

Isadora Anello De Oliveira

**Estaria a correlação barorreflexo-ventilação presente no teleosteo tilápia-
do-nilo (*Oreochromis niloticus*)?**

São José do Rio Preto

2019

Isadora Anello De Oliveira

**Estaria a correlação barorreflexo-ventilação presente no teleosteo tilápia-
do-nilo (*Oreochromis niloticus*)?**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

São José do Rio Preto

2019

| | |
|------|--|
| O48e | <p>Oliveira, Isadora Anello de</p> <p>Estaria a correlação barorreflexo-ventilação presente no teleósteo tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)? / Isadora Anello de Oliveira. -- , 2019</p> <p>49 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientador: Luiz Henrique Florindo</p> <p>1. Barorreceptores. 2. Hipertensão. 3. Hipotensão. 4. Interação cardiorrespiratória. 5. Pressão Arterial. I. Título.</p> |
|------|--|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
 Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isadora Anello de Oliveira

**Estaria a correlação barorreflexo-ventilação presente no teleósteo tilápia-
do-nilo (*Oreochromis niloticus*)?**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Diana Amaral Monteiro
UFSCar – São Carlos

Prof^ª. Dr^ª. Monica Jones Costa
UFSCar – Sorocaba

São José do Rio Preto
12 de março de 2019

Dedico este trabalho a minha mãe Maria José por ser meu apoio e meu porto seguro. És meu sol. Também dedico a minha irmã e melhor amiga Marília por sempre estar presente ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças em todos os momentos.

Ao meu orientador, Luiz Henrique Florindo, pelas oportunidades proporcionadas desde a minha graduação, pela confiança, apoio e suporte ao longo desta jornada. Obrigada por estar ao meu lado nos meus momentos de insegurança.

Aos meus coorientadores, Vinícius e Victor Hugo, sem os quais tenho certeza de que não teria optado por este caminho. Agradeço pela paciência ao me ensinar, pelo apoio durante todas as fases deste trabalho, pelo exemplo profissional e pela amizade e companheirismo.

A minha amiga Natália por estar ao meu lado me ajudando durante todo o desenrolar desse projeto. Tenho certeza de que sem você eu não teria mantido minha sanidade.

Às minhas amigas e colegas do LZCV: Mariana, Ariela, Gabrielle, Igor, Gabriela, Amanda e Leonardo pela amizade e pelos melhores momentos durante as tardes no laboratório.

À José Luiz Pastorello, por ser como um pai para mim.

Aos meus amigos de Jaú, pelo grande apoio ao longo de quase toda a minha vida. Em especial: Camila, Bruna, Juliana e Guilherme.

A Kelly, por ter me dado um lar e uma oportunidade de viver em família mesmo em outra cidade. Agradeço também aos outros membros dessa nossa família linda: Tomás e Kaio.

Aos meus amigos de São José do Rio Preto, por todas os momentos inesquecíveis: Camila, Luiz, Guilherme, Amanda, Carolina, Aline, Olavo, Natiele, Fernanda, Matheus e Giselle.

À todos os professores, amigos e colegas aqui não citados, mas que foram presentes durante todo meu caminho até aqui.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“A educação é o poder das mulheres.”

(Malala Yousafzay)

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(Marie Curie)

RESUMO

Os mecanismos de modulação da pressão arterial a curto prazo estão relacionados ao sistema nervoso autônomo. A primeira e mais rápida ação para o controle da pressão é feita por barorreceptores. Estes receptores detectam variações na pressão e atuam enviando informações ao sistema nervoso central (SNC), o qual desencadeia reações autonômicas que geram mudanças na frequência cardíaca (f_H), na força contrátil do coração e na resistência vascular sistêmica, causando vasodilatação ou vasoconstrição, que tendem a normalizar a pressão arterial. Além da função primária do barorreflexo de manter a pressão arterial estável, uma relação inversamente proporcional entre pressão arterial e as variáveis respiratórias já foi observada em mamíferos e em anfíbios. Neste último grupo, além dessa interação entre o barorreflexo e a ventilação, o reflexo barostático também está relacionado com o sistema linfático. Há dados que também sugerem a existência dessa modulação em répteis crocódilianos. Apesar de já ter sido observada em alguns grupos de vertebrados terrestres, a correlação entre o barorreflexo e a ventilação nunca foi estudada em peixes, embora tenha sido especulada a existência da mesma devido a considerável conservação evolutiva das redes neurais que coordenam o sistema cardiorrespiratório. Neste contexto, o presente estudo investigou a existência dessa modulação barorreflexo-ventilação em uma espécie de teleosteo, a tilápia-do-nylo (*O. niloticus*). Para isso foram feitas aplicações de um fármaco vasoconstritor, o cloridrato de fenilefrina, e de um fármaco vasodilatador, o nitroprussiato de sódio. Foram analisadas curvas de correlações sigmoidais entre a pressão arterial e a frequência cardíaca, para atestar a relação inversamente proporcional entre ambas. E também curvas de correlação e regressões lineares entre a pressão arterial e as variáveis respiratórias – frequência respiratória, amplitude ventilatória e ventilação total. Os resultados mostraram que, neste teleosteo, não existe uma relação inversamente proporcional entre a pressão arterial e as variáveis respiratórias estudadas. Isso devido às infusões do cloridrato de fenilefrina não terem ocasionado uma ação significativa em nenhuma variável, e atrelado ao nitroprussiato de sódio não provocar elevações na frequência respiratória. O que mostra que o barorreflexo não atua regulando a ventilação, demonstrando pela primeira vez que essa correlação provavelmente tenha surgido em grupos de vertebrados mais apicais do que se era especulado; ou que tenha existido em Actinopterygii mais basais, mas tenha sido perdida em algumas gerações e possivelmente reaparecido em grupos mais derivados (atavismo).

Palavras-chave: Barorreceptores; Hipertensão; Hipotensão; Interação cardiorrespiratória; Pressão arterial

ABSTRACT

The mechanisms of short-term blood pressure modulation are related to the autonomic nervous system. The first and fastest action for pressure control is made by baroreceptors. These receptors detect variations in pressure and act by sending information to the central nervous system (CNS), which triggers autonomic reactions that generate changes in heart rate (f_H), in the contractile force of the heart and in systemic vascular resistance, causing vasodilation or vasoconstriction, which tend to normalize blood pressure. In addition to the primary function of baroreflex to maintain stable blood pressure, an inverse relationship between blood pressure and respiratory variables has been observed in mammals and amphibians. In amphibians, the barostatic reflex is also related to the lymphatic system. There are data that also suggest the existence of this modulation in crocodylian reptiles. Even though it has been observed in some groups of terrestrial vertebrates, the correlation between baroreflex and ventilation has never been studied in fish, although it has been speculated because of the considerable evolutionary conservation of the neural networks that coordinate the cardiorespiratory system. In this context, the present study investigated the existence of this baroreflex-ventilation modulation in a teleost species, the Nile tilapia (*O. niloticus*). For this, we made applications of a vasoconstrictor drug, phenylephrine hydrochloride, and a vasodilator drug, sodium nitroprusside. Sigmoid correlation curves between blood pressure and heart rate were analyzed to demonstrate an inversely proportional relationship between both of them. We also made correlation curves and linear regressions between blood pressure and respiratory variables - respiratory rate, ventilatory amplitude and total ventilation. The results showed that, in this teleost, there is no inversely proportional relationship between blood pressure and the respiratory variables studied. Because infusions of phenylephrine hydrochloride did not cause significant action in any variable, and also because sodium nitroprusside did not cause respiratory rate elevations. The results showed that, in this teleost, the baroreflex does not act regulating the ventilation, demonstrating for the first time that this correlation probably arose in groups of vertebrates more apical than it was speculated; or has existed in more basal fish groups, but has been lost in some generations and possibly reappeared in more derived groups (atavism).

Keywords: Baroreceptors; Blood pressure; Cardiorespiratory interaction; Hypertension; Hypotension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Relação entre o gradiente de pressão criado no vaso sanguíneo, a resistência e o fluxo sanguíneo. P_1 e P_2 representam as pressões criadas nas duas extremidades do vaso. Fonte: Guyton e Hall (2011).15
- Figura 2** - Fotografia de um exemplar adulto de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*. Fonte: <GNU – General Public Licence>.22
- Figura 3** - Mesa cirúrgica com sistema de recirculação de água e benzocaína. Fonte: elaborada pela autora.25
- Figura 4** - A: Esquema simplificado da vasculatura branquial. A seta indica a artéria branquial aferente (ABA) onde ocorre a inserção da cânula. B: cânula inserida na ABA do terceiro arco branquial. ABE: Artéria branquial eferente; ABA: Artéria branquial aferente; VB: Veia branquial. Fonte: elaborada pela autora, modificada de NILSSON E SUNDIN, 98.25
- Figura 5** - Esquema mostrando a inserção da cânula bucal por meio de uma perfuração entre as narinas do animal. Fonte: elaborada pela autora.26
- Figura 6** - Finalização da instrumentação. A: Cânula inserida na artéria branquial aferente. B: cânula bucal implantada entre as narinas. Fonte: elaborada pela autora.27
- Figura 7** - Representação esquemática demonstrando os grupos experimentais, o número de réplicas em cada grupo (N) e a ordem do protocolo experimental com os tempos aproximados entre as aplicações. Fonte: elaborada pela autora.30
- Figura 8** - Efeito da fenilefrina e do nitroprussiato de sódio nas variáveis cardiorrespiratórias de *O. niloticus*. Pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média) (A, B), frequência cardíaca (f_H) (C, D), frequência respiratória (f_R) (E, F), amplitude ventilatória (V_{AMP}) (G, H), ventilação total (V_T) (I, J) dos animais ($N=8$) durante o período controle e durante os picos de resposta para as administrações de fenilefrina (10, 20, 40, 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e nitroprussiato de sódio (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Todos os valores estão expressos em média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma

diferença significativa entre a variável observada e o período controle ($P \leq 0.05$). Fonte: elaborada pela autora.....31

Figura 9 - Curvas sigmoidais barorreflexas de *Oreochromis niloticus*. A: Representação das sigmóides individuais dos 8 animais. B: Curva sigmoidal barorreflexa construída usando os valores da média das pressões arteriais na aorta ventral (P_{VA} média) e da média das frequências cardíacas (f_H) dos animais ($N=8$) durante o período controle (círculo preto) e durante os picos das respostas cardiovasculares para as administrações de fenilefrina (10, 20, 40, 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e nitroprussiato de sódio (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (círculos cinzas). Valores expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pela autora.32

Figura 10 - Regressões lineares entre a pressão arterial média na aorta ventral e as variáveis ventilatórias de *Oreochromis niloticus*. Regressão linear entre os animais ($N=8$), pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média) e frequência respiratória (f_R) (A), amplitude ventilatória (V_{AMP}) (B) e ventilação total (V_T) (C). Os valores observados durante o período controle estão representados pelos círculos pretos; os valores observados durante os picos da resposta da fenilefrina estão representados pelos círculos vermelhos; e os valores observados durante os picos da resposta do nitroprussiato de sódio estão representados pelos círculos azuis. Valores expressos em média \pm EPM. Os asteriscos indicam que o slope é significativamente diferente de zero ($P \leq 0.05$). Fonte: elaborada pela autora.....34

Figura 11 - Efeitos individuais das alterações na pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média), frequência respiratória (f_R) (A), amplitude ventilatória (V_{AMP}) (B) e ventilação total (V_T) (C). Cada animal está representado por um símbolo distinto ($N=8$). Os símbolos cinzas representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração farmacológica de todos os indivíduos (valores absolutos). Os símbolos vermelhos representam as variáveis basais médias dos animais (média \pm EPM). Fonte: elaborada pela autora.35

Figura 12 - Localização da aorta ventral, dorsal e da artéria branquial aferente. Em vermelho é possível ver aonde ocorre a canulação para aquisição da pressão média na aorta dorsal, e a linha rosa indica o local onde ocorre a canulação para aquisição da pressão média na aorta ventral. Fonte: Imagem modificada de SANDBLOM E AXELSSON (2005).37

Figura 13 - Sigmoides derivadas da pressão na aorta ventral e da pressão na aorta dorsal. A linha contínua indica uma sigmoide hipotética formada a partir da coleta da pressão na aorta ventral, e a linha tracejada corresponde a sigmoide hipotética derivada da pressão na aorta dorsal. Fonte: a autora.38

Figura 14 - Localização dos receptores beta-adrenérgicos nas artérias branquiais. ABE: Artéria branquial eferente; ABA: Artéria branquial aferente; ALe: arteríola lamelar eferente; ALa: arteríola lamelar aferente; LS: Lamela secundária. Fonte: elaborada pela autora, modificada de NILSSON E SUNDIN, 1998.42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características morfofuncionais dos vasos sanguíneos.16
- Tabela 2.** Variáveis cardiovasculares e barorreflexas no período controle de *O. niloticus* (N=8). As variáveis barorreflexas derivaram da curva sigmoideal barorreflexa gerada depois da administração das diferentes doses de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio.33
- Tabela 3.** Análises do slope e do coeficiente de regressão linear para a relação entre P_{VA} média e as variáveis respiratórias geradas depois da administração das diferentes doses de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio em *O. niloticus* (N=8).35
- Tabela 4.** Pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média), Frequência cardíaca (f_H) Frequência respiratória (f_R), Amplitude ventilatória (V_{AMP}), Ventilação total (V_T) antes e depois da aplicação da solução salina (0.9% NaCl) em *O. niloticus* (N=4).36
- Tabela 5.** Efeito da fenilefrina ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$) e do nitroprussiato de sódio ($80 \mu\text{g kg}^{-1}$) na Pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média), Frequência cardíaca (f_H) Frequência respiratória (f_R), Amplitude ventilatória (V_{AMP}), Ventilação total (V_T) em *O. niloticus* sob o efeito do duplo bloqueio autonômico com atropina (1.5 mg kg^{-1}) e propranolol (1.5 mg kg^{-1}) (N=5).36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------|--|
| ABA | Artéria branquial aferente |
| ABE | Artéria branquial eferente |
| ADH | Hormônio antidiurético |
| ALa | Arteriola lamelar aferente |
| ALe | Arteriola lamelar eferente |
| bpm | Batimento(s) por minuto |
| CAUNESP | Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista |
| CEUA | Comissão de Ética em Experimentação Animal |
| cm | Centímetro(s) |
| cmH₂O | Centímetros de água |
| DB | Duplo bloqueio |
| EPM | Erro padrão médio |
| <i>f_H</i> | Frequência cardíaca |
| <i>f_R</i> | Frequência respiratória |
| Hz | Hertz |
| kg | Quilograma(s) |
| kpa | Kilopascal |
| LS | Lamela secundária |
| mg | Miligrama(s) |
| min | Minuto(s) |
| ml | Mililitro(s) |
| mmHg | Milímetro(s) de mercúrio |
| <i>N</i> | Número de réplicas |
| <i>P_{DA}</i> | Pressão arterial na aorta dorsal |
| PE20 | Polietileno calibre 20 |
| <i>P_{VA}</i> | Pressão arterial na aorta ventral |
| SNC | Sistema nervoso central |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” |
| <i>V_{AMP}</i> | Amplitude ventilatória |
| VB | Veia branquial |
| <i>V_T</i> | Ventilação total |
| µg | Micrograma |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E A PRESSÃO ARTERIAL..... | 15 |
| 1.2 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL | 17 |
| 1.3 BARORREFLEXO E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA RESPIRATÓRIO | 19 |
| 1.4 MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 23 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 OS ANIMAIS | 24 |
| 3.2 PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS | 24 |
| 3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL | 28 |
| 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 CRÍTICA AOS MÉTODOS..... | 37 |
| 5.2 REGULAÇÃO BARORREFLEXA..... | 38 |
| 5.3 ENTENDIMENTOS QUANTO A AUSÊNCIA DA CORRELAÇÃO | 41 |
| 5.4 VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS DA INJEÇÃO..... | 41 |
| 5.5 DUPLO BLOQUEIO AUTÔNOMICO | 41 |
| 6. CONCLUSÕES | 44 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |

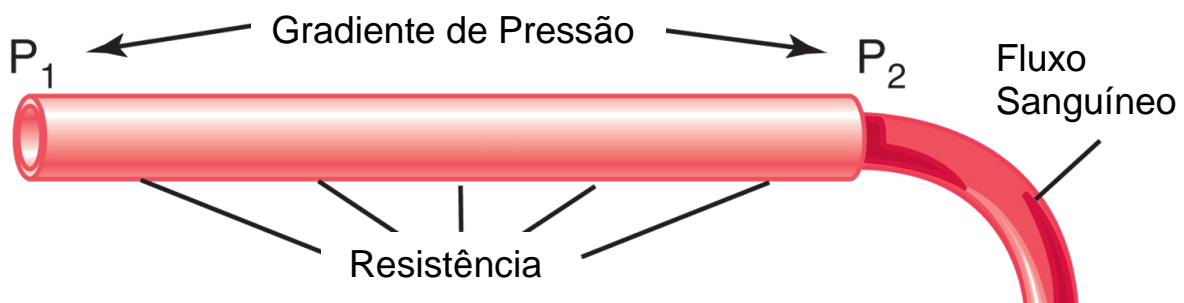
1. INTRODUÇÃO

1.1 SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E A PRESSÃO ARTERIAL

O sistema cardiovascular é responsável por suprir as necessidades dos tecidos corporais por meio do transporte de oxigênio, gás carbônico, calor, hormônios e a eliminação de produtos do metabolismo. Esse sistema também é, de modo geral, responsável pelo funcionamento ótimo das células e do organismo. O coração e os vasos sanguíneos são os responsáveis por produzir a pressão arterial e o débito cardíaco para gerar o fluxo sanguíneo tecidual necessário para o cumprimento dessas funções (BAGSHAW, 1985; GUYTON E HALL, 2011).

O débito cardíaco consiste no volume de sangue bombeado pelo coração por unidade de tempo. Esse sangue é conduzido através dos vasos sanguíneos e o principal fator que causa esse fluxo sanguíneo pelo sistema vascular é o gradiente de pressão criado pelo coração (HILL *et al.*, 2012). Esse fluxo sanguíneo é então determinado pela diferença de pressão entre as duas extremidades do vaso (o gradiente de pressão) e também pela resistência vascular (Fig. 1), que consiste no resultado do atrito entre o sangue em movimento e o endotélio do interior do vaso (RANDALL *et al.*, 2000; GUYTON E HALL, 2011).

Figura 1. Relação entre o gradiente de pressão criado no vaso sanguíneo, a resistência e o fluxo sanguíneo. P_1 e P_2 representam as pressões criadas nas duas extremidades do vaso. Fonte: Guyton e Hall (2011).



Cada tecido tem a capacidade de controlar seu próprio fluxo sanguíneo de acordo com suas necessidades metabólicas. Esse controle é realizado por meio de constrições e dilatações das metarteríolas, que podem ser induzidas tanto por substâncias vasoativas secretadas pelos tecidos adjacentes quanto por algum déficit nutricional local. Contudo, a magnitude do fluxo sanguíneo para os tecidos não é mantida em níveis constantes, mas sim nos níveis mínimos necessários para o suprimento de suas necessidades, o que faz com que a carga de trabalho do coração seja sempre a menor possível (GUYTON E HALL, 2011; MAGDER, 2018).

Os vasos sanguíneos podem apresentar características morfofuncionais distintas, motivo pelo qual os mesmos são classificados de acordo com o exposto abaixo na tabela 1, baseado em Guyton e Hall (2011):

Tabela 1. Características morfofuncionais dos vasos sanguíneos.

| Vasos sanguíneos: | Características principais: |
|------------------------------------|---|
| Artérias: | Recebem o sangue bombeado pelo coração a altas pressões e direcionam-no para todas as partes do corpo, constituindo então a fase inicial do transporte sanguíneo. |
| Arteriolas e Metarteriolas: | Constituem os ramos finais do sistema arterial. Possuem paredes vasculares robustas e com espessa camada de músculo liso, característica também encontrada nas artérias. Seu diâmetro é constantemente controlado pelos tecidos adjacentes de acordo com as demandas metabólicas dos mesmos, regulando dessa forma também o fluxo sanguíneo liberado para os capilares que os irrigam. |
| Capilares: | Ductos ultrafinos e muito permeáveis, cuja principal função é permitir a difusão de gases respiratórios, líquidos, hormônios, nutrientes e outras substâncias entre o sangue e os tecidos circundantes. A região capilar é a que mais promove redução da pressão sanguínea proveniente do sistema arterial, isso porque é a região que possui maior resistência vascular – e essa resistência também é responsável por fazer com que o fluxo sanguíneo capilar seja lento, permitindo maior difusão dos fatores supracitados. |
| Veias: | O sangue é coletado dos capilares por vênulas e estas coalescem progressivamente formando as veias. Estas são responsáveis por transportar o sangue de volta ao coração. Como fazem parte da circulação pós-capilar, apresentam pressão sanguínea baixa, porém quase sempre suficiente para promover o retorno venoso. As veias e vênulas possuem paredes pouco robustas e com camada reduzida de músculo liso. |

As artérias são responsáveis por direcionar o sangue às demais partes do corpo (GUYTON E HALL, 2011). Esse sangue chega nas artérias com altas pressões, que podem variar de acordo com a contração e o relaxamento cardíaco. Essa manutenção do fluxo sanguíneo que ocorre na diástole cardíaca é muito importante e só é possível devido a elasticidade desses vasos que amortece essas oscilações de pressão. Durante a diástole cardíaca o coração não gera pressão e o que impede a pressão arterial de cair é justamente essa elasticidade das grandes artérias, que acumulam parte do sangue impulsionado pelo coração e bombeiam esse sangue ao se retrair – gerando pressão arterial mesmo na diástole e mantendo o fluxo sanguíneo (HILL *et al.*, 2012).

Como as artérias são a fase inicial do transporte sanguíneo, é importante que exista uma pressão nesses vasos que seja alta o suficiente para superar a resistência ao fluxo sanguíneo, permitindo que a perfusão de órgãos e tecidos ocorra e possa ser mantida. Se a pressão arterial

for muito baixa, a perfusão dos tecidos pode ficar comprometida. Entretanto, se a mesma for muito elevada, pode ocorrer o rompimento dos vasos, formação de edemas e até mesmo algum dano nos órgãos sensíveis à hipertensão. Devido a isso, existem mecanismos responsáveis por regular e manter a pressão arterial estável (GUYTON E HALL, 2011; IRIGOYEN *et al.*, 2001; HEYMANS, 1960).

1.2 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Todos os vertebrados cujo sistema cardiovascular foi estudado até hoje apresentam mecanismos de regulação da pressão arterial, os quais mantêm essa variável em nível adequados para o desempenho das funções circulatórias. Esses mecanismos podem atuar a longo ou curto prazo, ou até mesmo de forma intermediária entre esses dois. Os sistemas baseados em receptores neurais atuam em questão de segundos. Já as ações hormonais podem levar cerca de alguns minutos para agir. Existe ainda o sistema rins-líquidos corporais, que pode levar algumas horas ou dias para atuar (GUYTON, 1991).

Os mecanismos de regulação da pressão arterial a longo prazo são mecanismos fundamentalmente ligados à volemia. Isso porque essa regulação da pressão arterial é intimamente relacionada ao balanço hidroeletrolítico do organismo. O rim é o responsável por regular a perda hídrica, e os principais controladores são os mecanismos neurais da sede e do apetite por sal. A sede é uma expressão comportamental do mecanismo de regulação volêmica. Por isso, o controle da sede e do apetite por sal feito pelo sistema nervoso central é importante para controlar a osmolaridade (equilíbrio hidrossalino) e, conseqüentemente, o controle da pressão arterial a longo prazo (GUYTON E HALL, 2011; LENT, 2002).

Em ocasiões onde a pressão arterial sobe além do normal, esse excesso de pressão faz com que os rins excretem mais água e sal, o que diminui a volemia e abaixa a pressão. O inverso também ocorre (GUYTON, 1991). O hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina também atua no equilíbrio hidrossalino e na volemia, tendo o papel específico de aumentar a expressão de canais de água (aquaporinas) no tubo contornado distal e no tubo coletor (dos rins), estimulando a reabsorção de água, o que tende a diluir o plasma e reequilibrar a osmolaridade. Além de restringir a queda de pressão advinda da perda de volume sanguíneo, o ADH também pode causar uma moderada vasoconstrição sistêmica que eleva a pressão arterial (KLABUNDE, 2011; HOLMES *et al.*, 2003; RANDALL *et al.*, 2000).

Os mecanismos de regulação com ação intermediária começam a funcionar alguns minutos após a mudança na pressão arterial e estão relacionados às ações hormonais. O sistema

renina-angiotensina-aldosterona atua quando quedas na pressão arterial ocasionam uma diminuição no fluxo sanguíneo para os rins. Esse fluxo reduzido faz com que as células justaglomerulares renais secretem renina, cuja ação enzimática é a de atuar no angiotensinogênio para formar a angiotensina II. Essa molécula tem ação vasoconstritora, constringindo as arteríolas pelo corpo, o que faz com que a pressão arterial aumente novamente (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992). Outro efeito da angiotensina II muito importante é a estimulação do córtex da adrenal para secreção de aldosterona. O efeito desse hormônio acontece no tubo contornado distal, estando envolvido com reabsorções de volume isosmótico (KLABUNDE, 2011).

Os mecanismos de modulação da pressão arterial a curto prazo estão relacionados ao sistema nervoso autônomo. A primeira e mais rápida ação para o controle da pressão é feita por barorreceptores, geralmente localizados nos vasos sanguíneos centrais do sistema circulatório. São mecanorreceptores estimulados por deformações das paredes das artérias, normalmente provocadas por mudanças na pressão - o aumento da pressão arterial estira os barorreceptores - (GUYTON E HALL, 2011; IRIGOYEN *et al.*, 2001). Estes receptores detectam variações na pressão e atuam enviando informações ao sistema nervoso central (SNC), o qual desencadeia reações autonômicas que geram mudanças na frequência cardíaca (f_H), na força contrátil do coração e na resistência vascular sistêmica causando vasodilatação ou vasoconstricção, que tendem a normalizar a pressão arterial (BAGSHAW, 1985; DAMPNEY, 1994; VAN VLIET E WEST, 1994; ALTIMIRAS *et al.*, 1998; SANDBLOM e AXELSSON, 2011; MUELLER *et al.*, 2013).

Quando os barorreceptores atuam, durante elevações da pressão arterial, os sinais são conduzidos ao sistema nervoso central pelo nervo glossofaríngeo e vago. O tônus simpático (adrenérgico) para o coração e vasos é reduzido e o parassimpático é aumentado, uma vez que os neurônios do SNC quando estimulados por aumento da pressão, acabam inibindo os neurônios pré-motores simpáticos. Ocorre, assim, redução do débito cardíaco, da frequência cardíaca (bradicardia) e queda da resistência vascular periférica (vasodilatação) que reduzem a pressão arterial. No caso de queda na pressão arterial, ocorre o aumento do débito cardíaco por meio da diminuição do tônus parassimpático (colinérgico) e aumento do tônus adrenérgico no coração e vasos, o que eleva a frequência cardíaca (taquicardia) e aumenta a resistência vascular sistêmica (vasoconstricção) para elevar a pressão (GUYTON E HALL, 2011; IRIGOYEN *et al.*, 2001). Essa resposta fisiológica é denominada barorreflexo, e a sua existência é muito importante, pois permite que ocorram compensações rápidas em momentos de hipotensão e hipertensão, prevenindo a isquemia sistêmica e danos ao sistema circulatório e tecidos

adjacentes (VAN VLIET E WEST, 1994; ALTIMIRAS *et al.*, 1998; SANDBLOM E AXELSSON, 2005).

As diferentes demandas de fluxo sanguíneo dos órgãos são controladas pela liberação de fatores vasodilatadores ou vasoconstritores. E essas alterações no fluxo sanguíneo causam mudanças na pressão arterial central, que são detectadas pelos barorreceptores. Essas variações são pequenas e ocorrem a todo momento - visto que as demandas dos órgãos e tecidos por sangue não permanecem constantes (GUYTON E HALL, 2011). Por isso pode-se dizer que o barorreflexo também está atuando a todo momento, ocasionando alterações instantâneas na frequência cardíaca que podem ser percebidas no período entre dois batimentos consecutivos do coração, e correspondem a um dos fatores causadores da variabilidade da frequência cardíaca. Essa variação na frequência cardíaca ocorre como parte da homeostase do organismo e também está relacionada com outros elementos como: mudanças relacionadas a idade; a sazonalidade; os ciclos circadianos e ultradianos e mudanças de acordo com alterações neuro-humorais (taxa de epinefrina, norepinefrina ou angiotensina II no sangue). A variabilidade também pode ser influenciada pelo quimiorreflexo e pela arritmia sinusal respiratória. (ALTIMIRAS, 1999).

1.3 BARORREFLEXO E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA RESPIRATÓRIO

Por muito tempo a relação entre a ação do barorreflexo com o sistema respiratório não foi vista com a devida importância, isso porque nos animais mais comumente estudados a existência dessa relação não parecia demonstrar vantagens fisiológicas óbvias (MCMULLAN E PILOWSKY, 2010). Entretanto, os sistemas respiratório e cardiovascular estão muito relacionados entre si, possivelmente para otimizar as trocas gasosas. (TAYLOR *et al.*, 1999). A relação entre esses sistemas deve-se à proximidade dos neurônios que controlam ambos os reflexos – localizados em posições adjacentes na porção rostral da medula (ALHEID E MCCRIMMON, 2008).

Além da função primária do barorreflexo de manter a pressão arterial estável, uma relação inversamente proporcional entre pressão arterial e as variáveis respiratórias já foi observada em mamíferos (POTTER E MCCLOSKEY, 1979; BRUNNER *et al.*, 1982; SIMMS *et al.*, 2009). Quanto aos anfíbios, um estudo recente mostrou que além dessa interação entre o barorreflexo e a ventilação, o reflexo barostático também está relacionado com o sistema linfático. Nesses animais as situações de hipertensão aumentam o extravasamento de plasma sanguíneo para os tecidos, plasma este que é drenado pelo sistema linfático e colocado novamente no sangue. Ao impedir elevações da pressão arterial, conseqüentemente o barorreflexo também impede esse

extravasamento exacerbado do plasma para os tecidos, não ocorrendo um aumento do fluxo linfático. Ou seja, em anuros, a ventilação pulmonar desempenha um importante papel na homeostasia da pressão arterial (ZENA *et al.* 2016). Há também dados que sugerem a existência dessa modulação barorreflexa da respiração em répteis crocodilianos (ALTIMIRAS *et al.*, 1998).

Dessa forma, as possíveis vantagens dessa correlação do reflexo barostático com o sistema respiratório são: 1) Um aumento da ventilação em situações de hipotensão (momento de baixo fluxo sanguíneo na superfície respiratória) pode melhorar a captação de oxigênio; 2) Uma diminuição na ventilação em situações de hipertensão pode ser importante para proteger a superfície respiratória, diminuindo a distensão e movimentação desta superfície e consequentemente evitando o rompimento dos frágeis capilares respiratórios – sem prejudicar as trocas gasosas (TAYLOR *et al.*, 1999; TAYLOR *et al.* 2010); e 3) Auxílio na drenagem do plasma sanguíneo que extravasa para os pulmões, pois este deve ser removido dos tecidos pulmonares via linfa e a pressão arterial está diretamente relacionada ao nível de extravasamento do plasma para os tecidos (ZENA *et al.* 2016).

Apesar de já ter sido observada nos grupos de vertebrados terrestres supracitados, a correlação entre o barorreflexo e a ventilação nunca foi estudada em peixes, embora a existência da mesma já tenha sido especulada neste grupo por conta da considerável conservação evolutiva das redes neurais que coordenam a ritmicidade e as interações do sistema cardiorrespiratório (TAYLOR *et al.* 2010; NILSSON, 2011; TAYLOR *et al.*, 2014).

Estudos já mostraram que as respostas cardíacas à hipóxia ambiental em elasmobrânquios e teleósteos envolvem situações de bradicardia instantânea e também um aumento no volume sistólico (NILSSON E SUNDIN, 1998). O nível de bradicardia varia com o grau de hipóxia, com a temperatura e também entre as espécies dos peixes. Essa bradicardia hipóxica foi selecionada nos peixes, pois provavelmente permite que seus corações batam com mais força e, ao mesmo tempo, aumenta o enchimento cardíaco e consequentemente o volume sistólico devido ao maior período de diástole (FARRELL, 2007).

Ainda segundo este autor, um maior volume sistólico pode recrutar mais lamelas branquiais, melhorando as trocas gasosas. Entretanto, apesar dessas prováveis associações para a melhora das trocas gasosas, uma possível ação regulatória do barorreflexo na ventilação ainda não foi estudada. A provável significância fisiológica da correlação em questão no aumento da captação de oxigênio durante situações de hipotensão poderia ser determinante na resistência de diversas espécies de teleósteos às mudanças climáticas, visto que o aumento da temperatura nos corpos d'água reduz a solubilidade do oxigênio neste meio (PÖRTNER, 2001) e também provoca vasodilatação sistêmica nos animais levando a hipotensão (podendo engatilhar uma

redução no fluxo sanguíneo na superfície respiratória e, conseqüentemente as trocas gasosas). Neste contexto, a presente proposta visou investigar a existência da correlação barorreflexo-ventilação em uma espécie de teleósteo com respiração exclusivamente aquática, a tilápia-do-nylo (*O. niloticus*).

1.4 MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

A tilápia-do-nylo (Fig. 2) é um teleósteo originário do Rio Nilo com grande potencial invasor, já estando disseminada em diversos países das regiões tropicais e subtropicais (PAVANELLI *et al.*, 2013). Devido a sua presença em diversas regiões e habitats, esse animal acabou se tornando importante pra piscicultura e para estudos envolvendo comportamento, reprodução e fisiologia (visto que esses peixes são capazes de se adaptar e se reproduzir com facilidade). Estudos sobre a fisiologia cardiorrespiratória desses animais já demonstraram que os mesmos são extremamente resistentes a situações de hipóxia ambiental (FERNANDES E RANTIN, 1989; ISHIBASHI *et al.*, 2002; DELANEY E KLESIUS, 2004; ZERAIK *et al.* 2013), bem como apresentam padrões respiratórios mais constantes, diferentemente de outras espécies de teleósteos que apresentam diversos padrões respiratórios episódicos que prejudicariam a verificação da presença dessa correlação barorreflexo-ventilação – como o tambaqui (REID *et al.*, 2003).

A resistência desse peixe a hipóxia e seu padrão de respiração constante, junto ao fato de que já existem técnicas que permitem a observação da pressão arterial/frequência cardíaca nesta espécie (a tilápia-do-nylo é passível de ter a artéria branquial canulada), o tornam um modelo experimental adequado para o estudo em questão. Além disso, como uma das prováveis significâncias fisiológicas da existência da correlação estudada está relacionada ao aumento da captação de oxigênio durante situações de hipotensão, o fato do animal em questão possuir respiração exclusivamente aquática é um fator necessário, isso porque nesse caso não há outros meios que poderiam suprir essa demanda respiratória – o que pode ocorrer em espécies de respiração aérea facultativa, por exemplo.

Figura 2. Fotografia de um exemplar adulto de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*. Fonte: <GNU – General Public Licence>.



2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a função barorreflexa e a interação entre a respiração e a função cardiovascular em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), de forma a verificar pela primeira vez se a correlação barorreflexo-ventilação ocorre em um teleósteo de respiração exclusivamente aquática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar quais as ações induzidas pela administração do agente vasoconstritor cloridrato de fenilefrina e do vasodilatador nitroprussiato de sódio nas variáveis cardíacas e, a partir disso, traçar uma curva sigmoidal do reflexo barostático.
- b) Coletar as variáveis ventilatórias e traçar correlações entre as mesmas e a pressão arterial (regressões lineares).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OS ANIMAIS

Foram utilizados 13 espécimes de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) de ambos os sexos, com massa de $204,88 \pm 20,57$ gramas, provenientes do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). Os animais passaram por um período de aclimação mínimo de um mês em um tanque de 500 litros sob fotoperíodo natural, abastecido com água sem cloro, normóxica (pressão parcial de oxigênio de aproximadamente 140 mmHg, mantida por aeração constante) e com temperatura que alternava entre 20°C e 30°C. A água do tanque foi substituída a cada 72 horas.

Os animais foram alimentados até a saciedade em dias alternados com ração comercial para peixes, exceto nas 72 horas que antecederam a realização dos experimentos, evitando assim possíveis eliminações de fezes na câmara experimental, e também impedindo a ocorrência de alterações metabólicas decorrentes da digestão. A presente pesquisa foi realizada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), no câmpus de São José do Rio Preto, mais especificamente no Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados do Departamento de Zoologia e Botânica. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição supracitada (CEUA 167/2017).

3.2 PROCEDIMENTOS PRÉ-EXPERIMENTAIS

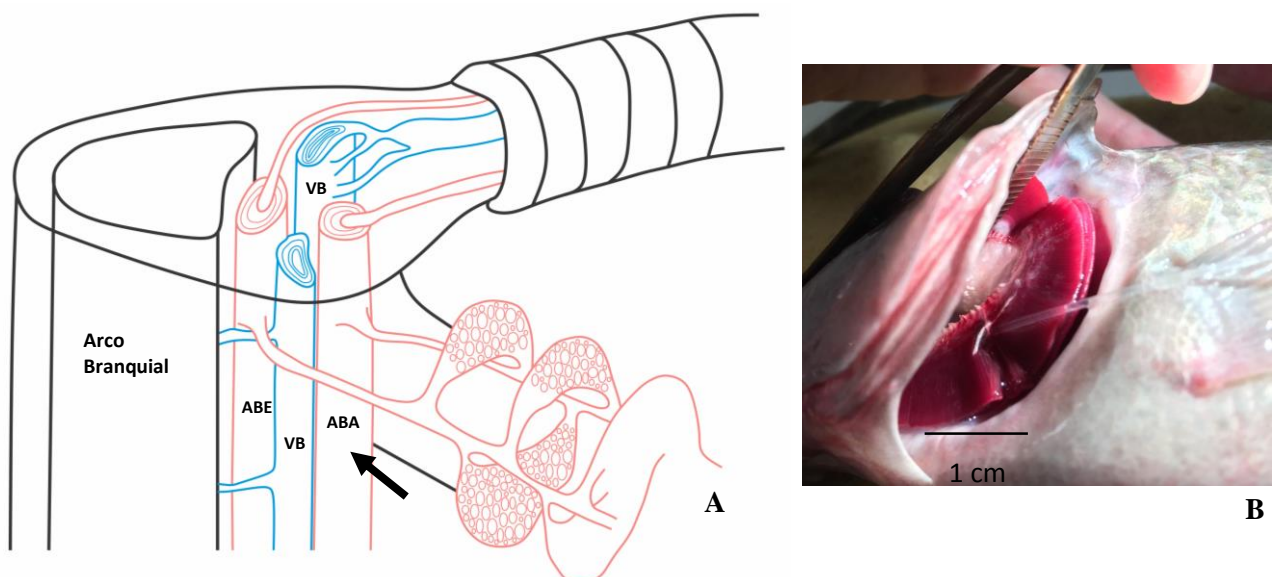
Para indução anestésica, os peixes foram submersos em solução aquosa de benzocaína (100 mg.l^{-1}) até apresentarem perda de equilíbrio e ausência de movimentos operculares. Logo após, eles foram transferidos para uma mesa cirúrgica (Fig. 3) com um sistema de recirculação de solução de benzocaína (50 mg.l^{-1}) aerada, a qual irrigava as brânquias dos animais constantemente para manter a anestesia e as trocas gasosas dos indivíduos.

Figura 3. Mesa cirúrgica com sistema de recirculação de água e benzocaína. Fonte: elaborada pela autora.



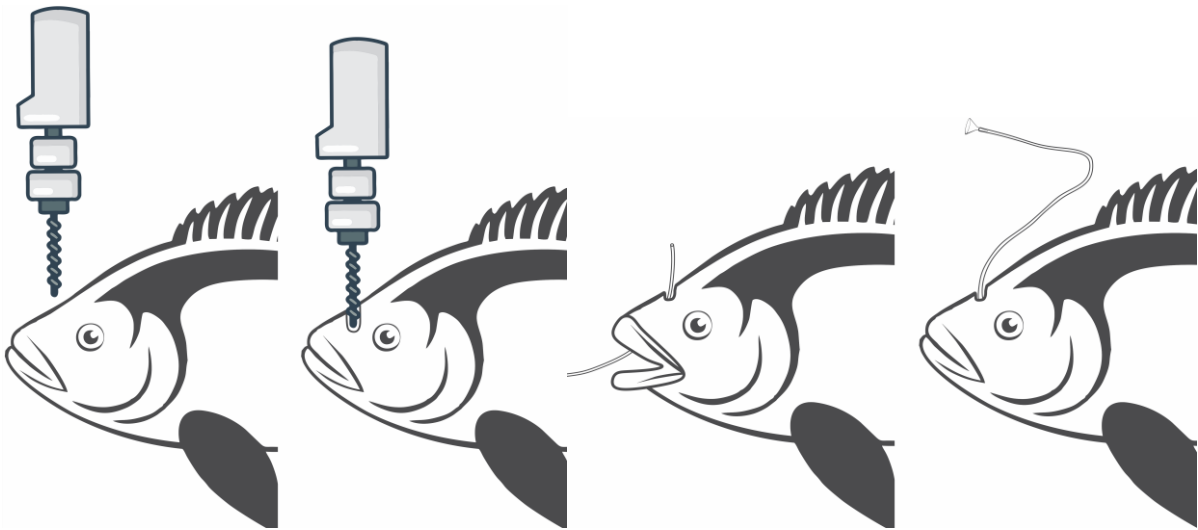
Para possibilitar tanto administrações farmacológicas quanto a aferição da pressão arterial na aorta ventral (P_{VA}) dos animais, uma cânula de polietileno (PE20) foi inserida na artéria aferente do terceiro arco branquial (Fig. 4A e 4B) dos mesmos e avançada até a aorta ventral de acordo com o descrito por Sundin *et al.* (2000) – tal cânula estava preenchida com solução salina isotônica heparinizada ($100 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$) e foi fixada aos arcos branquiais dos indivíduos por meio de uma flange e um nó dado com linha de algodão para evitar a remoção da mesma.

Figura 4. A: Esquema simplificado da vasculatura branquial. A seta indica a artéria branquial aferente (ABA) onde ocorre a inserção da cânula. B: cânula inserida na ABA do terceiro arco branquial. ABE: Artéria branquial eferente; ABA: Artéria branquial aferente; VB: Veia branquial. Fonte: elaborada pela autora, modificada de NILSSON E SUNDIN, 1998.



Com o auxílio de uma broca, a região dorsal do palato (entre as narinas) foi perfurada para a introdução de uma cânula de polietileno na cavidade bucal (Fig. 5). A cânula foi fixada por meio de uma flange (trava). Essa cânula foi utilizada para analisar a frequência respiratória (f_R), a amplitude ventilatória (V_{AMP}) dos animais e ventilação total (V_T) – produto da f_R por V_{AMP} (ZERAİK *et al.* 2013).

Figura 5. Esquema mostrando a inserção da cânula bucal por meio de uma perfuração entre as narinas do animal. Fonte: elaborada pela autora.



Ao findar dos procedimentos supracitados (Fig. 6), as brânquias dos animais foram irrigadas com água sem anestésico até o reaparecimento dos reflexos operculares, e os mesmos foram transferidos para câmaras experimentais individuais com volume de aproximadamente 25 litros (20 cm × 50 cm × 20 cm) – com água sem cloro, normóxica (aerada ininterruptamente, com pressão parcial de oxigênio de 140 mmHg) e temperatura de 25°C ± 0,125 (mantida por meio de aquecedor com termostato).

Figura 6. Finalização da instrumentação. A: Cânula inserida na artéria branquial aferente. B: cânula bucal implantada entre as narinas. Fonte: elaborada pela autora.



Em seguida, a cânula arterial inserida na artéria branquial aferente (ABA) dos peixes foi conectada a um transdutor de pressão (PX600, Baxter Edwards, Irvine, CA, EUA) ligado a um sistema de aquisição de dados BIOPAC MP100 (BIOPAC Systems, Goleta, CA, EUA), o qual permitiu a aquisição contínua da pressão arterial dos mesmos – que foi coletada a uma taxa de amostragem de 1000 Hz. A frequência cardíaca (f_H) dos animais também foi continuamente adquirida, derivando-a do sinal pulsátil da pressão arterial. O transdutor de pressão foi calibrado diariamente e ficou posicionado na mesma altura da superfície da água a todo o momento. A cânula bucal foi conectada a um outro transdutor de pressão, o qual estava conectado a um segundo canal do mesmo sistema de aquisição de dados e o sinal também foi registrado continuamente pelo software citado acima. Isso permitiu o monitoramento da variação da pressão intra-bucal, e desta forma os valores de f_R , V_{AMP} e V_T foram obtidos pela contagem dos picos da pressão bucal (f_R ; em resp.min^{-1}), da mensuração da amplitude das ondas de pressão bucal (V_{AMP} ; em cmH_2O), e pela multiplicação da f_R pela V_{AMP} (V_T ; $f_R \times V_{AMP}$) respectivamente. Logo após o término dos procedimentos pré-experimentais, os animais passaram por um período de recuperação pós-cirúrgica de 24 horas anteriormente ao início dos experimentos.

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Todas as variáveis (P_{VA} , f_H , f_R , V_{AMP} e V_T) de oito animais foram coletadas por uma hora para se estabelecer os valores controle do experimento para posterior determinação da correlação entre a P_{VA} e a f_H , a P_{VA} e a f_R , a P_{VA} e a V_{AMP} e a P_{VA} e a V_T .

Depois da aquisição dos dados controle, administrações seriadas e crescentes do agente vasoconstritor cloridrato de fenilefrina (Sigma-Aldrich; 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), e do agente vasodilatador nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich; 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), foram realizadas *in bolus* via cânula arterial branquial, sem interrupção da aquisição dos dados. Os fármacos foram preparados pouco antes da infusão a uma diluição de 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de solução salina isotônica, e o volume das injeções ficaram entre 0,025 ml e 0,2 ml considerando um animal de ~200 gramas – lembrando que cada administração foi seguida de um “flush” de 0,2 ml de solução salina isotônica para que os fármacos não permanecessem estagnados no interior da cânula. Antes de cada nova administração, foi aguardado até que as variáveis fisiológicas dos animais retornassem aos valores dos dados controle – entre 15 a 20 minutos. Ao final, para quatro desses animais foi realizada a administração de um volume de solução salina correspondente ao maior volume de fármaco injetado, para verificar se as administrações farmacológicas *per se* não induziram alterações nas variáveis estudadas.

Após a coleta dos dados, os valores controle das variáveis estudadas e os valores obtidos nas respostas máximas às administrações farmacológicas foram inicialmente comparados de forma direta via estatística inferencial. Posteriormente, curvas de correlação foram traçadas entre a P_{VA} e a f_H , entre a P_{VA} e a f_R , entre a P_{VA} e a V_{AMP} e entre a P_{VA} e a V_T – onde a P_A dos animais foi representada em relação a sua respectiva f_H , f_R , V_{AMP} e V_T . Estudos anteriores demonstraram que a correlação P_{VA}/f_H se ajusta como uma função logística sigmoide (HEDRICK *et al.* 2015), e que as correlações P_A/f_R , P_{VA}/V_{AMP} e P_{VA}/V_T se ajustam como uma função linear (ZENA *et al.* 2016).

Com o uso do software GraphPad Prism v6.0, foi construído um gráfico, onde a P_{VA} foi representada em relação à sua respectiva f_H – utilizando-se os valores controle e as respostas máximas de cada administração farmacológica. Estes dados foram ajustados a uma função logística sigmoide de quatro variáveis, de acordo com a equação abaixo. E a função barorreflexa e todos os animais foi investigada por meio da análise da curva sigmoidal do reflexo barostático.

$$f_H = \frac{(\text{MÁX} - \text{MÍN})}{(1 + (P_A/C)^B)} + \text{MÍN}$$

f_H – Frequência cardíaca representada no eixo das ordenadas;

MÁX – f_H máxima alcançada pelo barorreflexo;

MÍN – f_H mínima alcançada pelo barorreflexo;

Pa – P_{VA} ;

C – P_{VA} quando a f_H está no ponto intermediário na curva;

B – Coeficiente de inclinação da porção linear da curva.

O valor absoluto do ganho barorreflexo, quando a P_{VA} é igual a C, foi calculado, para cada animal, por meio da seguinte equação:

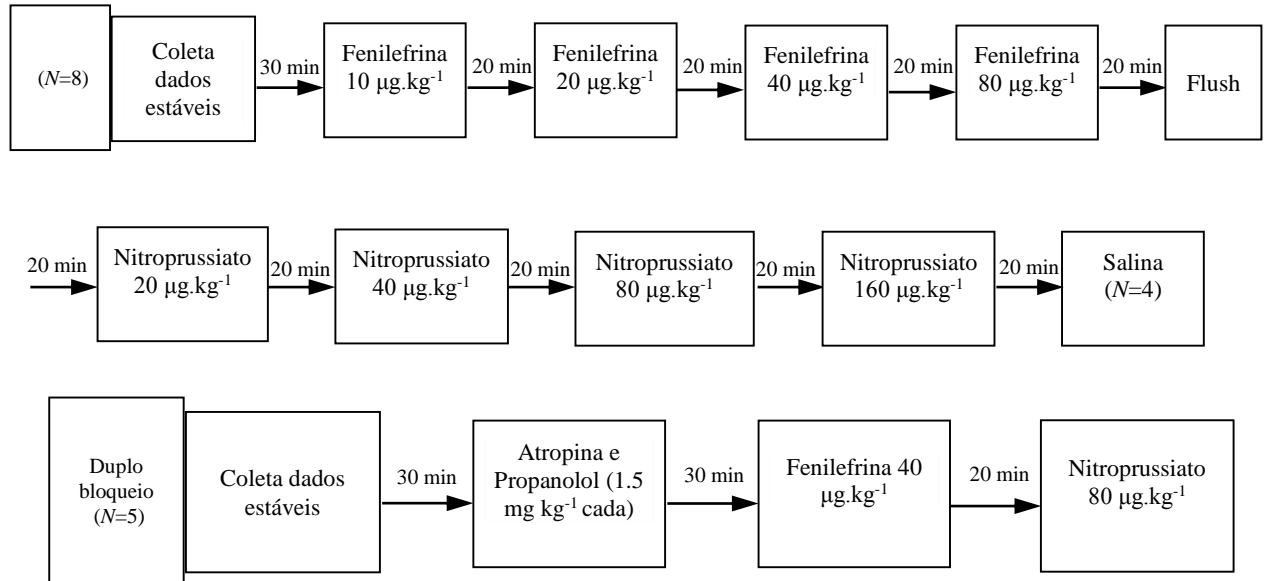
$$Ganho_{50} = \left| \frac{-B (MÁX - MÍN)}{4C} \right|$$

Posteriormente, curvas de correlação entre as variáveis cardiorrespiratórias e o efeito dos fármacos também foram traçadas. As correlações P_{VA}/f_R , P_{VA}/V_{AMP} e P_{VA}/V_T foram traçadas ajustadas a uma função linear como descrito por Zena *et al.* (2016).

Em outros cinco animais as mesmas variáveis (P_{VA} , f_H , f_R , V_{AMP} e V_T) foram coletadas por meia hora de dados em estabilidade. E, após isso, foi realizado um duplo bloqueio autonômico com a aplicação de atropina (1.5 mg kg^{-1}), um antagonista muscarínico que age nas terminações nervosas parassimpáticas (PAPPANO, 2009), inibindo-as, e propranolol (1.5 mg kg^{-1}), um agente bloqueador de receptores beta-adrenérgicos que inibe o tônus simpático (BIAGGIONI E ROBERTSON, 2009). As doses de ambos os fármacos foram baseadas e adaptadas de McKenzie *et al.* (2007) e Teixeira *et al.* (2015). Os dados então foram coletados por mais meia hora para que o bloqueio se estabeleça por completo e em seguida, as variáveis foram coletadas por mais 30 minutos de dados estáveis para se estabelecer os valores controle desse novo período.

Depois da aquisição dos dados controle, administrações correspondentes a terceira dose do agente vasoconstritor cloridrato de fenilefrina ($40 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), e do agente vasodilatador nitroprussiato de sódio ($80 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), foram realizadas *in bolus* via cânula arterial branquial. Os mesmos procedimentos supracitados para a preparação do fármaco e aplicação dos mesmos foi realizado para essas novas infusões. Todo o delineamento experimental encontra-se resumido no esquema abaixo (Fig. 7):

Figura 7. Representação esquemática demonstrando os grupos experimentais, o número de réplicas em cada grupo (N) e a ordem do protocolo experimental com os tempos aproximados entre as aplicações. Fonte: elaborada pela autora.



3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

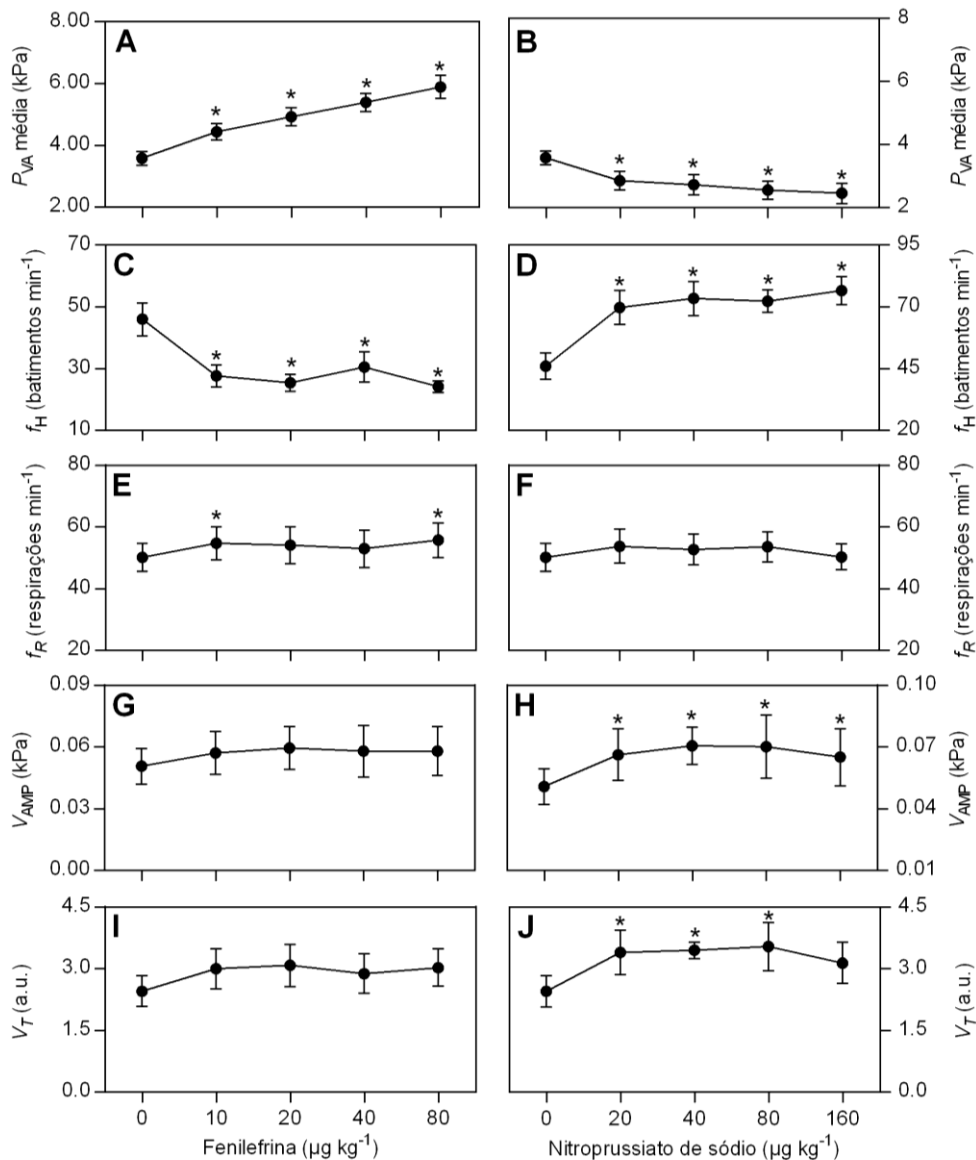
Para oito animais as comparações diretas entre as variáveis observadas em todos os tratamentos foram realizadas por meio de um ANOVA one-way para medidas repetidas seguido do *post-hoc* de Dunnet (adoção de $P \leq 0,05$). As correlações ajustadas à função logística sigmoide foram analisadas por meio das equações e coeficientes de correlação de Kent, enquanto as correlações ajustadas à função linear foram analisadas via regressão linear e coeficiente de correlação de Pearson. A parametricidade dos dados foi avaliada via teste de Shapiro-Wilk (adoção de $P \geq 0,1$). Os dados foram expressos em média \pm EPM. Os períodos anterior e posterior à administração da solução salina ($N=4$) também tiveram sua parametricidade verificada por um teste de Shapiro-Wilk, e foram comparados por meio de um Teste t Pareado Bicaudal.

Os dados dos animais ($N=5$) que passaram pelo duplo bloqueio autonômico também tiveram sua parametricidade avaliada por um teste de Shapiro-Wilk (adoção de $P \geq 0,1$). Os períodos anterior (controle) e posteriores à administração dos fármacos cloridrato de fenilefrina e nitroprussiato de sódio também foram comparados por meio de um Teste t Pareado Bicaudal. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os softwares comerciais GraphPad Prism 6.0 e GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software Inc.).

4. RESULTADOS

A figura 8 mostra os efeitos da ação da fenilefrina e do nitroprussiato de sódio em todas as variáveis coletadas. Os picos de resposta dos fármacos foram comparados com o período controle para ver se os mesmos causavam alguma diferença significativa ($P \leq 0.05$). Assim como esperado, todos os picos de resposta dos fármacos possuem ação significativa nas variáveis cardiovasculares. Contudo, para as variáveis respiratórias, só foi observada diferença significativa para a f_R na primeira e na última dose da fenilefrina, para a V_{AMP} em todas as doses do nitroprussiato de sódio e para a V_T nas três primeiras aplicações do nitroprussiato de sódio.

Figura 8. Efeito da fenilefrina e do nitroprussiato de sódio nas variáveis cardiorrespiratórias de *O. niloticus*. Pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média) (A, B), frequência cardíaca (f_H) (C, D), frequência respiratória (f_R) (E, F), amplitude ventilatória (V_{AMP}) (G, H), ventilação total (V_T) (I, J) dos animais ($N=8$) durante o período controle e durante os picos de resposta para as administrações de fenilefrina (10, 20, 40, 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e nitroprussiato de sódio (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Todos os valores estão expressos em média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma diferença significativa entre a variável observada e o período controle ($P \leq 0.05$). Fonte: elaborada pela autora.



Os gráficos abaixo (Fig. 9) mostram as curvas sigmoides individuais (A) e a curva sigmoide média de todos os animais do reflexo barostático (B), onde a P_{VA} (contida no eixo das abscissas) está representada em relação à sua respectiva f_H (contida no eixo das ordenadas). Pela figura 8B é possível ver que o círculo preto corresponde ao ponto referente ao período controle (onde $P_{VA} = 3,58 \pm 0,22$ kpa e $f_H = 46,01 \pm 5,30$ bpm) e que os 8 círculos cinzas são relativos aos picos máximos de ação dos dois fármacos, fenilefrina e nitroprussiato de sódio, que agiram causando os imbalanços pressóricos que refletiram na sigmoide. Também é possível observar por meio desses gráficos como o barorreflexo estabelece a relação inversamente proporcional entre a P_{VA} e a f_H . Os dados utilizados nas equações para conseguir formar as sigmoides estão apresentados na tabela 2. Nessa tabela também está presente o valor referente a capacidade de atuação do barorreflexo ($MAX - MIN$) e o valor absoluto do ganho barorreflexo (G_{50}).

Figura 9. Curvas sigmoidais barorreflexas de *Oreochromis niloticus*. A: Representação das sigmoides individuais dos 8 animais. B: Curva sigmoide barorreflexa construída usando os valores da média das pressões arteriais na aorta ventral (P_{VA} média) e da média das frequências cardíacas (f_H) dos animais ($N=8$) durante o período controle (círculo preto) e durante os picos das respostas cardiovasculares para as administrações de fenilefrina (10, 20, 40, 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e nitroprussiato de sódio (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (círculos cinzas). Valores expressos em média \pm EPM. Fonte: elaborada pela autora.

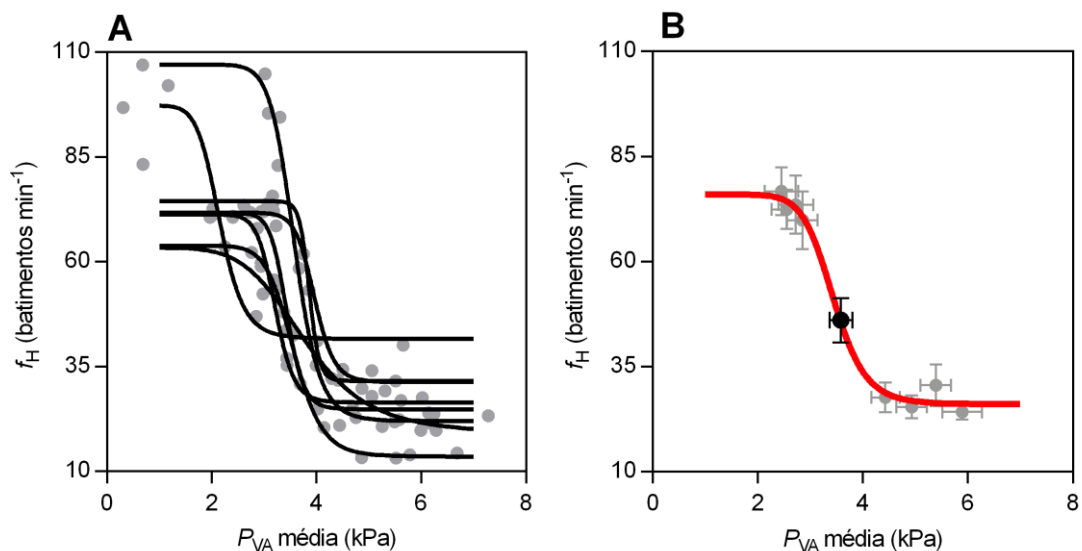


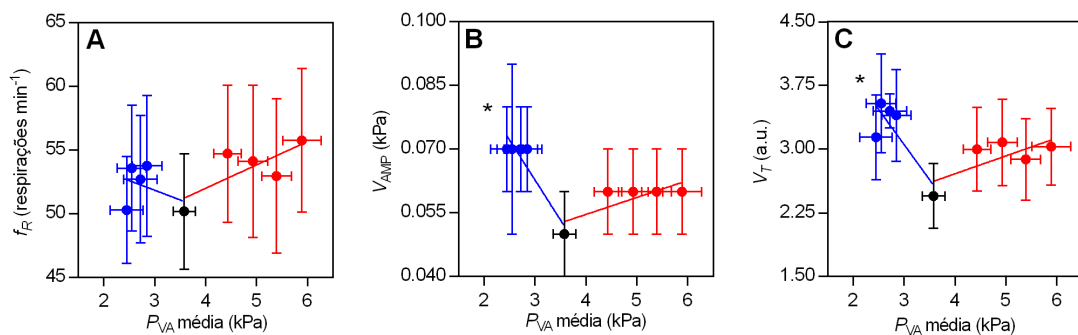
Tabela 2. Variáveis cardiovasculares e barorreflexas no período controle de *O. niloticus* ($N=8$). As variáveis barorreflexas derivaram da curva sigmoideal barorreflexa gerada depois da administração das diferentes doses de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio.

| | |
|--|-------------------|
| Período controle P_{VA} média (kPa) | $3,58 \pm 0,22$ |
| Período controle f_H (batimentos min^{-1}) | $46,01 \pm 5,30$ |
| Máxima f_H (batimentos min^{-1}) (MAX) | $77,52 \pm 5,59$ |
| Mínima f_H (batimentos min^{-1}) (MIN) | $26,28 \pm 3,05$ |
| Alcance médio da f_H (batimentos min^{-1}) | $51,24 \pm 5,07$ |
| R^2 | $0,97 \pm 0,01$ |
| Slope (batimentos $\text{min}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) (B) | $18,24 \pm 3,76$ |
| Média da P_{VA-50} (kPa) (C) | $3,45 \pm 0,20$ |
| G_{50} (batimentos $\text{min}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) | $64,98 \pm 10,09$ |

P_{VA} média, pressão arterial média na aorta ventral; f_H , frequência cardíaca; R^2 , coeficiente de correlação; Slope, coeficiente máximo de inclinação da porção linear da curva sigmoideal; Média da P_{VA-50} , pressão arterial média na aorta ventral quando a frequência cardíaca está no ponto intermediário da curva; G_{50} , máximo ganho barorreflexo. Valores expressos em média \pm EPM.

Na figura 10 encontram-se expostas as regressões lineares feitas entre a P_{VA} e todas as variáveis respiratórias (f_R , V_{AMP} e V_T). O ponto referente ao período controle está representado em preto e os 8 picos máximos de ação dos dois fármacos, fenilefrina e nitroprussiato de sódio, estão representados em vermelho e azul, respectivamente. Pelo gráfico é possível observar que essas variáveis não estabelecem uma relação inversamente proporcional com a pressão arterial dos animais, visto que nenhuma das variáveis apresentou alguma mudança significativa frente à administração de fenilefrina. A aplicação de nitroprussiato de sódio também não mostrou ação significativa para a f_R , contudo este fármaco produziu um efeito significativo nas demais variáveis (V_{AMP} e V_T). Os dados usados para montar as regressões lineares presentes nesses gráficos estão apresentados na tabela 3.

Figura 10. Regressões lineares entre a pressão arterial média na aorta ventral e as variáveis ventilatórias de *Oreochromis niloticus*. Regressão linear entre os animais ($N=8$), pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média) e frequência respiratória (f_R) (A), amplitude ventilatória (V_{AMP}) (B) e ventilação total (V_T) (C). Os valores observados durante o período controle estão representados pelos círculos pretos; os valores observados durante os picos da resposta da fenilefrina estão representados pelos círculos vermelhos; e os valores observados durante os picos da resposta do nitroprussiato de sódio estão representados pelos círculos azuis. Valores expressos em média \pm EPM. Os asteriscos indicam que o slope é significativamente diferente de zero ($P \leq 0.05$). Fonte: elaborada pela autora.



Enquanto a figura 10 apresenta o efeito das aplicações dos fármacos nas variáveis médias de todos os animais, na figura 11 é possível ver o efeito das administrações farmacológicas para cada indivíduo. Encontram-se expostas relações entre a P_{VA} e todas as variáveis respiratórias (f_R , V_{AMP} e V_T). O ponto referente ao período controle está representado em vermelho e os picos basais e máximos de ação dos dois fármacos para cada indivíduo estão representados em cinza. Ao observar B e C, é possível ver que, ao contrário dos demais, um dos animais não tem qualquer alteração nas variáveis respiratórias.

Figura 11. Efeitos individuais das alterações na pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média), frequência respiratória (f_R) (A), amplitude ventilatória (V_{AMP}) (B) e ventilação total (V_T) (C). Cada animal está representado por um símbolo distinto ($N=8$). Os símbolos cinzas representam as variáveis basais e as respostas máximas à cada administração farmacológica de todos os indivíduos (valores absolutos). Os símbolos vermelhos representam as variáveis basais médias dos animais (média \pm EPM). Fonte: elaborado pela autora.

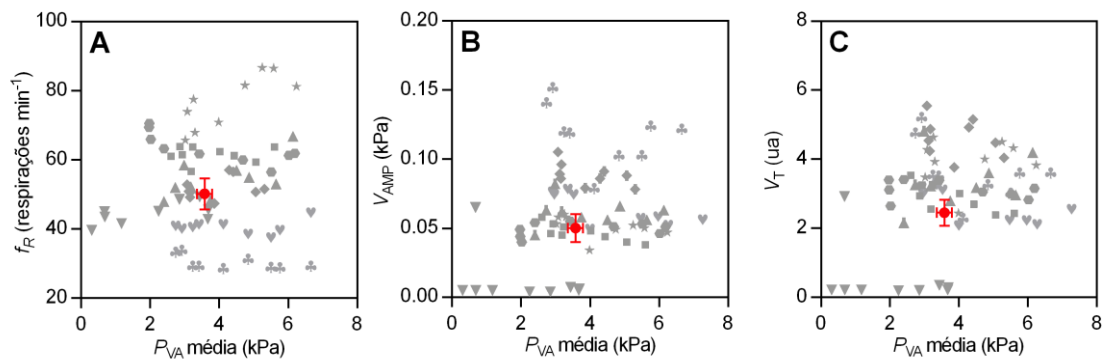


Tabela 3. Análises do slope e do coeficiente de regressão linear para a relação entre P_{VA} média e as variáveis respiratórias geradas depois da administração das diferentes doses de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio em *O. niloticus* ($N=8$).

| | Fenilefrina | Nitroprussiato de Sódio |
|--|-------------------|-------------------------|
| f_R slope (respirações min^{-1} kPa^{-1}) | $1,56 \pm 0,87$ | $-1,65 \pm 0,98$ |
| $f_R R^2$ | $0,21 \pm 0,09$ | $0,36 \pm 0,11$ |
| V_{AMP} slope (kPa kPa^{-1}) | $0,002 \pm 0,002$ | $-0,015 \pm 0,007 *$ |
| $V_{AMP} R^2$ | $0,42 \pm 0,10$ | $0,49 \pm 0,11$ |
| V_T slope (a.u. kPa^{-1}) | $0,17 \pm 0,10$ | $-0,85 \pm 0,30 *$ |
| $V_T R^2$ | $0,41 \pm 0,08$ | $0,40 \pm 0,11$ |

f_R , Frequência respiratória; V_{AMP} , Amplitude ventilatória; V_T , Ventilação total; R^2 , coeficiente de correlação; Slope, coeficiente de inclinação. Valores expressos em média \pm EPM. Os asteriscos indicam que o slope é significativamente diferente de zero ($P \leq 0.05$).

A tabela 4 mostra uma comparação entre o período controle e a aplicação da solução salina. Um teste t pareado bicaudal ($P \leq 0.05$) revelou que não existe alteração estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis.

Tabela 4. Pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média), Frequência cardíaca (f_H) Frequência respiratória (f_R), Amplitude ventilatória (V_{AMP}), Ventilação total (V_T) antes e depois da aplicação da solução salina (0.9% NaCl) em *O. niloticus* ($N=4$).

| | Pré-Salina | Pós-Salina |
|--|-------------------|-------------------|
| P_{VA} média (kPa) | 3,16 ± 0,32 | 3,46 ± 0,29 |
| f_H (batimentos min⁻¹) | 54,51 ± 6,08 | 51,47 ± 5,09 |
| f_R (respirações min⁻¹) | 52,97 ± 3,81 | 53,21 ± 3,28 |
| V_{AMP} (kPa) | 0,05 ± 0,004 | 0,05 ± 0,002 |
| V_T (a.u.) | 2,67 ± 0,30 | 2,76 ± 0,07 |

Valores expressos em média ± EPM. Nenhuma diferença significativa foi detectada antes e depois da aplicação da salina.

Na tabela 5 é possível ver a ação do duplo bloqueio autonômico nos animais. Como os fármacos envolvidos inibem a ação das duas subdivisões do sistema nervoso autônomo, as aplicações do cloridrato de fenilefrina e do nitroprussiato de sódio modificam a pressão arterial, mas não provocam uma resposta barorreflexa na frequência cardíaca, que se mantém inalterada. As variáveis respiratórias também não apresentam nenhuma mudança significativa após as infusões dos agentes vasoconstritor e vasodilatador.

Tabela 5. Efeito da fenilefrina (40 µg kg⁻¹) e do nitroprussiato de sódio (80 µg kg⁻¹) na Pressão arterial média na aorta ventral (P_{VA} média), Frequência cardíaca (f_H) Frequência respiratória (f_R), Amplitude ventilatória (V_{AMP}), Ventilação total (V_T) em *O. niloticus* sob o efeito do duplo bloqueio autonômico com atropina (1.5 mg kg⁻¹) e propranolol (1.5 mg kg⁻¹) ($N=5$). DB: Duplo bloqueio.

| | Antes do DB | DB estabelecido | Após fenilefrina | Após nitroprussiato de sódio |
|--|--------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| P_{VA} média (kPa) | 3,50 ± 0,25 | 4,39 ± 0,45 | 6,22 ± 0,67 * | 3,85 ± 0,50 * |
| f_H (batimentos min⁻¹) | 51,46 ± 7,90 | 74,90 ± 3,25 | 74,99 ± 2,72 | 75,07 ± 2,51 |
| f_R (respirações min⁻¹) | 61,41 ± 2,06 | 66,39 ± 3,11 | 65,96 ± 4,89 | 64,54 ± 4,03 |
| V_{AMP} (kPa) | 0,08 ± 0,01 | 0,17 ± 0,04 | 0,16 ± 0,04 | 0,16 ± 0,03 |
| V_T (a.u.) | 4,84 ± 0,82 | 11,35 ± 2,68 | 11,01 ± 2,78 | 10,60 ± 2,25 |

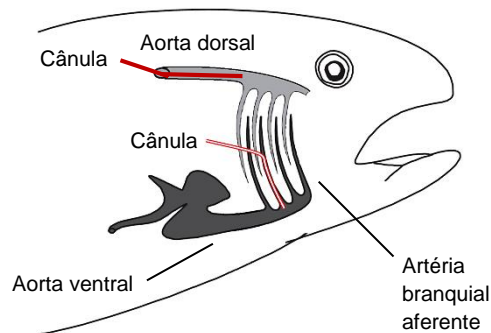
Valores expressos em média ± EPM. Os asteriscos indicam uma mudança significativa observada em relação ao período antes da administração dos fármacos ($P \leq 0.05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 CRÍTICA AOS MÉTODOS

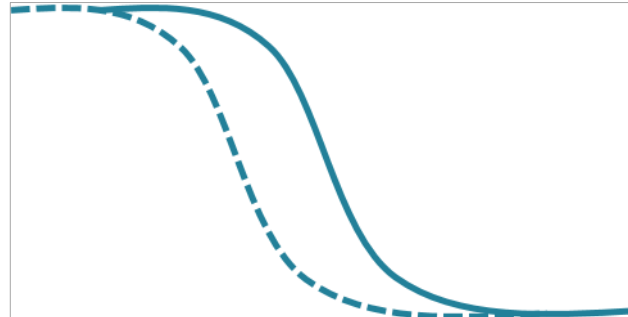
Alguns autores acreditam que o valor encontrado para a pressão arterial pode variar de acordo com a metodologia escolhida para a canulação. Para estes, a canulação da aorta ventral pode mostrar uma pressão arterial acima dos valores basais do animal, e isto é especulado devido à resistência que pode ser gerada pelas brânquias (SANDBLOM *et al.*, 2016). Nesse caso, os mesmos recomendam a canulação preferencial da aorta dorsal – onde a resistência branquial não interfere – ou de ambas as aortas (Fig. 12).

Figura 12. Localização da aorta ventral, dorsal e da artéria branquial aferente. Em vermelho é possível ver aonde fica inserida a cânula para aquisição da pressão média na aorta dorsal, e a linha rosa indica o local onde ocorre a canulação para aquisição da pressão média na aorta ventral. Fonte: Imagem modificada de SANDBLOM E AXELSSON (2005).



Seguindo essa linha de raciocínio, se a P_{VA} basal encontrada fosse correspondente a um valor acima do padrão, os valores encontrados com as infusões dos fármacos também não seriam fidedignos. A fenilefrina causaria um aumento muito maior da P_{VA} do que seria esperado se esta variável fosse coletada pela aorta dorsal. Já a aplicação do nitroprussiato de sódio provocaria apenas uma leve queda na P_{VA} , e em contrapartida a pressão arterial média na aorta dorsal (P_{DA}) teria uma queda mais acentuada sob efeito desse mesmo fármaco. Ambos os efeitos influenciariam no gráfico final, fazendo com que a sigmoide da P_{VA} fosse mais deslocada para a direita (Fig. 13).

Figura 13. Sigmoides derivadas da pressão na aorta ventral e da pressão na aorta dorsal. A linha contínua indica uma sigmoide hipotética formada a partir da coleta da pressão na aorta ventral, e a linha tracejada corresponde a sigmoide hipotética derivada da pressão na aorta dorsal. Fonte: a autora.



Entretanto, Olson e colaboradores (1997) ao coletar ambas as variáveis (P_{DA} e P_{VA}), observaram que, apesar da P_{VA} basal realmente ser mais elevada que a P_{DA} , as aplicações de nitroprussiato de sódio provocaram quedas de pressão de mesma proporção. Isso refuta a ideia de que esse vasodilatador possui uma ação reduzida quando aplicado na aorta ventral, mostrando que essa técnica pode sim ser utilizada sem trazer algum viés para o estudo. Além disso, o presente trabalho está relacionado com as variações na pressão arterial e na frequência cardíaca e dessa forma, mesmo que ocorresse um deslocamento na sigmoide conforme mostrado pela figura 13, isso não prejudicaria o objetivo aqui proposto.

Ademais, trabalhos que obtiveram as mesmas variáveis cardíacas de tetrápodes (ALTIMIRAS *et al.*, 1998; HEDRICK *et al.* 2015; ZENA *et al.*, 2015; ZENA *et al.*, 2016), também mostraram que a ação do nitroprussiato de sódio é de fato pouco notória na pressão, provocando apenas quedas leves nesta variável, sendo mais efetiva na f_H . E isso ocorre porque possivelmente os animais são mais sensíveis a hipotensão, o que torna essa ação reflexa desencadeada mais intensa. Isso demonstra, mais uma vez, que a possível “ação reduzida” do nitroprussiato na P_{VA} , seja apenas a forma de ação padrão deste fármaco e não um problema derivado da metodologia.

Outro fator levado em conta para a não obtenção da P_{DA} foi a anatomia do animal. A canulação da aorta dorsal pode ser feita a partir de um orifício pelo palato mole (AXELSSON E FRITSCHÉ, 1994), e como a tilápia-do-nilo apresenta um corpo achatado lateralmente (MORO *et al.*, 2013), o acesso a esse seria dificultado.

5.2 REGULAÇÃO BARORREFLEXA

Como observado nas imagens das curvas sigmoidais (Fig. 9), a infusão do vasoconstritor fenilefrina suscitou rapidamente uma bradicardia, ao passo que a administração do

vasodilatador nitroprussiato de sódio promoveu uma taquicardia. Essas respostas mostram a ocorrência de um aumento e de uma redução na pressão arterial, desencadeados respectivamente pela administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Isso ocorre porque o barorreflexo estabelece uma relação inversamente proporcional entre essas duas variáveis – frequência cardíaca e pressão arterial. O mesmo pode ser confirmado ao olhar a resposta dessas variáveis para cada uma das infusões de ambos os fármacos (Fig. 8).

A existência de alterações barorreflexas da ventilação em tetrápodes (POTTER E MCCLOSKEY, 1979; BRUNNER *et al.*, 1982; SIMMS *et al.*, 2009, ZENA *et al.*, 2016) indica a ocorrência de interações neurais entre os centros de controle do barorreflexo e da respiração. É possível que as aferências dos barorreceptores no núcleo do trato solitário causem um aumento ou uma diminuição da resposta respiratória - promovendo hiperpneia ou hipopneia. Entretanto, para *O. niloticus*, é improvável que essa interação barorreflexo-ventilação ocorra, dado que a mesma não pode ser observada para nenhuma das variáveis analisadas (Fig. 10).

Caso a interação existisse, diferenças significativas deveriam aparecer para todas as variáveis em resposta a ambos os fármacos. Contudo, apenas a V_{AMP} e a V_T obtiveram mudanças significativas e, dentre elas, exclusivamente relacionadas ao nitroprussiato de sódio. Na figura 10 é possível ver que essas alterações não ocorrem para a infusão de fenilefrina. Para este fármaco, o padrão de resposta das variáveis respiratórias se mantém inalterado, sendo que o esperado – se a interação ocorresse - seria uma diminuição dessas medidas e, consequentemente, uma inclinação nos pontos da curva linear relacionados as doses do agente vasoconstritor.

Não é possível dizer que as mudanças significativas nas variáveis ventilatórias sob efeito das infusões de nitroprussiato de sódio ocorreram devido a ação regulatória do barorreflexo. É difícil identificar se tais alterações na ventilação são causadas pelo agente vasodilatador *per se*, ou se são uma consequência do nitroprussiato de sódio alterar o estado de oxigenação dos animais. É mais viável pensar que a hipotensão induzida por este fármaco desencadeou uma resposta quimiorreflexa aumentando a ventilação em tilápia-do-nylo, dado que no trabalho de Porteus e colaboradores (2015) foi visto que o óxido nítrico tem um papel inibitório na ventilação de teleósteos adultos.

Além disso, o nitroprussiato de sódio pode ser metabolizado e convertido em tiocianato por meio da reação catalisada pela enzima rodonase no fígado. E este último tende a ser oxidado a cianeto nos eritrócitos (WAY, 1984). O cianeto também é um composto químico que pode desencadear algumas respostas quimiorreflexas. Trabalhos anteriores já mostraram a ação de alguns compostos com o cianeto atuando na respiração, provocando principalmente hiperpneia

por meio da elevação de alguma das variáveis ventilatórias (BERNTHAL, T., 1938; ZERAIK et. al, 2013)

A provável ação quimiorreflexa também pode ser corroborada ao observar que as alterações na ventilação não ocorreram para a f_R , visto que em casos onde os peixes precisam elevar a taxa de ventilação total, as espécies que são tolerantes a hipóxia, como *O. niloticus*, tendem a ocasionar esse aumento por meio de uma elevação da V_{AMP} ao invés da f_R (SMITH E JONES, 1982; FERNANDES E RANTIN, 1989; ZERAIK et. al, 2013).

Essa estratégia de aumentar a amplitude de ventilação e não a frequência respiratória, poderia estar relacionada a um gasto de energia menor e, conseqüentemente, uma conservação da mesma. Considerando que uma frequência maior de contração muscular tende a ser limitada pelo trabalho imposto contra a alta viscosidade da água e a alta viscosidade interna do músculo, enquanto conservar constante a velocidade de contração muscular possibilita a economia de energia (RANTIN *et al.*, 1992).

Pela figura 8 também é possível ver que as alterações envolvendo as aplicações de nitroprussiato de sódio realmente só foram significativas para V_{AMP} e V_T . E, apesar das aplicações de fenilefrina não provocarem mudanças na curva linear e indicarem uma ausência de correlação (Fig. 10), a infusão da primeira e da quarta dose desse fármaco suscitaram uma diferença no padrão da f_R (Fig. 8). Acredita-se que essas mudanças não estejam relacionadas a um controle barorreflexo – dado que as mesmas não são encontradas nas outras doses e nem para as outras variáveis – mas que possivelmente foram originadas devido a primeira aplicação frequentemente ocasionar um estresse nos peixes, que antes se encontravam em estado de repouso, e em razão da quarta dose ser composta por um volume elevado do fármaco, que comumente pode gerar um mal-estar nos animais.

Na figura 11 encontram-se expostos os efeitos provocados pela ação dos fármacos em cada indivíduo para a pressão arterial média e todas as variáveis ventilatórias. Pela imagem fica visível que, apesar dos animais apresentarem um padrão de resposta parecido, existem algumas diferenças particulares entre eles. No geral, é possível ver que a aplicação dos fármacos não provocou alterações para a frequência respiratória. E, assim como na figura 10, as únicas alterações observáveis são em relação à amplitude de ventilação e a ventilação total sob efeito do nitroprussiato de sódio – evidenciado na imagem 11 pelo aglomerado de pontos mais intenso nas porções correspondentes a ação do agente vasodilatador. Contudo, ao observar os pontos individualmente, é possível ver que mesmo neste último caso, um dos animais não manifestou nenhuma diferença significativa para as variáveis. Mais um fato que pode demonstrar a ausência da correlação barorreflexo-ventilação.

5.3 ENTENDIMENTOS QUANTO A AUSÊNCIA DA CORRELAÇÃO

A ausência da correlação barorreflexo-ventilação pode ser entendida de duas formas:

- (1) Baseado na alta conservação evolutiva das redes neurais que coordenam o sistema cardiorrespiratório dos vertebrados, a ausência dessa regulação em tilápia-do-nilo pode indicar que a mesma tenha surgido em grupos de vertebrados mais apicais do que se era especulado. Possivelmente em grupos ancestrais de tetrápodes como os Sarcopterygii;
- (2) É possível que essa regulação estivesse presente em grupos de Actinopterygii mais basais e tenha sido perdida ao longo de algumas gerações, permanecendo latente e, posteriormente, reaparecendo em grupos mais derivados – fenômeno conhecido como atavismo (HALL, 1984; DREHMER, C. J., 2006)

Estudos com Actinopterygii mais basais (esturjão – *Acipenser transmontanus*) estão sendo desenvolvidos pelo mesmo laboratório do presente estudo, para que se esclareça qual das duas possibilidades é mais viável. Também seria fundamental investigar essa possível correlação nos Dipnoi, pertencentes a subclasse Sarcopterygii, visto que as revisões mais recentes apontam os peixes pulmonados como o possível grupo irmão mais próximo dos tetrápodes – distanciando assim os celacantos. Isso coloca os Dipnoi como um grupo chave para estudos comparativos em vertebrados (NELSON *et al.* 2016).

5.4 VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS DA INJEÇÃO

Pelos resultados obtidos com a aplicação de solução salina isotônica (tabela 4) é visível que a mesma não provocou nenhuma alteração. Como o volume da solução salina foi similar ao maior volume de fármaco aplicado nos animais, isso mostra que todas as modificações observadas nas variáveis pelas figuras anteriores foram causadas realmente pelo efeito dos agentes vasoconstritor e vasodilatador e não por algum estresse ou pelo veículo do fármaco *per se*.

5.5 DUPLO BLOQUEIO AUTONÔMICO

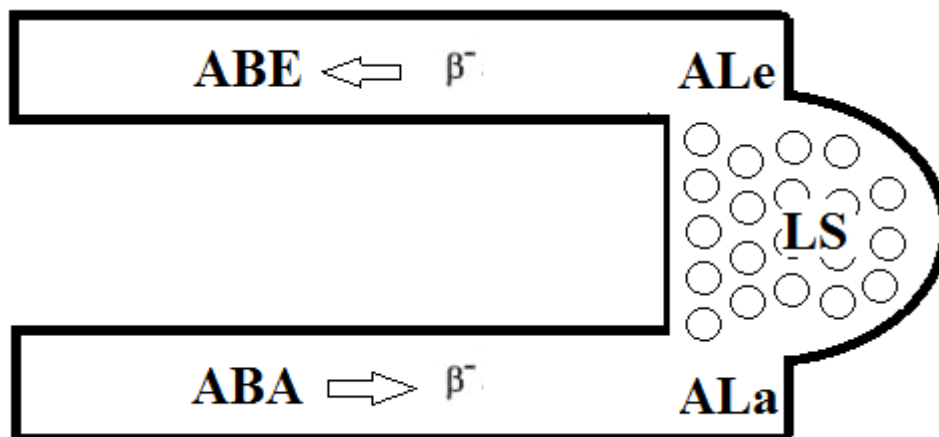
A atropina é um antagonista muscarínico que age nas terminações nervosas parassimpáticas, inibindo-as, e o propranolol é um agente bloqueador de receptores beta-adrenérgicos que inibe o tônus simpático. Por isso, a aplicação de ambos é responsável por interromper a ação do sistema nervoso autônomo, suspendendo a ação barorreflexa. Isso é observado na tabela 5 onde as aplicações dos fármacos provocam mudanças significativas na

pressão, mas não ocasionam alterações na frequência cardíaca – o que demonstra que a resposta reflexa dos barorreceptores não foi desencadeada.

Já em relação aos dados basais da ventilação, se comparados ao período anterior ao estabelecimento do duplo bloqueio, é possível ver que a amplitude ventilatória e a ventilação total se encontram aumentadas com a ação do bloqueio autonômico. Isso pode ser explicado devido ao propranolol bloquear receptores beta-adrenérgicos. Pelo trabalho de Nilsson e Sundin (1998) é possível ver que a brânquia é inervada por fibras adrenérgicas. Estas agem ocasionando uma vasodilatação, e têm ação mediada por receptores beta-adrenérgicos.

Devido a isso, as infusões de propranolol bloqueiam a ação das fibras adrenérgicas na artéria aferente, o que faz com que ocorra uma vasoconstrição neste local. Essa vasoconstrição tende a diminuir o fluxo de sangue para as arteríolas lamelares aferentes e, conseqüentemente, para as lamelas secundárias (Fig. 14), podendo prejudicar as trocas gasosas - o que explicaria o aumento das variáveis respiratórias como uma resposta compensatória.

Figura 14. Localização dos receptores beta-adrenérgicos nas artérias branquiais. ABE: Artéria branquial eferente; ABA: Artéria branquial aferente; ALe: arteríola lamelar eferente; ALa: arteríola lamelar aferente; LS: Lamela secundária. Fonte: elaborada pela autora, modificada de NILSSON E SUNDIN, 1998.



Também é possível ver que a infusão dos agentes vasoconstritor e vasodilatador não provocaram alterações significativa para nenhuma das variáveis ventilatórias obtidas. No trabalho de Zena e colaboradores (2015), em que a correlação barorreflexo-ventilação foi mostrada para *Rhinella schneideri*, os autores observaram que a ação do nitroprussiato continua produzindo efeitos significativos mesmo para os animais nos quais o duplo bloqueio autonômico foi realizado. Como no presente estudo a infusão desse fármaco não produz

alterações, isso pode ser mais um fator que corrobora com os resultados obtidos que mostram a ausência da correlação em questão.

Como os animais com o bloqueio autonômico já apresentavam uma taxa de ventilação aumentada mesmo antes das infusões dos fármacos, é possível que os mesmos tenham atingido um teto de regulação das variáveis respiratórias e por isso nenhuma resposta significativa tenha sido desencadeada nem mesmo pela ação do quimiorreflexo como visto anteriormente.

6. CONCLUSÕES

Assim como esperado, o barorreflexo estabelece uma relação inversamente proporcional entre pressão arterial e frequência cardíaca. Contudo, essa relação não é observada entre a pressão arterial e as variáveis respiratórias para a tilápia-do-nilo. As únicas mudanças observadas no padrão ventilatório ocorreram provavelmente devido a ação do quimiorreflexo. Como existe uma considerável conservação evolutiva das redes neurais que coordenam o sistema cardiorrespiratório nesses animais, o presente estudo mostra o primeiro indício de que essa correlação provavelmente tenha surgido em grupos de vertebrados mais apicais do que se era especulado, ou que tenha existido em Actinopterygii mais basais mas tenha sido perdida em algumas gerações e possivelmente reaparecido em grupos mais derivados (atavismo). Levando isso em conta, a provável ausência dessa correlação em peixes pode ser um indício de que estes animais podem estar mais propícios a sofrer com o aumento da temperatura nos corpos d'água, visto que este aumento reduz a solubilidade do oxigênio neste meio e também provoca vasodilatação sistêmica, o que leva a hipotensão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHEID, G. F., MCCRIMMON, D. R., The chemical neuroanatomy of breathing. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 164, p. 3-11, 2008.
- ALTIMIRAS, J., FRANKLIN, C. E., AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 2242, p. 2235–2242, 1998.
- ALTIMIRAS, J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 447 – 460, 1999.
- AXELSSON, M., FRITSCHÉ, R. Cannulation techniques. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v. 3, p. 17-36, 1994.
- BIAGGIONI, I, ROBERTSON, D. Adrenoceptor agonists & sympathomimetic drugs. In: _____. (Eds.). KATZUNG, B. G., MASTERS, S. B., TREVOR, A. J., **Basic and Clinical Pharmacology**. 11ª Edição. Nova York, NY: The McGraw-Hill Companies Inc, 2009.
- BAGSHAW R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60, p. 121–162, 1985.
- BERNTHAL, T. Chemo-reflex control of vascular reactions through the carotid body. **The American Journal of Physiology**. v. 121, p. 1-19, 1938.
- BRUNNER, M. J., SUSSMAN, M. S., GREENE, A. S., KALLMAN, C. H., SHOUKAS, A. A., 1982. Carotid sinus baroreceptor reflex control of respiration. **Circulation Research**, v. 51, p. 624-636, 1982.
- COWLEY, A. W. J. Long-term control of arterial blood pressure. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, 1992.
- DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**. v.74, p. 323–364, 1994.
- DELANEY, M. A., KLESIUS, P. H. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 236, p. 633–644, 2004
- DREHMER, C. J. A revision of atavisms in vertebrates. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 1, p. 72-83, 2006.
- FARRELL, A. P. Review: Tribute to P. L. Lutz: a message from the heart – why hypoxic bradycardia in fishes? **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 1715-1725, 2007.
- FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **Journal of Fish Biology**, v. 35, p. 509-519, 1989.

GUYTON, A. C. Blood pressure control - special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, p. 1813-1816, 1991.

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

HALL, B. K. Developmental mechanisms underlying the formation of atavisms. **Biological Reviews**, v. 59 p. 89-124, 1984.

HEDRICK, M. S., MCNEW, K. A., CROSSLEY, D. A. II. Baroreflex function in anurans from different environments. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 179, p. 144-148, 2015.

HEYMANS, C. Reflexogenic Areas of the Cardiovascular System. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 3, p. 409-417, 1960.

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

HOLMES, C. L., LANDRY, D. W., GRANTON, J. T. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1 – receptor physiology. **Critical Care Biomed Central**, v. 7, p. 427-434, 2003.

IRIGOYEN, M. C., CONSOLIM-COLOMBO, F. M., KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.

ISHIBASHI, Y., EKAWA, H., HIRATA, H., KUMAI, H. Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. **Fisheries Science**, v. 68, p. 1374-1383, 2002.

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

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

MAGDER, S. The meaning of blood pressure. **Critical Care**. v. 22, p. 257-267, 2018.

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, *Hoplerhythrinus unitaeniatus*. **Journal of Experimental Biology** v. 210, p. 4224–4232, 2007.

MCMULLAN, S., PILOWSKY, P. M. The effects of baroreceptor stimulation on central respiratory drive: A review. **Respiratory Physiology & Neurobiology** v. 174, p. 37–42, 2010.

MORO, G. V., RODRIGUES, A. P. O., TORATI, L. S., BARROSO, R. M., LUNDSTEDT, L. M. Anatomia e fisiologia de peixes de água doce. In: _____. (Eds.). **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. 1ª Edição. Brasília, DF: Ed. Embrapa, 2013. p.301-336.

MUELLER C. A., BURGGREN W. W., CROSSLEY D. A. II ANG II and baroreflex control of heart rate in embryonic chickens (*Gallus gallus domesticus*). **American Journal of Physiology**, v. 305, p. 855–863, 2013.

NELSON, J. S., GRANDE, C. T., WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. 15ª Edição. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 707p.

NILSSON, S., SUNDIN, L. Gill blood flow control. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 119, p. 137-147, 1998.

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

OLSON, K. R., CONKLIN, D. J., FARRELL, A. P., KEEN, J. E., TAKEI, Y., WEAVER, L., Jr, SMITH, M. P. AND ZHANG, Y. Effects of natriuretic peptides and nitroprusside on venous function in trout. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 527-539, 1997.

PAPPANO, A. J. Cholinoceptor-blocking drugs. In: _____. (Eds.). KATZUNG, B. G., MASTERS, S. B., TREVOR, A. J., **Basic and Clinical Pharmacology**. 11ª Edição. Nova York, NY: The McGraw-Hill Companies Inc, 2009.

PAVANELLI, G. C., TAKEMOTO, R. M., EIRAS, J. C. Peixes Introduzidos e Seus Parasitos In: _____. (Eds.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduern, 2013. p. 169-193.

PORTEUS, C., POLLACK, J., TZANEVA, V., KWONG, R. W. M., KUMAI, Y., ABDALLAH, S., ZACONNE, G., LAURIANO, E. R., MILSOM, W. K., PERRY, S. F. A role for nitric oxide in the control of breathing in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 3746-3753, 2015.

PÖRTNER, H. O. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Naturwissenschaften**, v. 88, p. 137-146, 2001.

POTTER, E. K., MCCLOSKEY, D. I., Respiratory stimulation by angiotensin II. **Respiration Physiology**, v. 36, p. 367-373, 1979.

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

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*). **Journal of Fish Biology**, v. 41, p.805–812, 1992.

REID, S. G., SUNDIN, L., FLORINDO, L. H., RANTIN, F. T., MILSOM, W. K. . Effects of Afferent Input on the Breathing Pattern Continuum in the Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 136, n.1, p. 39-53, 2003.

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

SANDBLOM, E., AXELSSON, M. Autonomic control of circulation in fish: A comparative view. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v. 165, p. 127–139 2011.

SANDBLOM, E., EKSTRÖM A., BRIJS J., SUNDSTRÖM L. F., JUTFELT F., CLARK T. D., ADILL A., AHO T., GRÄNS A. Cardiac reflexes in a warming world: Thermal plasticity of barostatic control and autonomic tones in a temperate fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 2880-2887, 2016.

SIMMS, A. E., PATON, J. F., PICKERING, A. E., ALLEN, A. M. Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? **The Journal of Physiology**, v. 587, p. 597-610, 2009.

SMITH, F. M., JONES, D. R. The effect of changes in blood oxygen carrying capacity on ventilation volume in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Experimental Biology** v. 97, p. 325-334, 1982.

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

TAYLOR, E. W., JORDAN, D., COOTE, J. H., Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 855-916, 1999.

TAYLOR, E. W., LEITE, C. A. C., SKOVGAARD, N. Autonomic control of cardiorespiratory interactions in fish, amphibians and reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 600-610, 2010.

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

TEIXEIRA, M. T., ARMELIN, V. A., ABE, A. S., RANTIN, F. T., FLORINDO, L. H. Autonomic control of post-air-breathing tachycardia in *Clarias gariepinus* (Teleostei: Clariidae). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 185, p 669-676, 2015.

VAN VLIET, B. N., WEST, N. H. Phylogenetic trends in the baroreceptor control of arterial blood pressure. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1284–1304, 1994.

WAY. J. L. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**. v. 24, p. 451-481, 1984.

ZENA, L. A., GARGAGLIONI, L. H., BICEGO, K. C. Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 179, p. 81-88, 2015.

ZENA L. A., DA SILVA G. S., GARGAGLIONI L. H, BÍCEGO K. C. Baroreflex regulation affects ventilation in the Cururu toad *Rhinella schneideri*. **Journal of Experimental Biology**, 2016.

ZERAIK, V. M., BELÃO, T. C., FLORINDO, L. H., KALININ, A. L. RANTIN, F. T. Branchial O₂ chemoreceptors in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Control of cardiorespiratory function in response to hypoxia, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 166, p. 17-25, 2013.