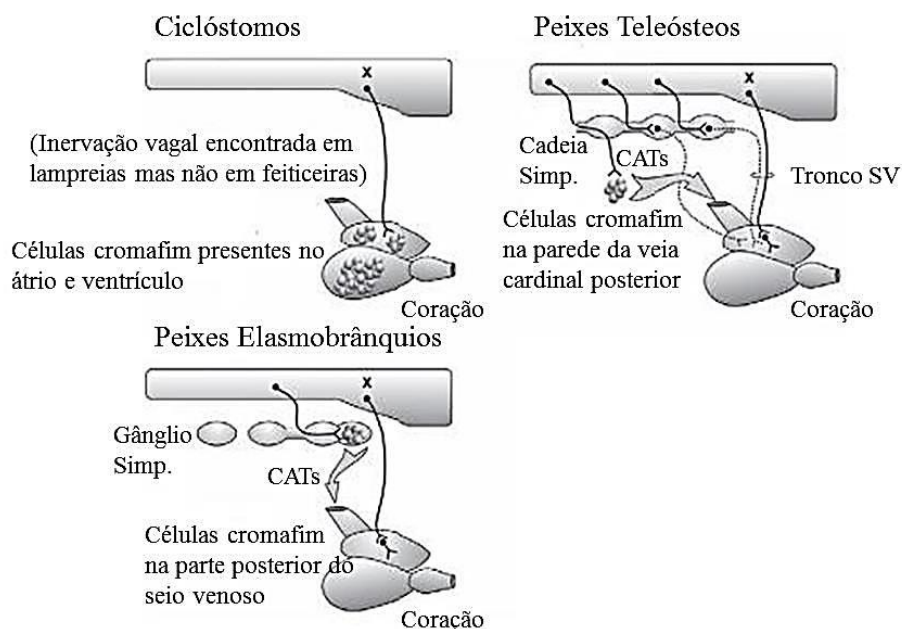


Figura 7: Ilustração comparando a ação do SNA na modulação cardíaca em ciclóstomos, peixes teleósteos e elasmobrânquios. **Fonte:** Modificado de NILSSON (2011).

O SNA possui um papel central no controle e coordenação do sistema cardiovascular em todos vertebrados, controlando a frequência e força de contração cardíaca e controle da resistência vascular (NILSSON, 1983; MORRIS & NILSSON, 1994). O sistema cardiovascular é um componente central na maquinaria fisiológica que mantém a homeostase no corpo do animal. A principal função é suprir oxigênio e nutrientes para os tecidos e remover metabólitos provenientes dos processos celulares (SANDBLOM & AXELSSON, 2011).

A maior parte dos estudos em controle autônomo cardíaco em peixes foi desenvolvido em teleósteos. É importante ressaltar que esse é um grupo muito diverso e grande, correspondendo a quase 50 % do total dos vertebrados e só uma pequena fração dessas espécies foram estudadas no que tange a função do sistema nervoso autônomo. Entre as espécies estudadas até o momento, observou-se que a f_H é afetada por um balanço entre as ações do tônus adrenérgico e do tônus colinérgico e o grau de ação de cada um varia entre as espécies (AXELSSON et al., 1987; ALTIMIRAS et al., 1997; AXELSSON, 2005; McKENZIE et al., 2007; LEITE et al., 2009; PETERSEN & GAMPERL, 2010) e, dentro de uma espécie, irá variar dependendo do estágio de

vida e do sexo (SCHWERTE et al., 2006; SANDBLOM et al., 2009), bem como entre as condições do experimento, como temperatura, hipóxia e exercício físico.

Animais com um padrão de respiração descontínua, como, por exemplo, peixes que realizam RA e tetrápodes que mergulham, apresentam um quadro de bradicardia durante a apneia, seguido de uma taquicardia após realização do evento de RA (TAYLOR, 1999), sendo observada uma clara diferença nos valores de frequência cardíaca Pré-Respiração Aérea (f_H Pré-RA) e frequência cardíaca Pós-Respiração Aérea (f_H Pós-RA). Acredita-se que as variações na f_H em torno de cada evento de RA estejam sob modulação autonômica, assim como as variações na f_H Routine, frequência cardíaca medida entre dois eventos de RA (SANDBLOM et al., 2009).

Não há muitos estudos que evidenciem a modulação autonômica cardíaca durante o exercício físico em peixes, em especial aqueles que realizam respiração aérea. A citar, diversos estudos realizados com robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), respirador unimodal, observaram que o tônus adrenérgico permanece baixo durante todas as velocidades de natação e que o tônus colinérgico é o responsável pelas variações na f_H (AXELSSON et al., 2002; CHATELIER et al., 2005; 2006; DUPONT-PRINET et al., 2009; IVERSEN et al., 2010). Há evidências de que, durante a transição de inatividade para realização de exercício físico ou transições entre intensidade de exercício físico, o tônus colinérgico vagal diminui sua atuação na modulação cardíaca, aumentando assim a f_H (CAMERON, 1978; AXELSSON & NILSSON, 1986; AXELSSON et al., 1989; AXELSSON et al., 1994; AXELSSON et al., 2000). Dessa forma, o aumento na f_H devido ao aumento na intensidade do exercício seria acompanhado por uma diminuição de atividade colinérgica.

Dessa forma, considerando as relações cardiorrespiratórias já descritas entre os diferentes grupos de animais, a hipótese deste estudo é que as variações na f_H observadas antes e após cada evento de RA (a bradicardia que precede e a taquicardia que sucede) sejam parte de uma série de ajustes fisiológicos que visam otimizar a perfusão do ORA, aumentando a extração de O_2 atmosférico e, assim, melhorando o desempenho do animal quando a demanda metabólica de O_2 é alta, por exemplo, durante a natação sustentada.

1.4.1 Avaliação da atividade dos tônus adrenérgico e colinérgico por meio da aplicação de fármacos

Estudos que visam compreender a modulação autonômica cardíaca em vertebrados em geral utilizam fármacos antagonistas do sistema nervoso autônomo. Fármacos antagonistas são aqueles que se ligam aos receptores e não os ativam, impedindo que uma molécula agonista se ligue a esse mesmo receptor e desencadeie uma resposta secundária (RANG & DALE, 2012).

Sabe-se que os dois principais neurotransmissores que agem no sistema nervoso autônomo são a acetilcolina e a adrenalina. Tanto os receptores muscarínicos de acetilcolina quanto os receptores de adrenalina presentes nas células estão acoplados à proteína G, chamados também de receptores metabotrópicos (RANG & DALE, 2012). Dessa forma, os respectivos fármacos antagonistas destes neurotransmissores a serem utilizados em estudos de modulação cardíaca são a atropina e o propranolol.

A atropina é um alcalóide de origem natural, encontrada na planta solanácea beladona (*Atropa belladonna*) e age como antagonista competitivo de receptores muscarínicos. Tal ação é possível devido à presença de grupo ésteres e básicos na mesma proporção do encontrado na acetilcolina. Assim, a atropina irá induzir um aumento na f_H por meio do bloqueio dos receptores colinérgicos pós-sinápticos, diminuindo assim, a inibição parassimpática (ALTIMIRAS, 1997).

O propranolol é um antagonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos. Assim, apresenta igual afinidade tanto a receptores β_1 quanto a receptores β_2 . Dessa forma, ele irá competir com as catecolaminas naturais ligando-se aos receptores β -adrenérgicos cardíacos, resultando em um efeito cronotrópico e inotrópico negativo (ALTIMIRAS, 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar a regulação autonômica do coração de *Clarias gariepinus*, bem como a contribuição dos tônus adrenérgico e colinérgico nas funções cardíaca e respiratória, quando *Clarias* é exposto a crescentes velocidades de natação.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as variações de f_{RA} em *C. gariepinus* quando submetido a velocidades diferentes de natação em situação controle e após injeção de drogas antagonistas do SNA;
- Analisar variações na f_H Pré-RA, f_H Pós-RA e f_H Routine em *C. gariepinus* durante o exercício em condições controle e após injeção de drogas antagonistas do SNA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e manutenção em laboratório

Foram utilizados 18 espécimes jovens de bagre africano, *C. gariepinus* (131 ± 5 g, E.P.M.), obtidos na piscicultura Poletini no município de Mogi Mirim, SP, Brasil. Os peixes foram aclimatados por pelo menos quatro semanas em tanques de 500 L no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar, São Carlos/SP, com aeração constante ($PO_2 \sim 140$ mmHg) e recirculação de água decolorizada, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os peixes receberam ração comercial *ad libitum* uma vez por dia e antes de cada experimento foram privados de alimento por um período de 48 h.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (Parecer nº 036/2013).

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Os peixes foram previamente anestesiados em solução aquosa de benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) até seus movimentos ventilatórios cessarem. Em seguida, foram transferidos para uma mesa cirúrgica e suas brânquias foram continuamente irrigadas com uma solução mais fraca e aerada de benzocaína ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$).

Para realizar as medidas da frequência cardíaca (f_H) através dos registros de eletrocardiografia, eletrodos de ECG foram implantados e suturados com pontos cirúrgicos na seguinte sequência: o eletrodo principal foi inserido ventralmente na cavidade cardíaca, tomando-se cuidado para não atingir o coração, enquanto o eletrodo de referência foi inserido na musculatura acima da linha lateral e na parte mediana do animal (GLASS et al., 1991; RANTIN et al., 1993). Adicionalmente, um terceiro eletrodo foi colocado na água do respirômetro. Esta preparação resultou em um eletrocardiograma com as características da derivação D1 da eletrocardiografia padrão a partir da qual foram determinados os valores da f_H .

Para a injeção de drogas agonistas (acetilcolina e adrenalina) e antagonistas (propranolol e atropina) do sistema autonômico do coração, uma cânula de polietileno (PE-10) foi implantada e suturada na cavidade intraperitoneal por meio de um pequeno orifício, o qual foi aberto utilizando-se uma agulha, na região ventral do animal, contendo solução de salina ($\text{NaCl} - 0,9\%$) (Figura 8A). Para evitar que os movimentos do animal danificassem os eletrodos e a cânula durante a recuperação e o experimento, as extensões destes foram posicionadas na região dorsal, próxima ao início da região óssea craniana, onde então foi realizada uma sutura única para fixação, sendo posteriormente enrolados em torno de um material flutuante (Figuras 8B e C). Todo o procedimento levou cerca de 25 minutos.

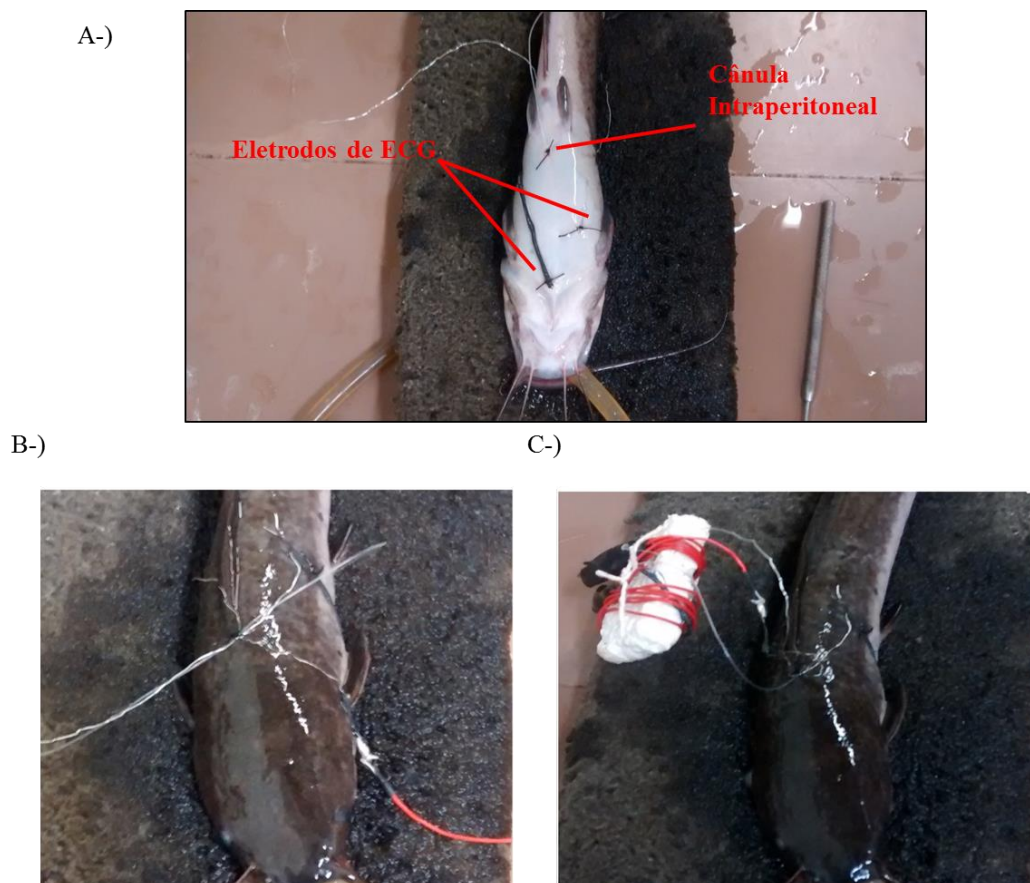


Figura 8: *C. gariepinus* após procedimentos cirúrgicos. A) Pontos de inserção dos eletrodos de ECG e cânula de polietileno na região ventral do animal. B) Ponto de sutura para fixação dos eletrodos e cânula na região dorsal, próxima à carapaça. C) Visão geral após enrolar fios e cânula em torno do material flutuante a fim de evitar que o animal se embarace na preparação durante o período de recuperação.

3.3 Descrição do Sistema de Respirometria de Natação

Após a cirurgia, os peixes foram transferidos para o respirômetro de natação (semelhante ao Swim-32, Loligo Systems, Dinamarca) para recuperação da cirurgia e aclimação ao aparelho a uma velocidade de 10 cm.s^{-1} por 24 h. Tal velocidade foi estipulada a fim de adaptar o peixe a um fluxo contínuo de água, minimizando um possível estresse quando o experimento iniciasse, similar ao protocolo realizado por McKENZIE et al. (2012). Após este período, os fios foram desenrolados e ligados no sistema de aquisição de dados e a cânula conectada a uma seringa, pela qual, posteriormente, foram injetadas as drogas.

O sistema de respirometria de natação possui uma câmara acoplada a um túnel de natação (câmara experimental $15 \times 15 \times 45 \text{ cm}$), com um volume total de 31,45 L. Esta câmara experimental foi submergida horizontalmente dentro de um tanque experimental maior com água normóxica ($\sim 100 \text{ L}$ a $PO_2 \sim 140 \text{ mmHg}$) e temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por um termostato.

Além disso, esta câmara possui um tubo de entrada e saída de água que foi utilizado para renovação da mesma por meio de bombeamento automatizado, possibilitando que durante todo o experimento a câmara experimental permanecesse em condições normóxicas. Posicionada na entrada do respirômetro, uma estrutura alveolada (Plascore®, 6 mm de diâmetro celular) mantém um fluxo laminar e uma velocidade uniforme da água. Adicionalmente, a tampa do respirômetro possui uma elevação, permitindo a formação de uma coluna de ar entre a tampa e a lâmina de água para a realização de respiração aérea (Figura 9).

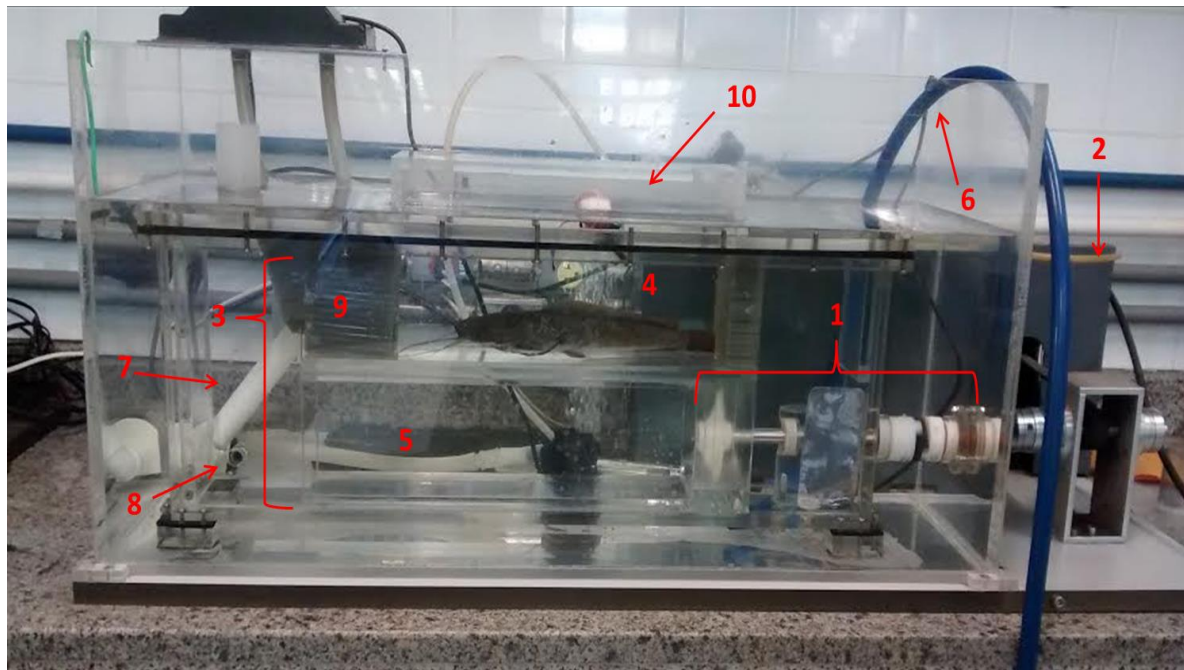


Figura 9. Sistema de respirometria com rotor (1) e motor de velocidade controlada (2): composto por um tanque com uma câmara experimental (3), formada por um respirômetro (4) acoplado a um túnel de natação (5). O sistema possui entrada (6) e saída (7) principais de água, bem como uma entrada de água bombeada do tanque para a câmara experimental (8), mantida com fluxo e velocidade constante por uma estrutura alveolar (9). Por fim, uma coluna de ar na tampa da câmara (10) permite a realização da respiração aérea pelo animal experimental.

3.4 Protocolo Experimental

Após o período de recuperação da cirurgia e aclimação, os dois eletrodos de ECG foram conectados a um amplificador (Animal Bio Amp–ADInstruments) de um sistema de aquisição de dados (Power lab-ADInstruments). Este sistema, por sua vez, foi ligado a um computador e, por meio do programa Lab Chart 7, o monitoramento de ECG foi realizado ao longo de todos os experimentos. A cânula implantada na região intraperitoneal foi conectada a uma seringa. Os peixes permaneceram na velocidade de 15 cm.s^{-1} até que o registro da frequência cardíaca se estabilizasse, por cerca de 1 h. Posteriormente, seguiu-se uma das metodologias abaixo descritas (Grupo 1 e Grupo 2), conforme a divisão dos animais nos dois grupos estabelecidos.

3.4.1 Bloqueio da atividade autonômica ($n = 4$; $133 \pm 8 \text{ g EPM}$)

A fim de se certificar que as concentrações utilizadas de Atropina e Propranolol nos experimentos estavam de fato bloqueando, respectivamente, os receptores colinérgicos e adrenérgicos presentes no coração de *C. gariepinus*, efetuaram-se experimentos prévios.

Foram injetadas soluções de acetilcolina (1 mL.Kg^{-1} de $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e adrenalina (1 mL.Kg^{-1} de $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) via cânula intraperitoneal 1 h após injeção dos respectivos antagonistas e observou-se possíveis alterações na f_H , protocolo similar ao realizado por McKENZIE et al. (2007).

3.4.2 Grupo 1 ($n = 9$; $126 \pm 6 \text{ g EPM}$)

Neste grupo, os peixes foram submetidos a três protocolos durante o experimento: (1) Controle; (2) Propranolol e (3) Duplo Bloqueio.

1) Protocolo Controle: os animais permaneceram na velocidade de natação de 15 cm.s^{-1} por aproximadamente 1 h ou o tempo necessário para ocorrer no mínimo dois eventos de respiração aérea. Após esse período, aumentou-se a velocidade de natação para 30 cm.s^{-1} , na qual os peixes permaneceram por 10 min. Por fim, aumentou-se a velocidade para 45 cm.s^{-1} , na qual permaneceram por 5 min. O tempo de permanência nas velocidades de 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} foi determinado em experimentos prévios, considerando-se o tempo mínimo necessário para que os animais realizassem duas respirações aéreas, sem prejudicar seu desempenho de natação, até que todos os protocolos fossem realizados.

Após o término do protocolo Controle retornou-se a velocidade para o valor inicial (15 cm.s^{-1}) e esperou-se tempo suficiente para que o parâmetro cardíaco fosse restaurado (em torno de 40 min).

2) Protocolo Propranolol: após restauração do parâmetro cardíaco, foi injetado Cloridrato de Propranolol 5 mg.kg^{-1} (Sigma-Aldrich – diluído em solução de 0,9% de NaCl a $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), através da cânula intraperitoneal, semelhante ao de McKENZIE et al. (2007). Em seguida, foi injetado 1 mL da solução salina (0,9%) para assegurar a completa administração do fármaco. Após aproximadamente 40 min da injeção da droga, iniciou-se o registro de dados e o peixe foi submetido novamente às mesmas três velocidades descritas anteriormente.

Após o término do protocolo Propranolol retornou-se a velocidade para o valor inicial (15 cm.s^{-1}) e esperou-se tempo suficiente para que o parâmetro cardíaco fosse restaurado a um valor próximo do obtido no início do protocolo.

3) Protocolo Duplo Bloqueio: após a restauração do parâmetro cardíaco, foi injetada, por meio da cânula intraperitoneal, uma solução contendo Sulfato de Atropina 4 mg.kg^{-1} (Sigma-Aldrich – diluído em solução de 0,9% de NaCl a 2 mg.mL^{-1}) e Cloridrato de Propranolol 2 mg.kg^{-1} (Sigma-Aldrich – diluído em solução de 0,9% de NaCl a 1 mg.mL^{-1}), ocasionando um bloqueio autonômico completo (duplo bloqueio) no coração do animal, semelhante ao de McKENZIE et al. (2007). As proporções foram utilizadas considerando o protocolo anteriormente realizado e a fim de certificar que os receptores β -adrenérgicos estariam bloqueados durante toda a avaliação. Em seguida a cânula foi “lavada” com 1 mL de solução salina para assegurar a completa administração das drogas. Após aproximadamente quarenta minutos da injeção das drogas, iniciou-se o registro de dados e o peixe foi submetido às mesmas velocidades descritas anteriormente.

3.4.3 Grupo 2 (n = 9; $137 \pm 8 \text{ g EPM}$)

Neste grupo, os peixes foram submetidos a três protocolos experimentais durante o experimento: (1) Controle; (2) Atropina e (3) Duplo Bloqueio.

1) Protocolo Controle: o protocolo controle foi executado conforme descrito no item 3.4.2.

Após o término deste protocolo retornou-se a velocidade para o valor inicial (15 cm.s^{-1}) e esperou-se tempo suficiente para que o parâmetro cardíaco fosse restaurado (em torno de 40 minutos).

2) Protocolo Atropina: decorrido o tempo necessário para a restauração do parâmetro cardíaco, foi injetado, por meio da cânula intraperitoneal, Sulfato de Atropina 5 mg.kg^{-1} (Sigma-Aldrich – diluído em solução de 0,9% de NaCl a $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$). Em seguida, a cânula foi “lavada” com 1 mL de solução salina para assegurar a completa administração do fármaco. Após aproximadamente 40 min da injeção da droga, iniciou-se o registro de dados e o peixe foi submetido às mesmas três velocidades descritas no item 3.4.2.

Após o término do protocolo Atropina, retornou-se a velocidade para o valor inicial (15 cm.s^{-1}) e esperou-se tempo suficiente para que os parâmetro cardíaco fosse restaurado a um valor próximo do obtido no início do protocolo.

3) Protocolo Duplo Bloqueio: após restauração do parâmetro cardíaco foi injetada, por meio da cânula intraperitoneal, uma solução contendo uma mistura de Cloridrato de Propranolol 4 mg.kg^{-1} (Sigma-Aldrich – diluído em solução de 0,9% de NaCl a 2 mg.mL^{-1}) e Sulfato de Atropina 2 mg.kg^{-1} (Sigma-Aldrich – diluído em solução de 0,9% de NaCl a 1 mg.mL^{-1}), ocasionando um bloqueio autonômico completo (duplo bloqueio) no coração do animal. As proporções foram utilizadas considerando o protocolo anteriormente realizado e para se certificar que os receptores muscarínicos colinérgicos estariam bloqueados durante toda a avaliação. Em seguida a cânula foi “lavada” com 1 mL de solução de salina para assegurar a completa administração das drogas.

Após aproximadamente 40 min da injeção das drogas, iniciou-se o registro e o peixe foi submetido às mesmas velocidades descritas anteriormente.

A inversão na ordem de aplicação das drogas, característica que diferenciou os grupos avaliados (Grupo 1 e Grupo 2), foi realizada para avaliar possíveis interações entre os tônus adrenérgico e colinérgico. Neste caso, após o bloqueio utilizando o antagonista adrenérgico, uma “resposta compensatória” do ramo parassimpático será observada, com o intuito de amenizar o efeito da redução da influência adrenérgica no coração (ALTIMIRAS, 1997).

3.5 Parâmetros Avaliados

3.5.1 Frequência de Respiração Aérea (f_{RA})

A f_{RA} foi calculada para cada velocidade e condição experimental baseando-se nos dados obtidos no ABI (Intervalo entre respiração aérea), multiplicados por 3600, para obtenção dos resultados por hora. Médias foram obtidas com os valores de cada peixe em cada condição experimental.

3.5.2 Frequência Cardíaca (f_H)

Os valores de f_H foram obtidos pela contagem dos intervalos R-R do ECG. Tal análise permitiu a aquisição do tempo interbatimentos e esses dados foram convertidos em bpm (batimentos por minuto). Foram calculadas a frequência cardíaca Routine (f_H Routine, medida no intervalo de tempo entre duas respirações aéreas) e as frequências cardíacas encontradas imediatamente antes de uma respiração aérea (f_H Pré-RA) e imediatamente após uma respiração aérea (f_H Pós-RA), utilizando-se o tempo necessário para ocorrer dez intervalos R-R. A Figura 10 apresenta um trecho de ECG de bagre em normóxia a uma velocidade de 15 cm.s⁻¹ no respirômetro de natação.

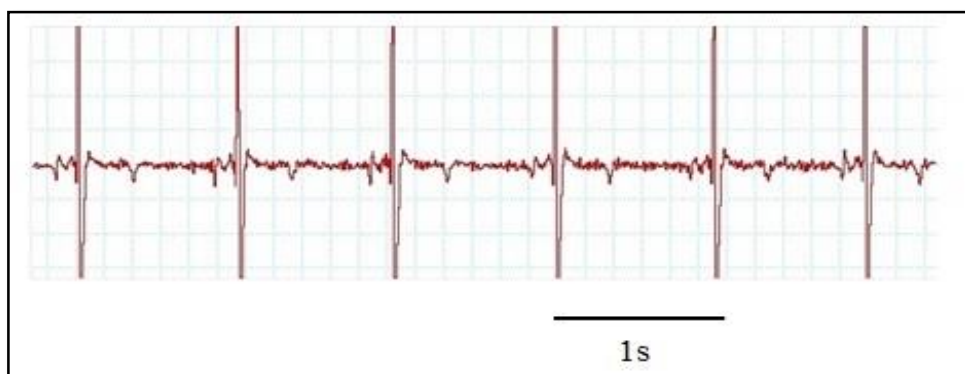


Figura 10: Registro de eletrocardiograma (ECG) de um bagre africano, *C. gariepinus*, em normóxia, a uma velocidade de natação de 15 cm.s⁻¹.

3.5.3 Cálculo da atividade dos tônus Colinérgico e Adrenérgico

As ações dos tônus colinérgico e adrenérgico no coração medidas na f_H Pré-RA, f_H Pós-RA e Routine (Chol - % e Adr - %, respectivamente) foram calculadas para cada indivíduo, baseado no tempo necessário para que ocorressem 10 intervalos R-R ($1/f_H$), conforme descrito por ALTIMIRAS (1997). Assim, tem-se:

a. Para o Grupo 1:

$$\text{Chol (\%)} = \frac{(\text{R-R})_{\beta} - (\text{R-R})_0}{(\text{R-R})_0} * 100$$

$$\text{Adr (\%)} = \frac{(\text{R-R})_{\beta} - (\text{R-R})_{\text{cont.}}}{(\text{R-R})_0} * 100$$

b. Para o Grupo 2:

$$\text{Chol (\%)} = \frac{(\text{R-R})_{\text{cont.}} - (\text{R-R})_{\text{musc}}}{(\text{R-R})_0} * 100$$

$$\text{Adr (\%)} = \frac{(\text{R-R})_0 - (\text{R-R})_{\text{musc}}}{(\text{R-R})_0} * 100$$

Onde:

Chol (%): Porcentagem do tônus Colinérgico;

Adr (%): Porcentagem do tônus Adrenérgico;

$(\text{R-R})_{\beta}$: Intervalo R-R depois de bloqueado os receptores β adrenérgicos;

$(\text{R-R})_0$: Intervalo R-R após completo bloqueio autonômico;

$(\text{R-R})_{\text{cont.}}$: Intervalo R-R Controle;

$(\text{R-R})_{\text{musc}}$: Intervalo R-R depois de bloqueado os receptores muscarínicos.

3.6 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM e foram consideradas significativas diferenças com valores de $P \leq 0,05$. Na descrição dos efeitos dos protocolos Propranolol e Atropina, os resultados obtidos foram comparados com os protocolos Controle e Duplo Bloqueio ($n = 9$ cada) realizados especificamente para cada grupo. Após verificação da distribuição normal dos dados (teste Shapiro-Wilk), a influência dos tratamentos nas respostas de respiração aérea, frequências cardíacas e ação dos tônus foram analisadas por meio de uma série de análises de variância de medidas repetidas com dois fatores (“two-way” ANOVA para medidas repetidas). Para todos os parâmetros analisados, ‘Data for Subject’ correspondeu ao Indivíduo avaliado, ‘Factor A’ foi a Velocidade de natação, ‘Factor B’ correspondeu ao Tratamento (Controle, Atropina, Propranolol e Duplo Bloqueio) e o ‘Data for Data’ foi o Parâmetro a ser analisado (por exemplo, ABI, f_{AB} , f_H e ação do tônus). A “two-way” ANOVA foi complementada pelo teste de comparação múltipla de Holm-Sidak, utilizado para testar as significâncias das diferenças e relações entre os dados. Todas as análises foram realizadas por meio do software Sigma Plot versão 13.0 (Systat Software Inc., Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1. Efeitos do Exercício e Administração dos fármacos no padrão de Respiração Aérea (f_{RA})

Os resultados observados na avaliação da f_{RA} estão descritos na Tabela I.

Tabela I: Frequência de Respiração Aérea (f_{RA} : resp.h⁻¹), avaliada em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA).

		Velocidade de natação (cm.s ⁻¹)		
		15	30	45
GRUPO 1	Controle I	4,9 $\pm$ 0,9 ^a	31,6 $\pm$ 3,8 ^b	34,1 $\pm$ 3,3 ^b
	Propranolol	7,4 $\pm$ 1,5 ^a	51,8 $\pm$ 7,2 ^{b*}	68,4 $\pm$ 7,9 ^{c*}
	Duplo Bloqueio I	5,7 $\pm$ 2,1 ^a	43,1 $\pm$ 22,2 ^b	65,5 $\pm$ 6,0 ^{c*}
GRUPO 2	Controle II	4,5 $\pm$ 0,8 ^a	35,9 $\pm$ 6,3 ^b	67,6 $\pm$ 8,0 ^c
	Atropina	4,1 $\pm$ 1,2 ^a	29,6 $\pm$ 3,5 ^b	75,6 $\pm$ 11,6 ^{c†}
	Duplo Bloqueio II	5,7 $\pm$ 0,8 ^a	39,1 $\pm$ 6,0 ^b	54,9 $\pm$ 4,2 ^c

Em relação à Frequência de Respiração Aérea (f_{RA}), os peixes do Controle I apresentaram um aumento significativo nos valores de f_{RA} somente entre as velocidades 15 x 30 cm.s⁻¹, correspondendo a cerca de 545% ($P < 0,05$). Não foi observada diferença significativa nos valores obtidos entre as velocidades 30 x 45 cm.s⁻¹ (Tabela I e Figura 11A). Já o Controle II apresentou diferenças significativas entre todas as velocidades de natação. Assim, os aumentos observados entre as velocidades 15 x 30 cm.s⁻¹ e 30 x 45 cm.s⁻¹ foram de, respectivamente, cerca de 693% e 87% ($P < 0,05$) (Tabela I e Figura 11B).

Ao analisar a f_{RA} após a injeção de propranolol nas três diferentes velocidades utilizadas no protocolo, observaram-se aumentos significativos conforme se aumentou a velocidade de natação. Entre as velocidades de 15 x 30 cm.s⁻¹ foi observado um aumento significativo na frequência de respiração aérea de 600% ($P < 0,05$), enquanto a troca de 30 cm.s⁻¹ para 45 cm.s⁻¹ promoveu um aumento de 32% ($P < 0,05$) (Tabela I e Figura 11C). Quando comparados ao Controle I, os peixes do protocolo Propranolol apresentaram diferenças significativas nas velocidades de 30 cm.s⁻¹ e 45 cm.s⁻¹, com aumentos de aproximadamente 64% e 101% ($P < 0,05$), respectivamente (Tabela I e Figuras 11A e C).

No protocolo Atropina observou-se que o aumento da velocidade de natação promoveu um consequente aumento na frequência com a qual o peixe sobe à superfície para realizar respiração aérea. Ao aumentar de 15 cm.s⁻¹ para 30 cm.s⁻¹ houve uma intensificação de aproximadamente 86% ($P < 0,05$) na frequência observada, enquanto entre 30 x 45 cm.s⁻¹ ocorreu um aumento de 61% ($P < 0,05$) (Tabela I e Figura 11D). Diferenças significativas não foram observadas ao comparar os resultados obtidos neste protocolo com os observados nas mesmas velocidades do Controle II (Tabela I e Figuras 11B e D).

Os valores obtidos na avaliação dos Duplos Bloqueios I e II mostraram uma relação positiva entre o aumento da velocidade de natação e a frequência com a qual o peixe sobe à superfície para realizar respiração aérea. Dessa forma, entre 15 x 30 cm.s⁻¹ e entre 30 x 45 cm.s⁻¹ os aumentos nas frequências foram de, respectivamente, 661% e 51% ($P < 0,050$) para o Duplo Bloqueio I e de 585% e 40% ($P < 0,050$) para o Duplo Bloqueio II (Tabela I e Figuras 11E e F).

Ao comparar os dados de f_{RA} obtidos no Controle I com os dados obtidos no Duplo Bloqueio I, observou-se um aumento significativo na velocidade de 45 cm.s⁻¹, correspondendo a cerca de 92% ($P < 0,05$) (Tabela I e Figuras 11A e E). As f_{RA} observadas no Duplo Bloqueio I não diferiram dos resultados obtidos no protocolo Propranolol (Tabela I e Figuras 11C e E).

Em relação ao Controle II, não foram observadas diferenças significativas na f_{RA} ao comparar com os valores encontrados no Duplo Bloqueio II (Tabela I e Figuras 11B e F). Ao comparar o protocolo Atropina com o Duplo Bloqueio II, notou-se diferença significativa nos valores de f_{RA} somente na velocidade de 45 cm.s⁻¹, correspondendo a uma redução de 31% ($P < 0,05$) (Tabela I e Figuras 11D e F).

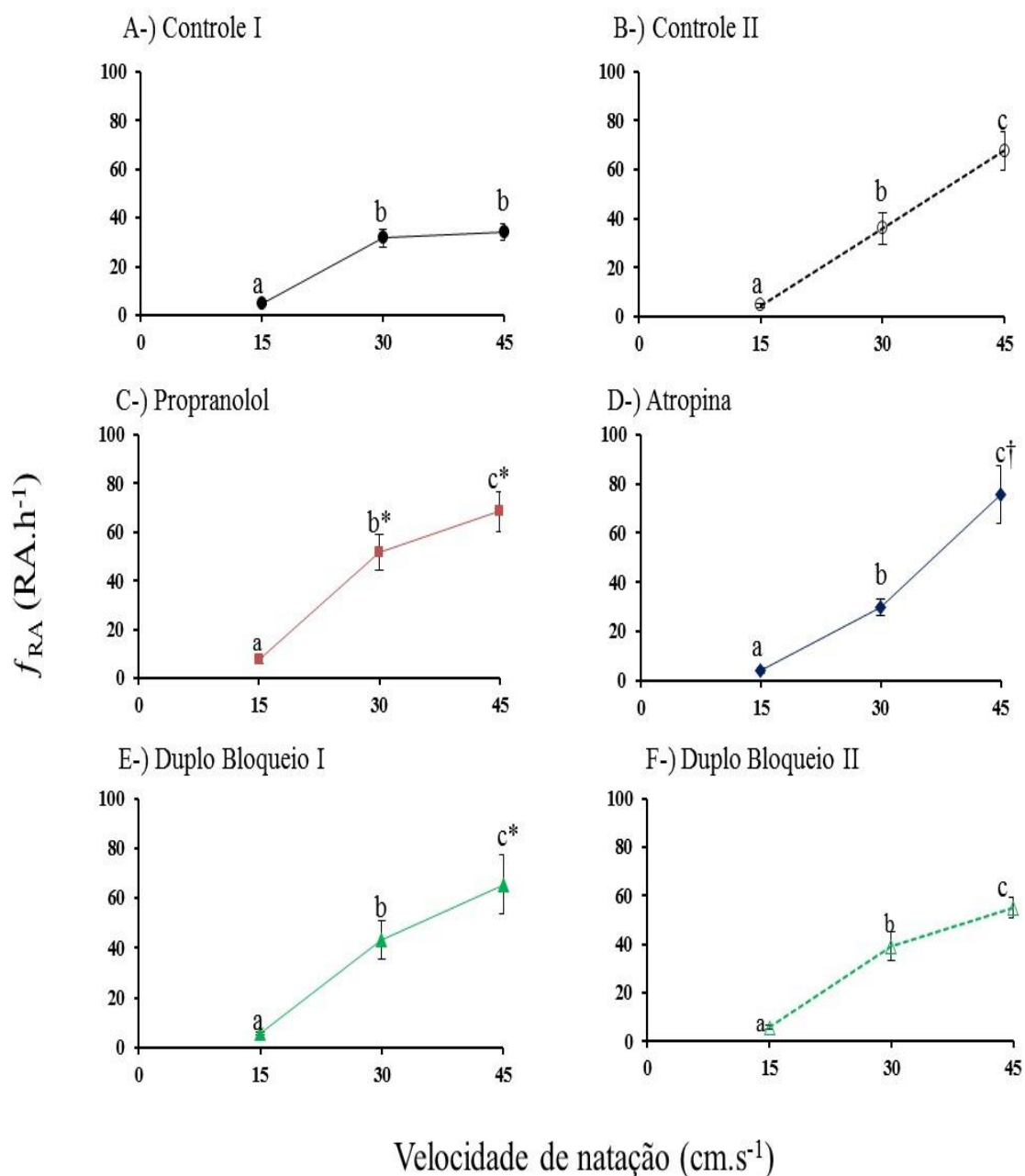


Figura 11: Avaliação da Frequência de Respiração Aérea (f_{RA} .h⁻¹) em *C. gariepinus* sob diferentes velocidades de natação. A: Controle I; B: Controle II; C: Após injeção de Propranolol; D: Após injeção de Atropina; E: Duplo Bloqueio I; F: Duplo Bloqueio II. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; n = 9 ($P \leq 0,05$).

4.2. Efeitos do Exercício e Administração dos fármacos na Atividade Cardíaca

4.2.1 Frequência Cardíaca Routine (f_H Routine)

Os resultados observados na avaliação da f_H Routine estão descritos na Tabela II.

Tabela II: Frequência Cardíaca Routine (f_H Routine: bpm), avaliada em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA).

		Velocidade de natação (cm.s ⁻¹)		
		15	30	45
GRUPO 1	Controle I	53 $\pm$ 3 ^a	72 $\pm$ 4 ^b	87 $\pm$ 6 ^c
	Propranolol	49 $\pm$ 4 ^{a†}	67 $\pm$ 4 ^{b†}	80 $\pm$ 3 ^{c†}
	Duplo Bloqueio I	95 $\pm$ 5 ^{a*}	99 $\pm$ 5 ^{a*}	102 $\pm$ 5 ^{a*}
GRUPO 2	Controle II	66 $\pm$ 2 ^a	93 $\pm$ 4 ^b	113 $\pm$ 4 ^c
	Atropina	122 $\pm$ 4 ^{a*†}	122 $\pm$ 3 ^{a*†}	121 $\pm$ 3 ^{a†}
	Duplo Bloqueio II	100 $\pm$ 5 ^{a*}	101 $\pm$ 7 ^{a*}	102 $\pm$ 7 ^{a*}

Em relação à f_H Routine, nos Controles I e II foram observados aumentos significativos com as mudanças na velocidade de natação. Assim, entre as velocidades de 15 x 30 cm.s⁻¹ e 30 x 45 cm.s⁻¹ os aumentos corresponderam a, respectivamente, 37% e 21% ($P < 0,05$) para o Controle I (Tabela II e Figura 12A) e a 40% e 21% ($P < 0,05$) para o Controle II (Tabela II e Figura 12B).

O protocolo Propranolol apresentou respostas similares ao Controle I, com aumentos significativos de 35% e 20% ($P < 0,05$) entre as velocidades 15 x 30 cm.s⁻¹ e 30 x 45 cm.s⁻¹, respectivamente (Tabela II e Figura 12C). Em comparação ao Controle I, não foram observadas modificações significativas na f_H Routine após injeção de propranolol (Tabela II e Figuras 12A e C).

Após a injeção de atropina observou-se que a f_H Routine não diferiu significativamente ao longo do protocolo (Tabela II e Figura 12D), porém, quando comparado ao Controle II, o protocolo Atropina apresentou diferenças significativas na f_H Routine em uma mesma velocidade, com aumentos de 84% e 31% ($P < 0,05$) nas velocidades de 15 cm.s⁻¹ e 30 cm.s⁻¹, respectivamente. Diferenças significativas não foram observadas em 45 cm.s⁻¹ (Tabela II e Figuras 12B e D).

Assim como observado no protocolo Atropina, verificou-se que após o duplo bloqueio, em ambos os grupos, a f_H Routine não diferiu significativamente ao longo do protocolo (Tabela II e Figuras 12E e F).

Ao comparar o Controle I com o Duplo Bloqueio I observaram-se diferenças significativas em uma mesma velocidade. Assim, aumentos significativos de 81%, 37% e 17% ($P < 0,05$) foram observados, respectivamente, nas velocidades de 15 cm.s^{-1} , 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} (Tabela II e Figuras 12A e E). O mesmo ocorreu na comparação entre o protocolo Propranolol e o Duplo Bloqueio I, com aumentos de, respectivamente, 94%, 49% e 27% ($P < 0,05$) para as velocidades de 15 cm.s^{-1} , 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} (Tabela II e Figuras 12C e E).

Entre os resultados obtidos no Controle II e no Duplo Bloqueio II, foram encontradas respostas diferentes ao observado no Grupo I, com aumentos significativos somente nas velocidades de 15 cm.s^{-1} e 30 cm.s^{-1} correspondentes a 51% e 8% ($P < 0,05$), enquanto para a velocidade de 45 cm.s^{-1} foi observada uma redução de 9% ($P < 0,05$) (Tabela II e Figuras 12B e F).

Apesar de apresentar uma constância na f_H Routine nas três diferentes velocidades assim como observado no protocolo Atropina, os valores do Dublo Bloqueio II obtidos em cada velocidade de natação variaram significativamente após a injeção do fármaco. Assim, foram encontradas reduções de cerca de 17%, 16% e 15% ($P < 0,05$) para as velocidades de 15 cm.s^{-1} , 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} , respectivamente (Tabela II e Figuras 12D e F).

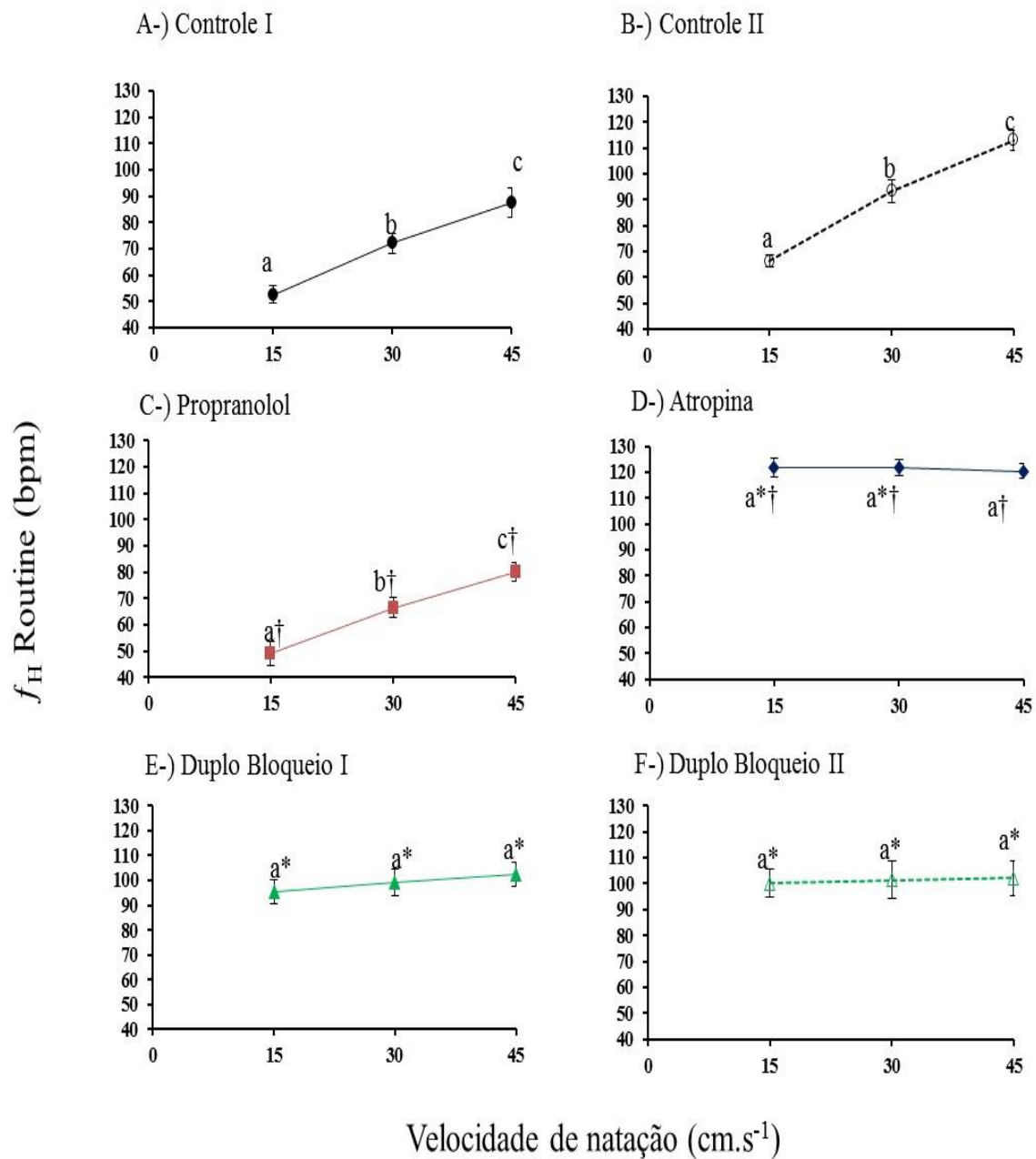


Figura 12: Avaliação da Frequência Cardíaca Routine (f_H Routine) em *C.gariepinus* sob diferentes velocidades de natação. A: Controle I; B: Controle II; C: Após injeção de Propranolol; D: Após injeção de Atropina; E: Duplo Bloqueio I; F: Duplo Bloqueio II. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as velocidades dentro de cada grupo; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; $n = 9$ ($P \leq 0,05$).

4.2.2. Frequência Cardíaca Pré Respiração Aérea (f_H Pré-RA) e Frequência Cardíaca Pós Respiração Aérea (f_H Pós-RA)

Os resultados observados na avaliação das f_H Pré-RA e f_H Pós-RA estão descritos na Tabela III.

Tabela III: Frequência Cardíaca Pré e Pós Respiração Aérea (f_H Pré-RA/ f_H Pós-RA: bpm), avaliadas em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Números diferentes indicam diferenças significativas entre f_H Pré RA e f_H Pós RA em um mesmo grupo e velocidade; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a f_H Pré RA de um mesmo grupo em velocidades diferentes e entre a f_H Pós RA de um mesmo grupo em velocidade diferentes; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA).

		Velocidade de natação (cm.s ⁻¹)					
		15		30		45	
		f_H Pré-RA	f_H Pós-RA	f_H Pré-RA	f_H Pós-RA	f_H Pré-RA	f_H Pós-RA
GRUPO 1	Controle I	54 $\pm$ 2 ^{1a}	78 $\pm$ 3 ^{2a}	72 $\pm$ 4 ^{1b}	91 $\pm$ 3 ^{2b}	86 $\pm$ 3 ^{1c}	97 $\pm$ 3 ^{2b}
	Propranolol	47 $\pm$ 3 ^{1a†}	74 $\pm$ 3 ^{2a†}	62 $\pm$ 4 ^{1b†}	78 $\pm$ 3 ^{2a*†}	77 $\pm$ 3 ^{1c†}	87 $\pm$ 3 ^{2b†}
	Duplo Bloqueio I	95 $\pm$ 4 ^{1a*}	97 $\pm$ 4 ^{1a*}	99 $\pm$ 5 ^{1a*}	99 $\pm$ 5 ^{1a}	102 $\pm$ 5 ^{1a*}	101 $\pm$ 5 ^{1a}
GRUPO 2	Controle II	65 $\pm$ 1 ^{1a}	104 $\pm$ 2 ^{2a}	90 $\pm$ 3 ^{1b}	109 $\pm$ 3 ^{2a}	109 $\pm$ 4 ^{1c}	118 $\pm$ 3 ^{2b}
	Atropina	123 $\pm$ 3 ^{1a*†}	123 $\pm$ 3 ^{1a*†}	123 $\pm$ 3 ^{1a*†}	122 $\pm$ 3 ^{1a*†}	123 $\pm$ 3 ^{1a*†}	123 $\pm$ 3 ^{1a†}
	Duplo Bloqueio II	98 $\pm$ 5 ^{1a*}	99 $\pm$ 5 ^{1a}	100 $\pm$ 7 ^{1a*}	101 $\pm$ 7 ^{1a}	103 $\pm$ 7 ^{1a}	102 $\pm$ 6 ^{1a*}

Os peixes do Controle I apresentaram um aumento significativo na f_H Pré-RA e na f_H Pós-RA dentro de uma mesma velocidade. Comparando as f_H Pré-RA com as f_H Pós-RA, foram observados aumentos significativos de 45%, 26% e 13% ($P < 0,05$), respectivamente às velocidades de 15 cm.s⁻¹, 30 cm.s⁻¹ e 45 cm.s⁻¹ (Tabela III e Figura 13A). Adicionalmente, nas mudanças entre 15 x 30 cm.s⁻¹ e 30 x 45 cm.s⁻¹ foram observados aumentos significativos de, respectivamente, 33% e 20% ($P < 0,05$) na f_H Pré-RA e de 16% e 7% ($P < 0,05$) na f_H Pós-RA (Tabela III e Figura 13A).

As mesmas respostas foram obtidas nos peixes Controle II. Assim, comparando as f_H Pré-RA com a f_H Pós-RA, observou-se que, nas velocidades de 15 cm.s⁻¹, 30 cm.s⁻¹ e 45 cm.s⁻¹ ocorreram aumentos significativos de, respectivamente, 60%, 20% e 8% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figura 13B). Adicionalmente, nas mudanças entre 15 x 30 cm.s⁻¹ e 30 x 45 cm.s⁻¹ foram observados aumentos significativos de, respectivamente, 38% e 21% ($P < 0,05$) na f_H Pré-RA. Para a f_H Pós-RA, foi observada uma diferença somente na mudança entre 30 x 45 cm.s⁻¹, equivalente a 8% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figura 13B).

Ao analisar o protocolo Propranolol observaram-se diferenças entre as f_H Pré-RA e f_H Pós-RA, dentro de uma mesma velocidade. Assim, aumentos de 58%, 25 % e 14% ($P < 0,05$) foram encontrados para as velocidades de 15 cm.s^{-1} , 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} , respectivamente. Aumentos significativos nas f_H Pré-RA e nas f_H Pós-RA também foram observados na comparação entre as três diferentes velocidades de natação. Ao aumentar a velocidade de 15 cm.s^{-1} para 30 cm.s^{-1} pode-se observar que a f_H Pré-RA teve um aumento de 32% ($P < 0,05$), fato não observado para a f_H Pós-RA. Já na passagem de 30 cm.s^{-1} para 45 cm.s^{-1} a f_H Pré-RA teve um aumento de 23% ($P < 0,05$), enquanto a f_H Pós-RA teve um aumento o de 12% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figura 13C). Quando comparado ao Controle I, a única diferença encontrada foi na f_H Pós-RA na velocidade de 30 cm.s^{-1} , onde se constatou uma redução de aproximadamente 15% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figuras 13A e C).

Após a injeção de atropina foi observado que as f_H Pré-RA e f_H Pós-RA em uma dada velocidade não diferiram significativamente. Adicionalmente, foi constatada uma mesma f_H Pré-RA e Pós-RA nas três velocidades de natação (valor próximo a 120 bpm) (Tabela III e Figura 13D). Diferenças significativas foram observadas em quase todas as f_H avaliadas quando comparadas, para uma mesma velocidade, com os valores obtidos no protocolo Controle II (Tabela III e Figuras 13B e D). Assim, na avaliação da f_H Pré-RA, foram observados aumentos de 90%, 37% e 12% ($P < 0,05$), respectivamente, para as velocidades de 15 cm.s^{-1} , 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} . Já a f_H Pós-RA apresentou diferenças significativas após injeção de atropina somente nas velocidades de 15 cm.s^{-1} e 30 cm.s^{-1} , com aumentos de, respectivamente, 18% e 13% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figuras 13B e D).

Após o duplo bloqueio observou-se que as f_H Pré-RA e f_H Pós-RA em uma dada velocidade não diferiram significativamente e também não se observou diferenças nas f_H Pré-RA entre velocidades diferentes, bem como para as f_H Pós RA, tanto para o Grupo I quanto para o Grupo II (Tabela III e Figuras 13E e F).

Ao comparar com os dados obtidos no protocolo Controle I, foram encontradas diferenças significativas nas f_H Pré-RA em todas as velocidades, ao passo que a f_H Pós-RA no protocolo Duplo Bloqueio I só diferiu na velocidade 15 cm.s^{-1} (Tabela III e Figuras 13A e E). Dessa forma, após realização do Duplo Bloqueio I, foram observados aumentos significativos nas f_H Pré-RA correspondentes a 76%, 37% e 17% ($P < 0,05$), respectivamente, para 15 cm.s^{-1} , 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} . Na avaliação das f_H Pós-RA, foi encontrada diferença apenas na velocidade de 15 cm.s^{-1} , correspondendo a um aumento de 23% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figuras 13A e E).

Na comparação entre as f_H Pré-RA dos protocolos Propranolol e Duplo Bloqueio I, observou-se um aumento de 101%, 59% e 33% ($P < 0,05$), para as velocidades de 15 cm.s^{-1} , 30 cm.s^{-1} e 45 cm.s^{-1} , respectivamente. Já para a f_H Pós-RA os aumentos encontrados foram, respectivamente, de 30%, 27% e 16% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figuras 13C e E).

Ao comparar os dados obtidos no Duplo Bloqueio II com o Controle II foram observadas diferenças na f_H Pré-RA nas duas velocidades iniciais de natação, ao passo que a f_H Pós-RA no grupo Duplo Bloqueio II só diferiu das obtidas na avaliação do Controle II na velocidade 45 cm.s⁻¹. Dessa forma, após realização do Duplo Bloqueio II, foram observados aumentos nas f_H Pré-RA correspondente a 51% e 11% ($P < 0,05$), respectivamente, para 15 cm.s⁻¹ e 30 cm.s⁻¹. Na avaliação das f_H Pós-RA, a diferença observada na velocidade de 45 cm.s⁻¹ correspondeu a uma redução de 23% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figuras 13B e F).

Uma correlação inversa foi observada na comparação entre os dados obtidos no protocolo Atropina e no protocolo Duplo Bloqueio II, onde ocorreu uma redução nos valores das f_H Pré-RA e f_H Pós-RA para uma mesma velocidade. Assim, após a realização do duplo bloqueio, a f_H Pré-RA diminuiu 20%, 18% e 16% ($P < 0,05$), respectivamente, nas velocidades de 15 cm.s⁻¹, 30 cm.s⁻¹ e 45 cm.s⁻¹. O mesmo ocorreu para a f_H Pós-RA, com reduções de, respectivamente, 19%, 17% e 16% ($P < 0,05$) (Tabela III e Figuras 13D e F).

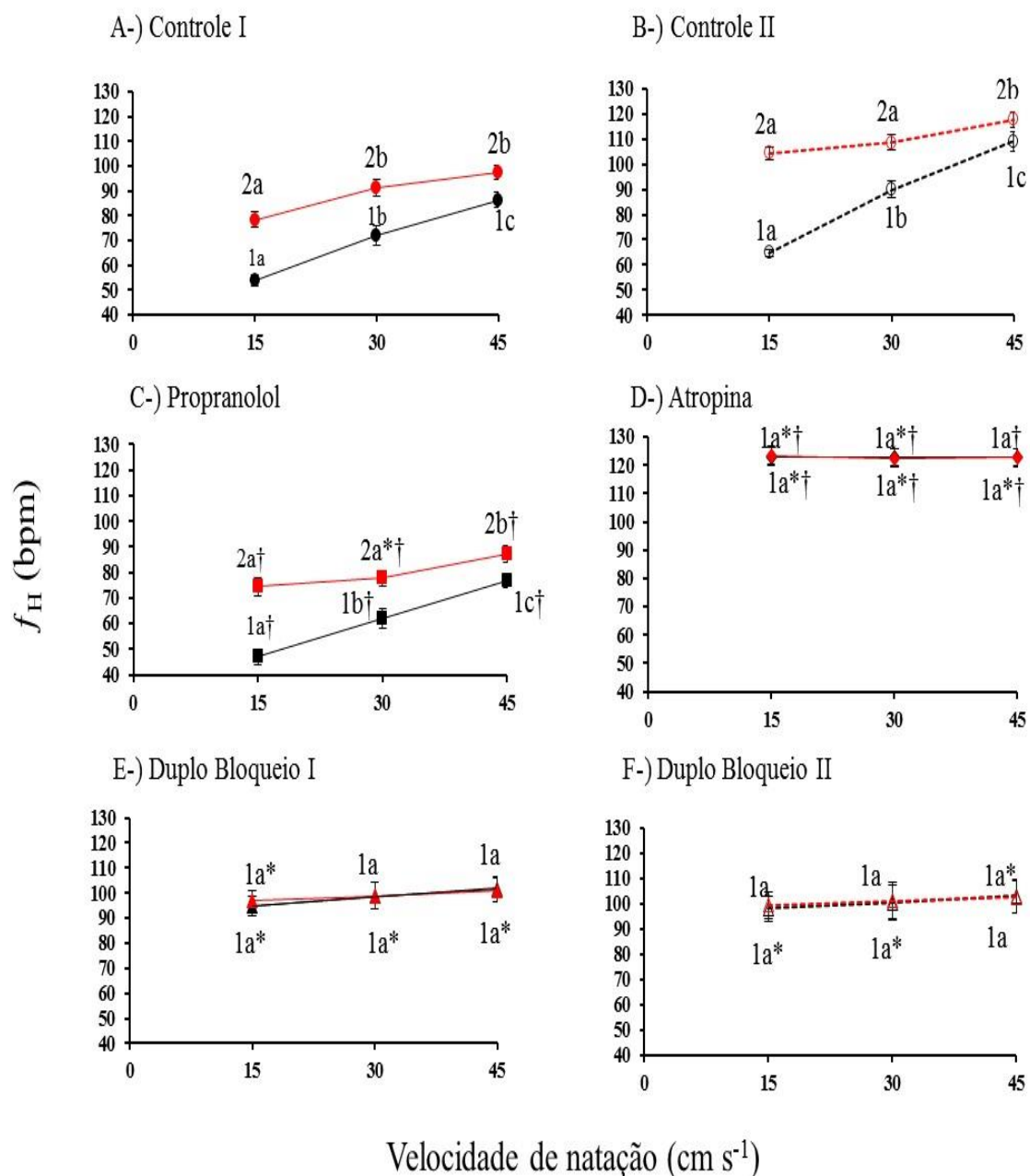


Figura 13: Avaliação da Frequência Cardíaca Pré Respiração Aérea (f_H Pré-RA - Linhas Pretas) e Frequência Cardíaca Pós Respiração Aérea (f_H Pós-RA - Linhas Vermelhas) em *C. gariepinus* sob diferentes velocidades de natação. A: Controle I; B: Controle II; C: Após injeção de Propranolol; D: Após injeção de Atropina; E: Duplo Bloqueio I; F: Duplo Bloqueio II. Números diferentes indicam diferenças significativas entre f_H Pré RA e f_H Pós RA em um mesmo grupo e velocidade; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a f_H Pré RA de um mesmo grupo em velocidades diferentes e entre a f_H Pós RA de um mesmo grupo em velocidade diferentes; (*) indica diferença significativa em relação ao Controle de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro; (†): indica diferença significativa em relação ao Duplo Bloqueio de seu respectivo grupo dentro de uma mesma velocidade para o mesmo parâmetro. Valores são médias $\pm$ EPM; $n = 9$ ($P \leq 0,05$).

4.3 Efeitos do Exercício no Tônus

Os efeitos do exercício na modulação das atividades dos tônus adrenérgico e colinérgico no período Routine, Pré-RA e Pós-RA estão expostos na Tabela IV.

Tabela IV: Porcentagem de ação dos tônus Adrenérgico e Colinérgico nos períodos Routine, Pré Respiração Aérea e Pós Respiração Aérea, avaliadas em *C. gariepinus* submetido a diferentes velocidades de natação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de um mesmo tônus no período Routine nas diferentes velocidades. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro de um mesmo parâmetro nas diferentes velocidades. (*) indica diferença significativa entre a atividade Pré-Respiração Aérea e Pós-Respiração Aérea de um tônus em uma mesma velocidade. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9$; Two-way ANOVA).

		Velocidade (cm.s ⁻¹)		
		15	30	45
GRUPO 1	Tônus Adrenérgico			
	Routine	23 $\pm$ 23	12 $\pm$ 8	7 $\pm$ 5
	Pré-RA	28 $\pm$ 14	22 $\pm$ 7	14 $\pm$ 3
	Pós-RA	5 $\pm$ 9	17 $\pm$ 4	13 $\pm$ 3
	Tônus Colinérgico			
	Routine	112 $\pm$ 29 ^A	55 $\pm$ 16 ^B	29 $\pm$ 9 ^C
GRUPO 2	Pré-RA	109 $\pm$ 16 ^a	65 $\pm$ 17 ^b	34 $\pm$ 9 ^c
	Pós-RA	31 $\pm$ 5 [*]	27 $\pm$ 4 [*]	17 $\pm$ 5
	Tônus Adrenérgico			
	Routine	18 $\pm$ 3	17 $\pm$ 5	16 $\pm$ 4
	Pré-RA	20 $\pm$ 3	19 $\pm$ 4	17 $\pm$ 4
	Pós-RA	20 $\pm$ 3	14 $\pm$ 5	17 $\pm$ 4
	Tônus Colinérgico			
	Routine	69 $\pm$ 4 ^A	26 $\pm$ 5 ^B	6 $\pm$ 2 ^C
	Pré-RA	72 $\pm$ 5 ^a	30 $\pm$ 4 ^b	10 $\pm$ 2 ^c
	Pós-RA	15 $\pm$ 2 [*]	10 $\pm$ 1 [*]	4 $\pm$ 1

Após a execução do protocolo Propranolol e do protocolo Duplo Bloqueio (Grupo 1), foi possível quantificar a porcentagem de ação dos tônus adrenérgico e colinérgico em cada velocidade, no período Routine e também Pré-RA e Pós-RA.

Em relação ao tônus adrenérgico no período Routine, não foram encontradas diferenças significativas ao comparar as três velocidades. Já no tônus colinérgico no período Routine, ao comparar sua ação entre as velocidades 15 x 30 cm.s⁻¹ constatou-se que ocorreu uma diminuição significativa de 51% ($P < 0,05$) e entre as velocidades 30 x 45 cm.s⁻¹ a diminuição encontrada foi de 46% ($P < 0,05$) (Tabela IV e Figura 14A).

Na avaliação dos valores Pré-RA e Pós-RA, foi observado que o tônus adrenérgico permaneceu constante durante todo o protocolo, sem variações dentro de uma mesma velocidade, bem como entre velocidades distintas (Tabela IV e Figuras 14B, C e D).

Em relação ao tônus colinérgico, foram observadas alterações significativas em sua modulação Pré-RA e Pós-RA nas velocidades de 15 cm.s⁻¹ e 30 cm.s⁻¹. Na primeira velocidade, foi observada uma diminuição significativa de aproximadamente 72% ($P < 0,05$) na ação do tônus colinérgico Pré-RA quando comparado com a ação desse tônus Pós-RA. Na velocidade de 30 cm.s⁻¹, a diminuição observada corresponde a 58% ($P < 0,05$). Diferenças significativas entre a modulação colinérgica Pré-RA e Pós-RA não foram observadas em 45 cm.s⁻¹ (Tabela IV e Figuras 14B, C e D).

As modulações colinérgicas encontradas Pós-RA não diferiram significativamente entre as três velocidades. O mesmo não foi encontrado na modulação colinérgica Pré-RA, a qual diminuiu significativamente conforme o aumento da velocidade de natação. Na mudança de 15 cm.s⁻¹ para 30 cm.s⁻¹ observou-se uma diminuição de 40% ($P < 0,05$) e, ao aumentar de 30 cm.s⁻¹ para 45 cm.s⁻¹, a redução observada foi de 48% ($P < 0,05$) (Tabela IV e Figuras 14B, C e D).

Também foi calculada a porcentagem de ação dos tônus após a inversão das drogas (Grupo 2), onde os resultados obtidos assemelham-se aos encontrados no Grupo 1. Em relação ao período Routine, não foram observadas diferenças na ação do tônus adrenérgico nas diferentes velocidades. Por outro lado, reduções significativas foram obtidas na avaliação da ação do tônus colinérgico, onde, na passagem de 15 cm.s⁻¹ para 30 cm.s⁻¹, houve uma diminuição de 62% ($P < 0,05$), ao passo que a redução observada entre as velocidades de 30 cm.s⁻¹ e 45 cm.s⁻¹ foi de 79% ($P < 0,05$) (Tabela IV e Figura 15A).

Confirmando os dados encontrados no Grupo 1, notou-se que os valores Pré-RA e Pós-RA do tônus adrenérgico não variaram em uma mesma velocidade, bem como entre velocidades diferentes. Em relação ao tônus colinérgico foi possível observar alterações significativas em sua modulação Pré-RA e Pós-RA nas velocidades de 15 cm.s⁻¹ e 30 cm.s⁻¹. Na primeira velocidade foi observada uma diminuição de aproximadamente 79% ($P < 0,05$) e, na velocidade de 30 cm.s⁻¹ essa redução correspondeu a 65% ($P < 0,05$). Na velocidade de 45 cm.s⁻¹ não foi observada diferença significativa entre a modulação colinérgica Pré-RA e a Pós-RA (Tabela IV e Figuras 15B, C e D).

As modulações colinérgicas encontradas Pós-RA não diferiram significativamente entre as três velocidades. Por outro lado, a modulação colinérgica Pré-RA diminuiu significativamente conforme se aumentou a velocidade de natação. Assim, na mudança de 15 cm.s⁻¹ para 30 cm.s⁻¹ observou-se uma diminuição de 66% ($P < 0,05$) e, ao aumentar de 30 cm.s⁻¹ para 45 cm.s⁻¹, a redução observada foi de 48% ($P < 0,05$) (Tabela IV e Figuras 15B, C e D).

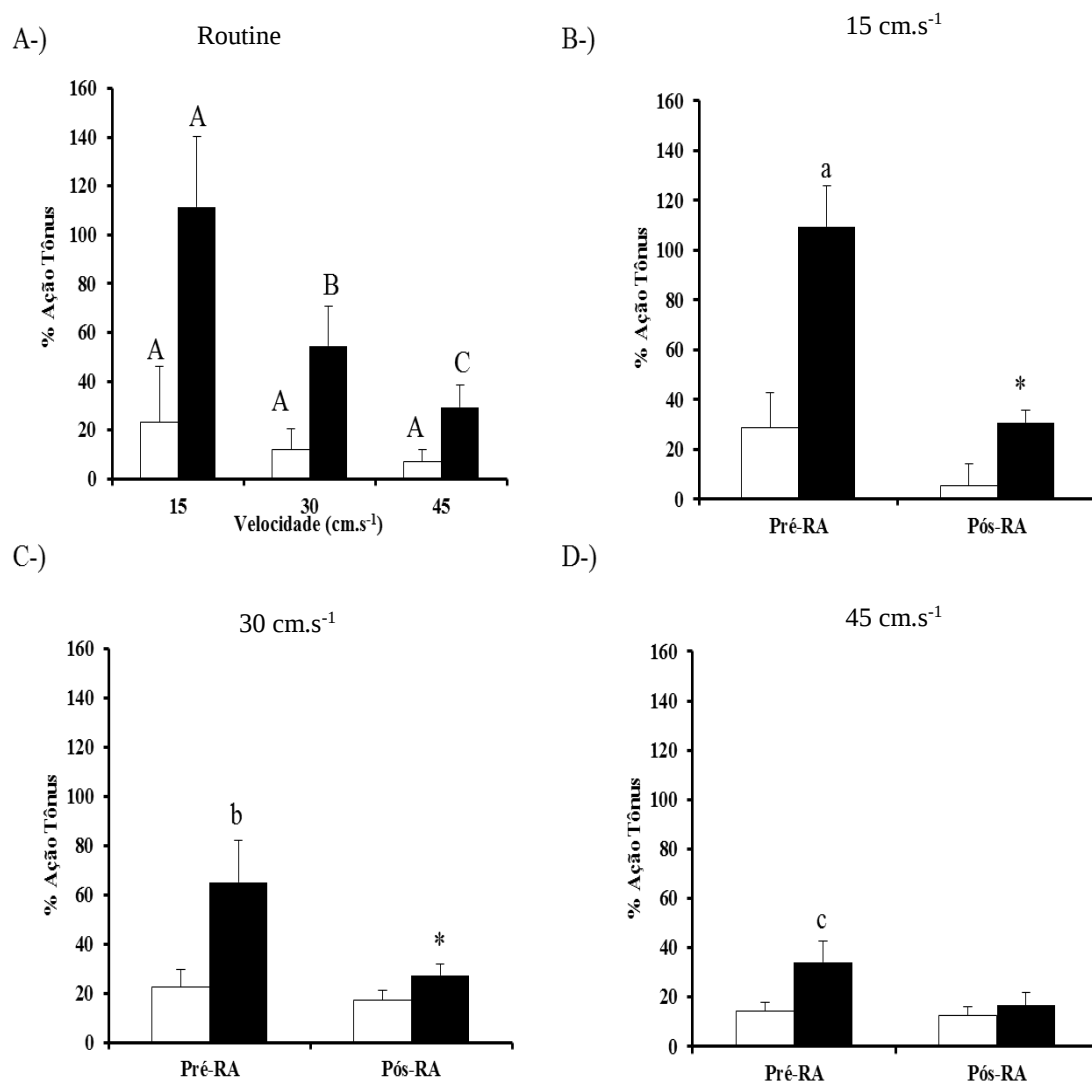


Figura 14: Porcentagem de ação do Tônus Adrenérgico (Coluna Branca) e Tônus Colinérgico (Coluna Preta) sob diferentes velocidades de natação. A: Routine; B: 15 cm/s; C: 30 cm/s e D: 45 cm/s. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de um mesmo tônus no período Routine nas diferentes velocidades. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro de um mesmo parâmetro nas diferentes velocidades. (*) indica diferença significativa entre a atividade Pré-Respiração Aérea e Pós-Respiração Aérea de um tônus em uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; $n = 9$ ($P \leq 0,05$).

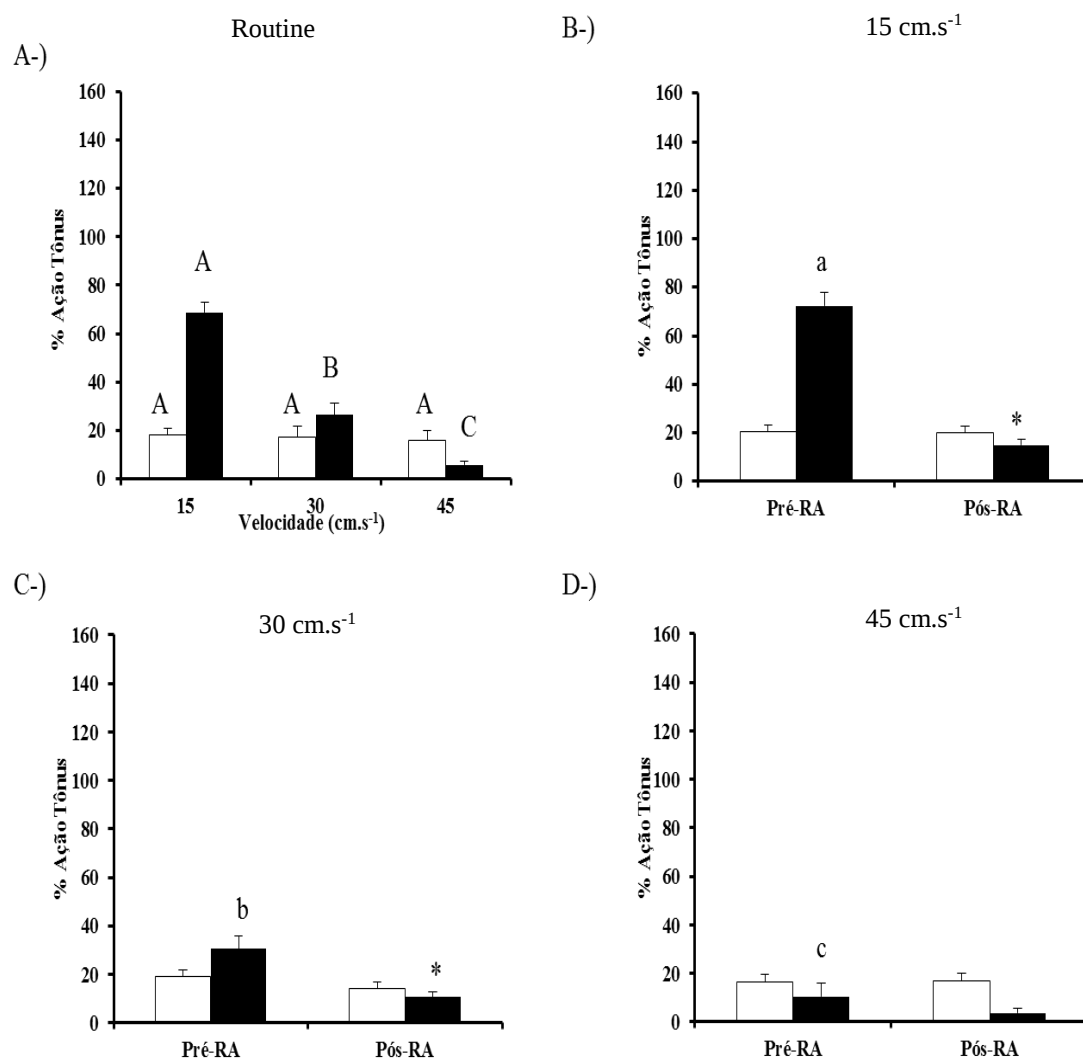


Figura 15: Porcentagem de ação do Tonus Adrenérgico (Coluna Branca) e Tonus Colinérgico (Coluna Preta) sob diferentes velocidades de natação. A: Routine; B: 15 cm/s; C: 30 cm/s e D: 45 cm/s. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de um mesmo tónus no período Routine nas diferentes velocidades. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro de um mesmo parâmetro nas diferentes velocidades. (*) indica diferença significativa entre a atividade Pré-Respiração Aérea e Pós-Respiração Aérea de um tónus em uma mesma velocidade. Valores são médias $\pm$ EPM; n = 9 ($P \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A natação em peixes pode ser dividida em três tipos: sustentada, prolongada ou natação de explosão (HOAR & RANDALL, 1978). A natação de explosão tem duração de apenas alguns segundos e se caracteriza por ser anaeróbica, diferentemente das outras duas que se caracterizam por serem aeróbicas e exigirem ajustes nos sistemas respiratório e cardiovascular (RANDALL, 1982). Desta forma, experimentos desenvolvidos em sistemas de respirometria exigem que os peixes avaliados desenvolvam uma natação sustentada, caracterizada também por um aumento de 4 a 6 vezes no consumo de O_2 em relação ao valor consumido em condições de repouso, sendo que 93% deste consumo estão relacionados ao aumento da atividade muscular necessária para realizar a natação (WEBB, 1998).

Neste trabalho, o exercício aeróbico sustentado ocasionou um aumento na f_{RA} e também na f_H em *C. gariepinus*. Foi observado também que, conforme se aumentou a velocidade de natação, ocorreu uma diminuição na ação do tônus colinérgico, bem como uma diminuição nas diferenças das f_H Pré-RA e f_H Pós-RA, tornando possível a associação de tais mudanças à ação colinérgica vagal. Após o bloqueio farmacológico do controle cardíaco observou-se diferenças na f_{RA} , em relação ao Controle, no protocolo Propranolol.

5.1 Frequência de Respiração Aérea e Exercício Físico

Peixes de respiração aérea facultativa comumente utilizam a RA como mecanismo para suprir a demanda de O_2 em condições hipóxicas ou durante atividade física. Porém, embora as brânquias de *C. gariepinus* sejam capazes de manter o metabolismo aeróbico do animal em normóxia e em repouso, eventos de RA são facilmente visualizados nos tanques de aclimação (observações pessoais). Tal comportamento foi anteriormente descrito por BELÃO et al. (2011), que observaram para a espécie aproximadamente 2 eventos de RA no intervalos de 1 h quando em condições de repouso e normóxia. Isto permite classificar *C. gariepinus* como respirador aéreo facultativo contínuo (ver detalhes em GRAHAM, 1997; BELÃO et al., 2011).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram uma relação entre a natação sustentada e a f_{RA} em *C. gariepinus*. Com o aumento da velocidade de natação, foi observado um aumento na f_{RA} em quase todos os protocolos, o que está relacionado com o mecanismo de resposta da espécie para a manutenção do metabolismo aeróbico. Estudos realizados com outras espécies bimodais descreveram o mesmo padrão observado em *C. gariepinus*. Em *Amia calva* e *Lepisosteus oculatus*, FARMER & JACKSON (1998) relataram maiores valores de f_{RA} bem como um aumento na quantidade de O_2 aéreo consumido com o aumento da velocidade de natação, apesar dos eventos de RA não serem comuns em situações de repouso e normóxia. Adicionalmente,

estudos também foram realizados com *Megalops cyprinoides*, *Gymnotus carapo* e *Pangasius hypophthalmus*, porém em diferentes condições de temperatura e protocolos de natação (SEYMOUR et al., 2007; MCKENZIE et al., 2012; LEFEVRE et al., 2013, respectivamente). Embora diferenças nos valores absolutos da f_{RA} tenham sido registradas pelos autores, considerando que a temperatura possui um efeito estimulador na f_{RA} (JOHANSEN et al., 1970; GRAHAM, 1997), o mesmo padrão de comportamento foi observado.

Os mecanismos de indução e regulação da RA durante o exercício em condições de normóxia não são totalmente conhecidos ainda. Acredita-se que alguns fatores possam influenciar o comportamento de RA, como uma limitação na extração de O_2 pelas brânquias (PACKARD, 1974). Em *C. gariepinus*, a taxa de extração de O_2 (EO_2) em situações de normóxia, de aproximadamente 49% (BELÃO et al., 2011), é considerada baixa quando comparado a espécies unimodais, como a carpa (*Cyprinus carpio*, 90%; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979), a traíra (*Hoplias malabaricus*, 83%; RANTIN et al., 1992) e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, 80%; FERNANDES & RANTIN, 1994). A grande capacidade de extrair O_2 pelas brânquias de peixes unimodais está associada à grande área para trocas gasosas na superfície respiratória branquial (FERNANDES et al., 1994), característica não observada em peixes de respiração bimodal, para os quais acredita-se que, por possuírem uma estrutura auxiliar na captação de O_2 , o ORA, a superfície funcional branquial para troca gasosa é menor, afetando assim a EO_2 .

A EO_2 de *C. gariepinus* também é considerada baixa quando comparada com outras espécies de respiração bimodal, como o jeju (*H. unitaeniatus*, 71%; OLIVEIRA et al., 2004), a enguia (*Synbranchus marmoratus*, 67%; BICUDO & JOHANSEN, 1979) e *Ancistrus chagresi* (79%; GRAHAM, 1983). Portanto, as brânquias de *C. gariepinus* não são tão eficientes na extração de O_2 , tornando-os mais dependentes do O_2 atmosférico captado pelos ORAs para suprir a alta demanda metabólica durante exercício físico. Outra característica importante que elucida a importância do ORA para *C. gariepinus* é a alta pressão crítica de O_2 apresentada pela espécie (P_{CO_2}). Em um estudo que privava o acesso ao ar, impossibilitando, assim, a realizações de RA pelo animal, BELÃO et al. (2011) evidenciaram que a P_{CO_2} para a espécie é de aproximadamente 60 mmHg, um valor alto quando comparado a outras espécies de respiração bimodal (jeju, *H. unitaeniatus*, ~40 mmHg, cascudo, *Rhinelepis strigosa*, ~24 mmHg, muçum, *S. marmoratus*, ~40 mmHg; respectivamente, OLIVEIRA et al., 2004; TAKASUSUKI, 1998; BICUDO & JOHANSEN, 1979). Tal fato, juntamente com a baixa EO_2 apresentada pela espécie, corroboram a importância do ORA na manutenção do metabolismo aeróbico, especialmente quando a demanda metabólica aumenta durante o exercício.

A atividade cardíaca de um peixe determina seu desempenho durante uma natação sustentada (GRAHAM & FARREL, 1990), sendo afetada em grande parte pela disponibilidade de O_2 , uma vez que se trata de um tecido aeróbico. Dessa forma, o aumento do consumo de O_2 pelo músculo esquelético durante o exercício físico leva a uma redução da PO_2 do sangue venoso.

Assim, além da clássica hipótese que associa o surgimento da RA a ambientes aquáticos hipóxicos (JOHANSEN, 1970; KLINGER et al., 1982; DUNN, 1983), acredita-se que a RA possa ter surgido como uma maneira de aumentar o suprimento de O_2 para o coração durante atividades físicas, promovendo um aumento da PO_2 venosa e uma consequente melhora no desempenho cardíaco (FARMER, 1997, 1999).

A crescente f_{RA} observada em *C. gariepinus* nos protocolos de natação pode estar associada ao aumento no consumo de O_2 pelos músculos, alterando a PO_2 venosa de forma suficiente para sensibilizar os quimiorreceptores de O_2 , os quais estimulam os centros respiratórios e induzem o aumento no comportamento de RA. Os quimiorreceptores de O_2 que modulam a f_{RA} em *C. gariepinus* estão localizados principalmente no 1º arco branquial, podendo ocorrer também em sítios extra-branquiais, como o ORA, e, devido à sua orientação interna e externa, são capazes de monitorar alterações na PO_2 sanguínea e aquática (BELÃO et al., 2015). Portanto, alterações na PO_2 venosa podem ser responsáveis pelo aumento na f_{RA} durante o exercício físico em *C. gariepinus*, fato já relatado para a truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss* (STEVENS & RANDALL, 1967; FARRELL & CLUTTERHAM, 2003).

5.2 Bloqueio farmacológico e controle da Frequência de Respiração Aérea

A injeção de propranolol, no Grupo 1, não modificou o padrão geral de aumento nos eventos de RA conforme se aumentou a velocidade de natação. Após a injeção do fármaco, as maiores f_{RA} , observadas nas duas últimas velocidades de natação, podem ter ocorrido devido à ação do propranolol em receptores β -adrenérgicos presentes nas brânquias de *C. gariepinus*. Em um trabalho com jeju, *H. unitaeniatus*, McKENZIE et al. (2007) observaram uma redução na ventilação branquial após o bloqueio adrenérgico com propranolol durante a hipóxia. Tal resposta pode ter ocorrido devido a um papel adrenérgico na regulação de quimiorreceptores sensíveis ao O_2 e na regulação da respiração branquial pelos peixes (McKENZIE et al., 1995).

Em estudos realizados com truta arco-íris, *O. mykiss*, PERRY et al. (1985) e VERMETTE & PERRY (1988) evidenciaram a ação de receptores β -adrenérgicos branquiais como agentes vasodilatadores das arteríolas aferentes lamelares, diminuindo a resistência vascular e aumentando, por consequência, a perfusão sanguínea no órgão, enquanto os receptores α -adrenérgicos e colinérgicos muscarínicos são responsáveis pela vasoconstrição dos vasos branquiais (NILSSON, 1983). Além disso, quando ligadas a receptores β -adrenérgicos branquiais, as catecolaminas aumentam a área de superfície funcional das brânquias, aumentando assim a captação de O_2 (SUNDIN & NILSSON, 2002). Desta forma, o bloqueio β -adrenérgico pode ter levado a uma diminuição na perfusão sanguínea branquial e também a uma diminuição na superfície de trocas gasosas, ocasionando uma diminuição da captação de O_2 , compensada pelo aumento na f_{RA} , com uma maior utilização do ORA.

5.3 Resposta cardíaca e controle cardíaco durante o exercício físico

Peixes teleósteos regulam a contração cardíaca e o fluxo sanguíneo no sistema circulatório a fim de prover quantidades adequadas de O_2 e nutrientes para todos os tecidos e sistemas. O aumento da demanda metabólica do músculo vermelho durante o exercício aeróbico sustentado é acompanhado por um aumento no débito cardíaco (Q) (JONES & RANDALL, 1978; OLSON & FARRELL, 2006; ALTIMIRAS et al., 2008). Uma vez que o Q é resultante do produto entre a f_H e o volume sistólico (V_S), o aumento do Q pode resultar de elevações na f_H e/ou V_S , que são amplamente controlados pelo sistema nervoso autônomo (CAMERON, 1978; OLSON & FARRELL, 2006).

O valores da f_H Routine observado na primeira velocidade de natação, 15 cm.s^{-1} , no protocolo Controle em ambos os grupos experimentais, ($53 \pm 3 \text{ bpm}$ e $66 \pm 2 \text{ bpm}$, respectivamente Grupo 1 e Grupo 2) evidenciam que, embora não estejam nadando efetivamente, o fluxo de água proporcionado pelo respirômetro foi suficiente para que um ajuste cardíaco nos peixes fosse necessário. Estes resultados são corroborados por BELÃO et al. (2011), onde em experimentos em respirometria fechada, em condições de repouso e normóxia, obtiveram valores de f_H próximos a 44 bpm.

A influência dos tônus adrenérgico e colinérgico durante a f_H Routine foi elucidada com os resultados obtidos nos protocolos Controle (ambos os grupos) e Propranolol, onde maiores valores desta frequência foram observados conforme se aumentou a velocidade de natação. Dessa forma, uma diminuição na ação do tônus colinérgico foi evidenciada, sendo este, portanto, o principal efector no ajuste da f_H quando há um aumento na demanda metabólica, ocasionada, neste estudo, pela natação sustentada. Em contrapartida, o tônus adrenérgico permaneceu relativamente baixo e constante em todas as velocidades. Corroborando os dados observados, a dominância do tônus colinérgico em relação ao adrenérgico em controlar a f_H em situações de repouso e sua consequente diminuição durante aumento de atividade já foi relatada para outras espécies de peixes, como em *Dicentrarchus labrax*, *Carassius auratus*, *Gadus morhua*, *Pagothernia bernacchi* e *Protopterus annectens* (IVERSEN et al. 2010; CAMERON, 1978; AXELSSON & NILSSON, 1986; AXELSSON et al., 1992; SANDBLOM et al., 2010, respectivamente).

Adicionalmente, AXELSSON et al. (1989), em um estudo com *Hemitripterus americanus*, evidenciaram a importância do tônus adrenérgico no aumento da f_H durante a atividade física. Sendo assim, uma dominância colinérgica não é comum para todos os peixes e pode estar associada a características espécies específicas. Há também evidências de que as ações dos tônus variem com a temperatura na qual os peixes estão aclimatados, onde, em um gradiente de temperatura de -1 a 27°C , observa-se que o tônus colinérgico possui maior ação nos extremos, tanto em temperaturas baixas quanto em altas, enquanto a ação do tônus adrenérgico é maior em

temperaturas medianas desse gradiente (SANDBLOM & AXELSSON, 2011). Portanto, considerando o hábitat e a temperatura a qual *C. gariepinus* está adaptado (25 °C), espera-se que ocorra uma maior ação colinérgica do que adrenérgica na modulação cardíaca, como observado neste estudo.

Após a realização dos duplos bloqueios I e II e do bloqueio com atropina, foram observadas f_H Routine maiores do que as encontradas nos seus respectivos controles, sendo que as mesmas permaneceram constantes ao longo de todo o protocolo. Tal fato, como discutido anteriormente, deve-se à alta inibição vagal a qual o coração de *C. gariepinus* está submetido. Apesar de constante também, os valores obtidos após o bloqueio com atropina foram superiores aos encontrados após o duplo bloqueio. A inversão na injeção das drogas antagonistas possibilita a observação da interação entre os tônus, chamada de “demanda compensatória”. Assim, a injeção de propranolol antes da atropina promove não apenas o bloqueio adrenérgico, como também um estímulo do tônus colinérgico, representando uma resposta compensatória para minimizar o efeito da abolição da influência adrenérgica no coração (ALTIMIRAS et al., 1997). Portanto, diferenças na f_H Routine em relação ao controle não foram observadas e, somente ao realizar a injeção de atropina antes, foi possível quantificar a importância do tônus adrenérgico, onde a diferença na f_H em relação ao duplo bloqueio pode ser creditada à ação desse tônus.

Em peixes de respiração bimodal é possível observar duas respostas cardíacas padrão em torno de cada RA, a bradicardia que precede o evento e a taquicardia que o sucede. Estas respostas, observadas nos protocolos Controle e Propranolol realizados em *C. gariepinus* no presente estudo, podem estar relacionadas a mecanismos fisiológicos que visam a otimização do funcionamento do ORA. A bradicardia observada ocorre devido à expiração do ar pouco oxigenado de dentro da câmara bucal para o ar atmosférico, enquanto a taquicardia ocorre com a inspiração de O_2 da atmosfera (JOHANSEN, 1966; GRAHAM et al., 1995). Além disso, acredita-se que a taquicardia esteja associada a um aumento no débito cardíaco e na perfusão do ORA (SKAALS et al., 2006). Assim, tais respostas podem aumentar a absorção de O_2 atmosférico e melhorar sua distribuição para os tecidos, tornando-os capazes de manter o metabolismo aeróbico (GRAHAM et al., 1995), principalmente em situações de alta demanda energética, como durante o exercício físico (FARMER & JACKSON, 1998).

Este padrão já havia sido anteriormente relatado para *C. gariepinus* por BELÃO et al. (2011 e 2015) e também para outras espécies de respiração bimodal, como muçum, *Synbranchus marmoratus* (JOHANSEN, 1966), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (McKENZIE et al., 2007), *Anabas testudineus* (SINGH & HUGHES, 1973) e *Monopterus albus* (IVERSEN et al. 2011). Adicionalmente, a anatomia do sistema circulatório de *C. gariepinus*, na qual não se observa um desvio ou preferência na perfusão das brânquias ou do ORA, confirma a ação da taquicardia como mecanismo para aumentar a perfusão do órgão arbóreo (GRAHAM, 1997). De forma diferente ao bagre, a piramboia, *Lepidosiren paradoxa* (peixe dipnóico), possui uma maior perfusão dos

pulmões após o evento de RA associada principalmente à redistribuição sanguínea que a espécie apresenta em sua circulação pulmonar, sendo o aumento na f_H , embora presente, pouco responsável pela melhora na distribuição de O_2 observada (AXELSSON et al., 1989; TAYLOR et al., 2010).

A importância do tônus colinérgico na modulação da f_H Pré e Pós-RA está relacionada, no presente estudo, à ausência de alterações da f_H após a realização dos protocolos de Duplo Bloqueio e Atropina. O mecanismo associado às variações na f_H em torno de eventos de RA está intimamente ligado a uma redução da atividade vagal cardíaca, que ocorre devido a uma diminuição da atividade reflexa de receptores branquiais. Desta forma, mecanorreceptores que agem durante os movimentos ventilatórios e quimiorreceptores de O_2 , após um evento de RA, diminuem suas atividades reflexas, ocasionando um aumento na f_H . (LEITE et al., 2009; TAYLOR et al., 2009).

A avaliação da ação dos tônus adrenérgico e colinérgico nas situações Pré e Pós-RA neste estudo torna evidente a importância destes na modulação cardíaca. Em ambos os grupos experimentais observou-se o mesmo padrão de resposta, a qual consiste em uma atividade constante do tônus adrenérgico, não variando sua ação no período Pré e Pós-RA, onde o tônus colinérgico corresponde ao principal modulador da variação na f_H . Em um estudo anterior com *C. gariepinus* em situação de repouso, BELÃO et al. (2015) relataram o mesmo padrão de controle autonômico Pré e Pós-RA e, assim como McKENZIE et al. (2007) em experimentos com jejú (*H. unitaeniatus*), também observaram que, após o bloqueio adrenérgico, a taquicardia Pós-RA não foi abolida, enquanto que, após o tratamento com atropina, ambas as espécies não foram capazes de apresentar taquicardia Pós-RA. Dessa forma, propõe-se que, em *C. gariepinus*, possivelmente os receptores β -adrenérgicos estejam atuando apenas no aumento da força de contração (efeito inotrópico positivo) Pré e Pós-RA, fazendo com que os receptores α -adrenérgicos sejam os responsáveis pela bradicardia Pré-RA, juntamente com a ação colinérgica vagal (BELÃO et al., 2015), uma vez que já foi relatado para outras espécies a ação cronotrópica negativa desses receptores (TIRRI & RIPATTI, 1982; FARREL, 1984, 1991; TEMMA et al., 1989). Sabendo disso, é interessante a realização de outros experimentos farmacológicos para elucidar a real contribuição dos receptores α -adrenérgicos na modulação.

Por fim, a modulação cardíaca observada durante o exercício em *C. gariepinus* apresentou particularidades quanto ao previamente descrito para outras espécies. A maioria dos vertebrados, incluindo peixes, apresenta uma ação conjunta dos ramos parassimpático e simpático do SNA, onde variações opostas na modulação destes possibilitam que seus efeitos sejam amplificados (TAYLOR et al., 1999). No presente trabalho, o comportamento obtido se difere do padrão acima citado, onde o tônus adrenérgico não apresenta variação em sua modulação associada a cada RA (Pré e Pós), fazendo com que a taquicardia observada Pós-RA ocorra exclusivamente devido à ação colinérgica vagal, podendo se tratar de uma característica espécie-específica. Como se trata

do primeiro estudo que visa compreender a modulação cardíaca durante o exercício em peixes de respiração aérea é interessante realizar experimentos com outras espécies de RA e observar como se dará a modulação cardíaca durante os eventos de RA.

5.4 Crítica ao método

Estudos prévios (SCHWERTE et al., 2006; SANDBLOM et al., 2009) demonstraram que as ações dos tônus adrenérgico e colinérgico podem variar em uma mesma espécie dependendo do estágio de desenvolvimento e do sexo. Também já é conhecido que diferentes tipos de cirurgias e instrumentação podem fazer com que haja diferenças na ação dos tônus em uma mesma espécie (GRÄNS et al., 2010). Sabendo disso, neste trabalho foram utilizados animais com tamanho e peso similares, indicando estágio de desenvolvimento próximo. Adicionalmente, todos foram submetidos a exatamente o mesmo protocolo pré e pós cirúrgico. Embora todos esses quesitos tenham sido levados em consideração, foram observadas diferenças na f_{RA} , f_H e % de ação dos tônus entre os grupos Controle I e Controle II. Tais diferenças podem ser creditadas a perturbações externas na sala onde foram realizados os experimentos, uma vez que em paralelo ao mesmo ocorriam outros, aumentando assim o índice de ruídos e luminosidade, fatores que podem aumentar o estresse do animal, alterando assim as variáveis avaliadas. Porém, embora tais diferenças nos valores absolutos de f_{RA} , f_H e na % de ação dos tônus tenham sido observadas, é interessante ressaltar que o padrão de resposta observado nos grupos foi o mesmo. Ambos apresentaram um aumento na f_{RA} e na f_H conforme se aumentou a velocidade de natação e também foi observado, em ambos os grupos, um tônus adrenérgico constante durante todo o protocolo e um tônus colinérgico que varia sua ação, modulando de maneira efetiva a f_H . Dessa forma, podemos assumir que tais diferenças obtidas não inviabilizaram a importância e qualidade dos resultados deste trabalho.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que, no bagre africano, *Clarias gariepinus*, há uma evidente relação entre o aumento na intensidade do exercício físico e o aumento na frequência de respiração aérea. Esse comportamento foi alterado após injeção do antagonista β -adrenérgico, propranolol. Alterações não foram evidenciadas após o duplo bloqueio autonômico cardíaco, não sendo possível elucidar a real importância das variações na frequência cardíaca na Pré-RA e Pós-RA e sua relação com a perfusão do ORA na espécie em questão. Também se observou um aumento na frequência cardíaca Routine conforme se aumentou a velocidade de natação, sendo esta modulada principalmente por ação colinérgica vagal inibitória, com o tônus adrenérgico constante durante todo o experimento, em ambos os grupos. Em relação à frequência cardíaca Pré-RA e Pós-RA observou-se que, conforme se aumentou a velocidade de natação, ocorreu uma diminuição na diferença desses valores, paralelo a uma diminuição na ação colinérgica vagal. Esses dados, juntos com os obtidos no protocolo Propranolol, evidenciaram que as variações na frequência cardíaca que ocorrem em cada evento de RA são exclusivamente devido à ação colinérgica vagal.

Dessa forma, este trabalho, pioneiro na área de modulação autonômica cardíaca durante o exercício físico em peixes de respiração aérea, elucidou uma questão importante da espécie em questão e, junto a outros estudos com espécies de respiração bimodal, possibilitam uma maior compreensão deste grupo tão diverso.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L.; AXELSSON, M. Cholinergic and adrenergic tones in the control of heart rate in teleosts. How should they be calculated? **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118A, p. 131–139, 1997.
- ALTIMIRAS, J.; CLAIREAUX, G.; SANDBLOM, E.; FARRELL, A. P.; MCKENZIE, D. J.; AXELSSON, M. Gastrointestinal bloodflow and postprandial metabolism in swimming sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 81, p. 663–672, 2008.
- ALVES, C. B. M.; VONO, V.; VIEIRA, F. Presence of the walking catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) (Siluriformes, Clariidae) in Minas Gerais state hydrographic basins, Brazil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 16, p. 259–263, 1999.
- AXELSSON, M. The circulatory system and its control. In: FARRELL, A. P.; STEFFENSEN, J. F. (Eds.). **The Physiology of Polar Fishes**. New York: Academic Press, 2005. v. 22.
- AXELSSON, M.; ABE, A. S.; BICUDO, J. E. P. W.; NILSSON, S. On the cardiac control in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 93A, p. 561–56, 1989.
- AXELSSON, M.; ALTIMIRAS, J.; CLAIREAUX, G. Post-prandial blood flow to the gastrointestinal tract is not compromised during hypoxia in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 2891–2896, 2002.
- AXELSSON, M.; DAVISON, B.; FORSTER, M.; NILSSON, S. Blood pressure control in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **J. Exp. Biol.**, v. 190, p. 265–279, 1994.
- AXELSSON, M.; DAVISON, W.; FORSTER, M. E.; FARRELL, A. P. Cardiovascular responses of the red-blooded antarctic fishes *Pagothenia bernacchiand* and *P. borchgrevinki*. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 179–201, 1992.
- AXELSSON, M.; DAVISON, W.; FRANKLIN, C. E. Cholinergic and adrenergic tone on the heart of the Antarctic dragonfish, *Gymnodraco acuticeps*, living at sub-zero temperatures. **Exp. Biol. Online**, v. 5, p. 1–12, 2000.
- AXELSSON, M.; EHRENSTRÖM, F.; NILSSON, S. Cholinergic and adrenergic influence on the teleost heart in vivo. **Exp. Biol.**, v. 46, p. 179–186, 1987.
- AXELSSON, M.; NILSSON, S. Blood pressure control during exercise in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. **J. Exp. Biol.**, v. 126, p. 225–236, 1986.
- BELÃO, T. C. **Respostas cardiorrespiratórias do teleósteo de respiração aérea, *Clarias gariepinus*, exposto à hipóxia gradual**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.
- BELÃO, T. C.; LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Cardiovascular responses to hypoxia in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), an air-breathing fish. **J. Comp. Physiol B.**, v. 181, n.7, p. 905–916, 2011.
- BELÃO, T. C.; ZERAIK, V. M.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; LEITE, C. A. C. RANTIN, F. T. Control of cardiorespiratory function in response to hypoxia in an air-breathing fish, the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*. **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.**, v. 187, p. 130–140, 2015.

- BICUDO, J. E. P. W.; JOHANSEN, K. Respiratory gas exchange in the air-breathing fish, *Sinbranchus marmoratus*. **Environ. Biol. Fishes**, v. 4, p. 1507–1510, 1979.
- BRAUNER, C. J.; VAL, A. L. Oxygen transfer. In: VAL, L. V.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology: Tropical Fishes**. San Diego/CA: Academic Press/Elsevier, 2006. v. 21, p. 277–306.
- BRAY, A. A. The evolution of the terrestrial vertebrates: Environmental and physiological considerations. **Phil. Trans. R. Soc.**, v. 309, p. 289–322, 1985.
- BURGESS, W. E. **An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes: A preliminary survey of Siluriformes**. Neptune/New Jersey: T.F.H. Publications, 1989. 784 p.
- BURNSTOCK, G. Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates. **Pharmacol. Rev.**, v. 21, p. 247–324, 1969.
- CALA, P. The fish fauna and aquatic milieu of the llanos of Colombia (Orinoco basin) with special regard to respiratory patterns of fishes inhabiting extreme hypoxic waters. In: V CONGRESS OF EUROPEAN ICHTHYOLOGISTS. **Proc. V Congr. Europ. Ichthyol.** Stockholm, 1987. p. 117–126.
- CAMERON, J. S. Autonomic nervous tone and regulation of heart rate in the goldfish, *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 63C, p. 341–349, 1978.
- CAMPBELL, G. Autonomic nervous system. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1970. v. IV, p. 109–132.
- CHATELIER, A.; MCKENZIE, D. J.; CLAIREAUX, G. Effects of changes in water salinity upon exercise and cardiac performance in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Mar. Biol.**, v. 147, p. 855–862, 2005.
- CHATELIER, A.; MCKENZIE, D. J.; PRINET, A.; GALOIS, R.; ROBIN, J.; ZAMBONINO, J.; CLAIREAUX, G. Associations between tissue fatty acid composition and physiological traits of performance and metabolism in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 3429–3439, 2006.
- COURTENAY, W. R.; STAUFFER, J. R. **Distribution, biology and management of exotic fishes**. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 1984. p. 431.
- DALE, H. H. Nomenclature of fibres in the autonomic system and their effects. **J. Physiol.**, v. 80, p. 10–11, 1933.
- DE GRAAF, G.; JANSSEN, H. Artificial reproduction and pond rearing of the african catfish *Clarias gariepinus* in Sub-Saharan Africa – A Handbook. **FAO Fisheries Technical Paper.**, v. 362, 1996.
- DEJOURS, P. **Principles of Comparative Respiratory Physiology**, Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 2 ed., 1981. 265 pp.
- _____. **Respiration in Water and Air: Adaptations, Regulation, Evolution**. Amsterdam: Elsevier, 1988. 179 p.
- DONNELLY, B. G. Aspects of behavior in the catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae), during periods of habitat desiccation. **Arnoldia**, v. 6, n. 9, p. 1–8, 1973.

- DUNN, J. Air-breathing fishes. **J. Vanc. Aquar.**, v. 6, p. 20-24, 1983.
- DUPONT-PRINET, A.; CLAIREAUX, G.; MCKENZIE, D. J. Effects of feeding and hypoxia on cardiac performance and gastrointestinal blood flow during critical speed swimming in the seabass *Dicentrarchus labrax*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 154 A, p. 233–240, 2009.
- FANGE, R.; JOHNELS A. G.; ENGER, P. S. The autonomic nervous system. In: BRODAL, A.; FANGE, R. (Eds.). **The Biology of Myxine**. Oslo: Universitet Forlaget, 1963. pp.124–136.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. **FAO database on Introduced Aquatic Species**. FAO: Rome, 1997.
- FARBER, J.; RAHN, H. Gas exchange between air and water and the ventilation pattern in the electric eel. **Respir. Physiol.**, v. 9, p. 151-161, 1970.
- FARMER, C. Did lungs and the intracardiac shunt evolve to oxygenate the heart in vertebrates? **Paleobiology**, v. 23, p. 358–372, 1997.
- FARMER, C. G. Evolution of the vertebrate cardio-pulmonary system. **Annu.Rev. Physiol.**, v. 61, n. 1, p. 573-592, 1999.
- FARMER, C. G.; JACKSON, D. C. Air-breathing during activity in the fishes *Amia calva* and *Lepisosteus oculatus*. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 943–948, 1998.
- FARREL, A. P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 523–536, 1984.
- _____. From hagfish to tuna: a perspective on cardiac function. **Physiol. Zool.**, v. 64, p. 1137–1164, 1991.
- _____. Cardiorespiratory performance during prolonged swimming tests with salmonids: a perspective on temperature effects and potential analytical pitfalls. **Philos. Trans. R. Soc. B**, v. 362, p. 2017–2030, 2007.
- FARRELL, A. P.; CLUTTERHAM, S. M. On-line venous oxygen tensions in rainbow trout during graded exercise at two acclimation temperatures. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 487–496, 2003.
- FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. **Aquaculture**, v. 127, n. 4, p. 339-346, 1994.
- FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L.; MORON, S. E. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. **Can. J. Zool.**, v. 72, p. 160-165, 1994.
- FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1-628, 2007.
- GAREY, W. F.; RAHN, H. Normal arterial gas tensions and pH and the breathing frequency of electrical eel. **Respir. Physiol.**, v. 9, p. 141-150, 1970.
- GIBSON, R. N. Recent studies on the biology of intertidal fishes. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.**, v. 20, p. 363-414, 1982.

- GLASS, M. L.; RANTIN, F. T.; VERZOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N.; KALININ, A. L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp, *Cyprinus carpio*. L. **J. Fish. Biol.**, v. 39, p. 142-149, 1991
- GLASS, M. L.; RANTIN, F. T. Gas exchange and control of respiration in air-breathing teleost fish. In: GLASS, M. L.; WOOD, S. C. **Cardio-Respiratory Control in Vertebrates**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. p. 99-119.
- GRAHAM, J. B. The transition to air breathing in fishes. II. Effects of hypoxia acclimation on the bimodal gas exchange of *Ancistrus chagresi* (Loricariidae). **J. Exp. Biol.**, v. 102, p. 157-173, 1983.
- _____. Seasonal and environmental effects on the blood hemoglobin concentrations of some Panamanian air-breathing fishes. **Environ. Biol. Fishes**, v. 12, p. 291-301, 1985.
- _____. **Air Breathing Fishes: Evolution, Diversity and Adaptation**. San Diego: Academic Press, 1997.
- _____. Aquatic and aerial respiration. In: EVANS, D. D.; CLAIBORNE, J. B. (Eds). **The Physiology of Fishes**, 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 85-117.
- GRAHAM, J. B.; BAIRD, T. A. The transition to air breathing in fishes.1. Environmental effects on the facultative air breathing of *Ancistrus chagresi* and *Hypostomus plecostomus* (Loricariidae). **J. Exp. Biol.**, v. 96, p. 53-67, 1982.
- GRAHAM, M. S.; FARRELL, A. P. Myocardial oxygen consumption in trout acclimated to 5 C° and 15 C°. **Physiol. Zool.**, v. 63, n. 3, p. 536-54, 1990.
- GRAHAM, J. B.; CHILLER, L. D.; ROBERTS, J. L. The transition to air breathing in fishes: V. Comparative aspects of cardiorespiratory regulation in *Synbranchus marmoratus* and *Monopterus albus* (Synbranchidae). **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 1455-1467, 1995.
- GRÄNS, A.; OLSSON, C.; PITSILLIDES, K.; NELSON, H. E.; CECHE JR., J. J.; AXELSSON, M. Effects of feeding on thermoregulatory behaviours and gut blood flow in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using biotelemetry in combination with standard techniques. **J. Exp. Biol.**, v. 213, p. 3198-3206, 2010.
- GREER-WALKER, M.; PULL, G. A. A survey of red and white muscle in marine fish. **J. Fish Biol.**, v. 7, p. 295-300, 1975.
- GRIGG, G. C. Studies on the Queensland lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Krefft): III. Aerial respiration in relation to habits. **Aust. J. Zool.**, v. 13, p. 413-421, 1965.
- HEE, N. H. Two new species of catfishes of the genus *Clarias* from Borneo (Teleostei: Clariidae). **Raffles Bull. Zool.**, v. 47, p. 17-32, 1999.
- HILAIRE, G. S. T. E. Sur les branchies du *Silurus anguillaris*. **Bull. Sci. Soc. Philom.**, p. 105-112, 1802.
- HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology**: v.7 - Locomotion. New York: Academic Press, 1978.

- HOGAN, Z.; BAIRD, I. G.; RADTKE, R.; VANDER ZANDEN, M. J. Long distance migration and marine habitation in the tropical Asian catfish, *Pangasius krempfi*. **J. Fish Biol.**, v. 71, p. 818–832, 2007.
- IVERSEN, N. K.; BAYLEY, M.; WANG, T. Autonomic control of the heart in the Asian swamp eel (*Monopterus albus*). **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integ. Physiol.**, v. 158, n. 4, p. 485–489, 2011.
- IVERSEN, N. K.; DUPONT-PRINET, A.; FINDORF, I.; MCKENZIE, D. J.; WANG, T. Autonomic regulation of the heart during digestion and aerobic swimming in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 156, p. 463–468, 2010.
- JOHANSEN, K. Air breathing in the teleost *Synbranchus marmoratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 18, p. 383–395, 1966.
- _____. Air breathing in fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology**, v. 4. New York: Academic Press, 1970. p. 361–411.
- JOHANSSON, M.; AXELSSON, M. Control of the systemic heart and the portal heart of *Myxine glutinosa*. **J. Exp. Biol.**, v. 199, p. 1429–1434, 1996.
- JONES, D. R.; RANDALL, D. J. The respiratory and circulatory systems during exercise. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology**, v. 7. New York: Academic Press, 1978. p. 425–501.
- KLINGER, S.; MAGNUSON, J. J.; GALLEPP, G. W. Survival mechanisms of the central mudminnow (*Umbra limi*), fathead minnow (*Pimephales promelas*) and brook stickleback (*Culaea inconstans*) for low oxygen in winter. **Environ. Biol. Fishes**, v. 7, p. 113–120, 1982.
- KRAMER, D. L. Aquatic surface respiration in the fishes of Panama: Distribution in relation to risk of hypoxia. **Environ. Biol. Fishes**, v. 8, p. 49–54, 1983.
- _____. Dissolved oxygen and fish behavior. **Environ. Biol. Fish**, v. 18, n. 2, p. 81–92, 1987.
- KRAMER, D. L.; MANLEY, D.; BOURGEOIS, R. The effect of respiratory mode and oxygen concentration on the risk of aerial predation in fishes. **Can. J. Zool.**, v. 61, p. 653–665, 1983.
- LACHNER, E. A.; ROBINS, C. R.; COURTENAY JR, W. R. Exotic fishes and other aquatic organisms introduced into North America. **Smithsonian Contrib. Zool.**, v. 59, p. 1–29, 1970.
- LANGLEY, J. N. **The Autonomic Nervous System**, I. Cambridge: Heffer, 1921.
- LEFEVRE, S.; DOMENICI, P.; MCKENZIE, D. J. Swimming in air-breathing fishes. **J. Fish Biol.**, v. 84, n. 3, p. 661–681, 2014.
- LEFEVRE, S.; WANG, T.; HUONG, D. T. T.; PHUONG, N. T.; BAYLEY, M. Partitioning of oxygen uptake and cost of surfacing during swimming in the catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. **J. Comp. Physiol. B**, v. 183, p. 215–221, 2013.
- LEITE, C.; TAYLOR, E.; GUERRA, C.; FLORINDO, L.; BELÃO, T.; RANTIN, F. The role of the vagus nerve in the generation of cardiorespiratory interactions in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Comp. Physiol. A**, v. 195, p. 721–731, 2009.

- LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp-how it affects O₂ uptake, ventilation, and O₂ extraction from water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38–49, 1979.
- LONG, J. A. **The Rise of Fishes: 500 Million Years of Evolution**. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 1995. 223 pp.
- McKENZIE, D. J. The energetics of fish swimming. In: FARRELL, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology**. New York: Academic Press/Elsevier, 2011. P. 1075–1080.
- 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*. **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 4224–4232, 2007.
- McKENZIE, D. J.; STEFFENSEN, J. F.; TAYLOR, E. W.; ABE, A. S. The contribution of air-breathing to aerobic scope and exercise performance in the banded knifefish *Gymnotus carapo* L. **J. Exp. Biol.**, v. 215, p. 1323–1330, 2012.
- McKENZIE, D. J.; TAYLOR, E. W.; BRONZI, P.; BOLIS, L. Aspects of cardioventilatory control in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). **Respir. Physiol.**, v. 100, p. 44–52, 1995.
- MILI, P. S. M.; TEIXEIRA, R. L. Notas ecológicas do bagre-africano, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Teleostei, Clariidae) de um córrego do Sudeste do Brasil. **Bull. Mus. Biol. Mello Leitão**, v. 19, p. 45–51, 2006.
- MLEWA, C. M.; GREEN, J. M.; SIMMS, A. Movement and habitat use by the marbled lungfish *Protopterus aethiopicus* Heckel 1851 in Lake Baringo, Kenya. **Hydrobiologia**, v. 537, p. 229–238, 2005.
- MORRIS, J. L.; NILSSON, S. The circulatory system. In: NILSSON, S.; HOLMGREN, S. (Eds.). **Comparative Physiology and Evolution of the Autonomic Nervous System**, v. 4. Chur: Harwood Academic Publisher, 1994. p. 193–246.
- MOUSSA, T. A. Morphology of the accessory air-breathing organs of the teleost, *Clarias lazera* (C. and V.). **J. Morphol.**, v. 98, p. 125–160, 1956.
- _____. Physiology of the accessory respiratory organs of the teleost, *Clarias lazera* (C and V). **J. Exp. Zool.**, v. 136, p. 419–454, 1957.
- MUNSHI, J. S. D. The accessory respiratory organs of *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Morph.**, v. 109, p. 115–139, 1961.
- _____. Gross and fine structure of respiratory organs of air-breathing fishes. In: HUGHES, G. M. (Ed.). **Respiration of Amphibious Vertebrates**. London: Academic Press, 1976. p. 73–104.
- NILSSON, S. **Autonomic Nerve Function in the Vertebrates**. Berlin: Springer, 1983.
- _____. Autonomic Nervous System of Fishes. In: FARRELL, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology**. New York: Academic Press/Elsevier, 2011. p. 80–88.
- NILSSON, S.; HOLMGREN, S. The autonomic nervous system. In: SHUTTLEWORTH, T. J. (Ed.). **Physiology of Elasmobranch Fishes**. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag, 1988. p. 143–169.

- OLIVEIRA, R. D.; LOPES, J. M.; SANCHES, J. R.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L. RANTIN, F. T. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 139, p. 479-485, 2004.
- OLSON, K. R.; FARRELL, A. P. The cardiovascular system. In: EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. (Eds.) **The Physiology of Fishes**, 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 119–152.
- PACKARD, G. C. The evolution of air breathing in Paleozoic gnathostome fishes. **Evolution**, v. 28, p. 320–325, 1974.
- PAXTON, J. R.; ESCHMEYER, W. N. **Encyclopedia of Fishes**. San Diego: Academic Press, 1995.
- PERRY, S.F.; DAXBOECK, C.; DOBSON, G.P. The effect of perfusion flow rate and adrenergic stimulation on oxygen transfer in the isolated, saline-perfused head of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J. Exp. Biol.**, v. 116, p. 251–269, 1985.
- PETERSEN, L. H.; GAMPERL, A. K. Effect of acute and chronic hypoxia on the swimming performance, metabolic capacity and cardiac function of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **J. Exp. Biol.**, v. 213, p. 808–819, 2010.
- PIIPER, J. Respiratory gas exchange at lungs, gills and tissues: Mechanisms and adjustments. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 5-22, 1982.
- PURVES, W. K.; SADAVA, D.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C. **Life: The Science of Biology**, v. III – Plants and Animals, 7 ed. New York: W. H. Freeman, 2004.
- RANDALL, D. J. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 275–288, 1982.
- RANDALL, D. J.; BURGGREN, W. W.; FARRELL, A. P.; HASWELL, M. S. **The Evolution of Air-Breathing in Vertebrates**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981.
- RANDALL, J. E.; ALLEN, G. R.; STEENE, R. C. **Fishes of the Great Barrier Reef and Coral Sea**. Revised edition. Bathurst: Crawford House, 1997. 557 pp.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale pharmacologia**. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2012.
- RANTIN, F. T.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L.; FERNANDES, M. N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish Biol.**, v. 41, p. 805–812, 1992.
- RANTIN, F. T.; GLASS, M. L.; KALININ, A. L.; VERZOLA, R. M. M.; FERNANDES, M. N. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Env. Biol. Fish.**, v. 36, p. 93-97. 1993.
- REID, S. G.; SUNDIN, L.; MILSOM, W. K. The cardiorespiratory system in tropical fishes: Structure, function, and control. In: VAL, L. V.; ALMEIDA VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. (Eds.) **Fish Physiology: Tropical Fishes**, v. 21. San Diego: Academic Press/Elsevier, 2006. p. 225–274.

- ROME, L. C.; FUNKE, R. P.; ALEXANDER, R. M.; LUTZ, G.; ALDRIDGE, H.; SCOTT, F.; FREADMAN, M. Why animals have different muscle fibre types. **Nature**, v. 355, p. 824-827, 1988.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Autonomic control of circulation in fish: A comparative view. **Auton. Neurosci. Basic Clin.**, v. 165, p. 127-139, 2011.
- SANDBLOM, E.; GRÄNS, A.; SETH, H.; AXELSSON, M. Cholinergic and adrenergic influences on the heart of the African lungfish *Protopterus annectens*. **J. Fish Biol.**, v. 76, p. 1046-1054, 2010.
- SANTER, R. M. Morphology and innervations of the fish heart. **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.**, v. 89, p. 1-102, 1985.
- SAYER, M. D. J.; DAVENPORT, J. Amphibious fish: Why do they leave water? **Rev. Fish Biol. Fisheries**, v. 1, p. 159-181, 1991.
- SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**, 5 ed. São Paulo: Editora Santos, 2002. 611 pp.
- SCHWERTE, T.; PREM, C.; MAIROSL, A.; PELSTER, B. Development of the sympatho-vagal balance in the cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) characterized by power spectrum and classical signal analysis. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 1093-1100, 2006.
- SEYMOUR, R. S.; CHRISTIAN, K.; BENNETT, M. B.; BALDWIN, J.; WELLS, R. M. G.; BAUDINETTE, R. V. Partitioning of respiration between the gills and air-breathing organ in response to aquatic hypoxia and exercise in the Pacific tarpon, *Megalops cyprinoides*. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 77, p. 760-767, 2004.
- SEYMOUR, R. S.; FARRELL, A. P.; CHRISTIAN, K.; CLARK, T. D.; BENNETT, M. B.; WELLS, R. M. G.; BALDWIN, J. Continuous measurement of oxygen tensions in the air-breathing organ of Pacific tarpon (*Megalops cyprinoides*) in relation to aquatic hypoxia and exercise. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 177, p. 579-587, 2007.
- SFAKIOTAKIS, M.; LANE, D. M.; DAVIES, J. B. C. Review of fish swimming modes for aquatic locomotion. **J. Ocean. Eng., IEEE**, v. 24, n. 2, p. 237-252, 1999.
- SHINGLES, A.; MCKENZIE, D. J.; CLAIREAUX, G.; DOMENICI, P. Reflex cardioventilatory responses to hypoxia in the flathead gray mullet (*Mugil cephalus*) and their behavioral modulation by perceived threat of predation and water turbidity. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 78, p. 744-755, 2005.
- SINGH, B. N.; HUGHES, G. M. Cardiac and respiratory responses in the climbing perch *Anabas testudineus*. **J. Comp. Physiol.**, v. 84, p. 205-226, 1973.
- SINGH, B. R. Development, origin and evolution of the neomorphic air breathing organs in teleosts. In: SINGH, B. R. (Ed.) **Advances in Fish Research**, v. 1. New Delhi: Narendra, 1993. pp. 1-16.
- SINGH, B. R.; MISHRA, A. P.; SHEEL, M.; SINGH, I. Development of the air-breathing organ in the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). **Zool. Anzeiger**, v. 208, p. 100-111, 1982.
- SKALS, M.; SKOVGAARD, N.; TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; ABE, A. S.; WANG, T. Cardiovascular changes under normoxic and hypoxic conditions in the airbreathing teleost

- Synbranchus marmoratus*: importance of the venous system. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 4167-4173, 2006.
- SMITH, R. S.; KRAMER, D. L. The effect of apparent predation risk on the respiratory behaviour of the Florida gar (*Lepisosteus platyrhincus*). **Can. J. Zool.**, v. 64, p. 2133-2136, 1986.
- SO, N.; VAN HOUDT, J. K. J.; VOLCKAERT, F. A. M. Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong River. **Fish. Sci.**, v. 72, p. 469-476, 2006.
- STEVENS, E. D.; RANDALL, D. J. Changes in blood pressure, heart rate and breathing rate during moderate swimming activity in rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 46, p. 307-315, 1967.
- SUNDIN, L.; NILSSON, S. Branchial innervation. **J. Exp. Zool.**, v. 293, p. 232-248, 2002.
- TAKASUSUKI, J.; FERNANDES, M. N.; SEVERI, W. The occurrence of aerial respiration in *Rhinelepis strigosa* during progressive hypoxia. **J. Fish Biol.**, v. 52, p. 369-379, 1998.
- TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 855-916, 1999.
- TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; BELÃO, T.; RANTIN, F. T. The basis of vagal efferent control of heart rate in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Exp. Biol.**, v. 212, p. 906-913, 2009.
- TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; SKOVGAARD, N. Autonomic control of cardiorespiratory interactions in fish, amphibians and reptiles. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43, p. 600-610, 2010.
- TEMMA, K.; KOMAZU, Y.; SHIRAKI, Y.; KITAZAWA, T.; KONDO, H. The roles of α and β -adrenoceptors in the chronotropic responses to norepinephrine in carp heart (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol. C - Comp. Pharmacol.**, v. 92, p. 149-153, 1989.
- TEUGELS, G. G.; ADRIAENS, D. Taxonomy and Phylogeny of Clariidae – An overview, cap. 16, part. III. In: ARRATIA, G.; KAPOOR, B. G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. (Eds). **Catfishes**, v. I. New Hampshire: Science Publishers, p. 465-466, 2003.
- TEUGELS, G. G.; DENAYER, B.; LEGENDRE, M. A systematic revision of the African catfish genus *Heterobranchus* Geoffroy-Saint-Hilaire, 1809 (Pisces: Clariidae). **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 98, p. 237-257, 1990.
- THOMSON, K. S. The origin of the tetrapods. **Am. J. Sci.**, v. 293A, p. 33-62, 1993.
- TIRRI, R.; RIPATTI, P. Inhibitory adrenergic control of heart rate of perch (*Perca fluviatilis*) in vitro. **Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comp. Pharmacol.**, v. 73, p. 399-401, 1982.
- VANDEWALLE, P.; CHARDON, M. A new hypothesis on the air flow in air breathing in *Clarias gariepinus* (Teleostei, Siluriformes). **Belg. J. Zool.**, v. 121, p. 73-80, 1991.
- VERMETTE, M. G.; PERRY, S. F. Adrenergic involvement in blood oxygen transport and acid-base balance during hypercapnic acidosis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J. Comp. Physiol.**, v. 158B, p. 107-115, 1988.

- WEBB, P. W. Swimming. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The Physiology of Fishes**, 2 ed.,. Boca Raton, FL: CRC Press - Marine Science Series, 1998. p. 3–24.
- YALÇIN, S.; AKYURT, I.; SOLAK, K. Stomach contents of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in the River Asi (Turkey). **Turk. J. Zool.**, v. 25, p. 461–468, 2001.
- YOUNG, J. Z. The autonomic nervous system of selachians. **Q. J. Microsc. Sci.**, v. 75, p. 571–624, 1933.