



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Mariana Teodoro Teixeira

Influência dos ajustes cardiorrespiratórios durante a respiração aérea do bagre africano (*Clarias gariepinus*) exposto à hipóxia.

São José do Rio Preto

2014

Mariana Teodoro Teixeira

Influência dos ajustes cardiorrespiratórios durante a respiração aérea do bagre africano (*Clarias gariepinus*) exposto à hipóxia.

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.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

São José do Rio Preto

2014

Teixeira, Mariana Teodoro.

Influência dos ajustes cardiorrespiratórios durante a respiração
aérea do bagre africano (*Clarias gariepinus*) exposto à hipóxia /

Mariana Teodoro Teixeira. -- São José do Rio Preto, 2014

52 f. : il., gráfs, tabs.

Orientador: Luiz Henrique Florindo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia animal. 2. Peixe de água doce. 3. Bagre (Peixe)
4. Peixes de respiração aérea. 5. Hipóxia. 6. Adaptação (Biologia)
I. Florindo, Luiz Henrique. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas. III. Título.

CDU – 597

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Mariana Teodoro Teixeira

Influência dos ajustes cardiorrespiratórios durante a respiração aérea do bagre africano (*Clarias gariepinus*) exposto à hipóxia.

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.

Aprovado em 26/03/2014

BANCA EXAMINADORA:

Prof..Dr.Luiz Henrique Florindo

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Kalinin

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

*Aos meus pais, por todo o amor
e incentivo neste caminho, e ao meu amado
avô Nico, que sempre foi e será meu grande
exemplo, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade.

Aos integrantes da banca examinadora por terem aceitado o convite, pela análise do trabalho e pelas importantes considerações.

Aos meus queridos pais, Luiz e Vera, pela dedicação e amor incondicional, pelo conforto, carinho, paciência e compreensão nesta fase.

Aos meus familiares e amigos, pelo amor e carinho e por estarem sempre presentes de alguma forma durante toda essa jornada.

Aos meus colegas de laboratório: Henrique (Pelicano), Ariela, Victor, Ivã, Nágila, Laura e Larissa, pelo convívio, pelos ensinamentos e principalmente pelas boas risadas e pelo apoio nas horas difíceis. Em especial, a Daniele e ao Vinícius, sem os quais eu jamais concluiria este trabalho, pelos muitos ensinamentos, pelos conselhos, pela paciência e pela amizade. E ao meu grande companheiro de pós-graduação, Leonardo, por todo o carinho, amor, amizade, conselhos e pela companhia diária, que foram imprecindíveis durante esses anos.

Aos eternos amigos da Turma 53 e todos os amigos Ibilceanos, que estiveram ao meu lado por todos esses anos, pelo carinho, companheirismo e pelas histórias inesquecíveis.

Ao técnico de laboratório Carlos, pela grande ajuda e prontidão sempre.

À Piscicultura Poletini pela doação dos espécimes de bagre africano.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

*"A compaixão pelos animais está intimamente
ligada a bondade de caráter, e pode ser
seguramente afirmado que quem é cruel com os
animais não pode ser um bom homem."*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Os peixes de respiração aérea ocorrem, em sua grande maioria, em regiões de clima tropical, principalmente em estuários e lagos de água doce, onde a quantidade de oxigênio dissolvido é bastante suscetível a oscilações. Dessa forma, o sucesso ecológico desses animais é particularmente influenciado pelas suas adaptações fisiológicas para detectar mudanças nos níveis de O_2 da água, interpretar estas informações sensoriais e efetuar ajustes apropriados nas suas funções cardiorrespiratórias. Praticamente todas as espécies de peixe de respiração aérea estudadas apresentam alterações na frequência cardíaca (f_H) associadas a respiração aérea (RA). Supõe-se que estes ajustes cardiorrespiratórios facilitem a captação de O_2 no órgão de respiração aérea (ORA) (aumento do débito cardíaco que eleva o fluxo sanguíneo) e otimize a distribuição desse O_2 para os tecidos, aumentando a eficácia da respiração aérea e assim o metabolismo aeróbico é mantido. Nesse trabalho foram avaliados os parâmetros cardiorrespiratórios (f_H , frequência de respiração branquial - f_R e frequência de respiração aérea - f_{RA}) de *Clarias gariepinus* durante 1 hora em normóxia e posteriormente 1 hora em hipóxia 60 mmHg e 1 hora em hipóxia 20 mmHg. Cada animal foi submetido a este protocolo inicialmente (CTR), e o mesmo era repetido após administração de propranolol (PRO) e após administração de atropina (PRO+ATR). A f_R dos animais CTR em normóxia foi praticamente constante ($\sim 43,16 \text{ resp.min}^{-1}$) e nas duas tensões hipóxicas (60 e 20 mmHg) também se manteve estável, entretanto foi verificada uma diminuição não significativa quando comparado a normóxia. O propranolol e a atropina não causaram alterações significativas na f_R . Nos peixes CTR, em normóxia, a f_{RA} foi reduzida ($\sim 1,85 \text{ RA.h}^{-1}$), em hipóxia 60 mmHg houve uma elevação da f_{RA} e esse aumento foi maior em hipóxia 20 mmHg. A administração de atropina alterou significativamente a f_{RA} em relação ao controle apenas durante a hipóxia mais severa (20 mmHg). No animais CTR, tanto em normóxia quanto em hipóxia (60 e 20mmHg), foi observada a ocorrência de taquicardia logo após as RA's. A administração de propranolol não alterou significativamente a f_H e não aboliu a taquicardia pós-RA quando comparado ao controle. Após administração de atropina, a f_H aumentou e permaneceu constante. Esses resultados demonstram que o bagre africano, como um respirador aéreo facultativo, aumenta a f_{RA} em detrimento da f_R frente a hipóxia aquática, e que modificações no débito cardíaco alteram a f_{RA} , indicando que as alterações na f_H associadas a respiração aérea podem influenciar a eficiência da mesma nesta espécie.

Palavras-chave: Bagre-africano, respiração aérea, hipóxia, ajustes cardiorrespiratórios, bloqueio farmacológico.

ABSTRACT

Air-breathing fish occur mostly in tropical regions, especially in estuaries and freshwater lakes, where the amount of dissolved oxygen is highly susceptible to fluctuations. Thus, the ecological success of these animals is particularly influenced by their physiological adjustments to detect changes in O_2 levels in the water, interpret sensory information and make appropriate adjustments in their cardiorespiratory functions. Almost all air-breathing fish studied to date exhibit changes in heart rate (f_H) associated with surface air breathing. It is assumed that those cardiorespiratory adjustments facilitate O_2 uptake from air-breathing organ (ABO) (increased cardiac output which increases blood flow) and optimize the distribution of O_2 to the tissues, increasing the efficiency of air breathing and then aerobic metabolism is maintained. In this research the cardiorespiratory parameters (f_H , gill breathing frequency- f_R and frequency of air breathing - f_{RA}) were evaluated in *Clarias gariepinus* for 1 hour in normoxia and then hypoxia 60 mmHg and 1 hour in hypoxia 20 mmHg. Each animal was first submitted to this protocol (CTR), and the same was repeated after administration of propranolol (PRO) and after administration of atropine (ATR + PRO). The f_R of CTR animals in normoxia was almost constant ($\sim 43.16 \text{ resp.min}^{-1}$) and the two hypoxic tensions (60 and 20 mmHg) also remained stable, however we detected no significant decrease when compared to normoxia. The propranolol and atropine did not cause significant changes in f_R . In CTR fish in normoxia, f_{RA} was reduced ($\sim 1.85 \text{ RA.h}^{-1}$), in hypoxia 60 mmHg there was a raising and this increase was higher in hypoxia 20 mmHg. The administration of propranolol + atropine significantly changed f_{RA} compared to control only during severe hypoxia (20 mmHg). In CTR animals, during normoxia and hypoxia (60 and 20 mmHg), the occurrence of tachycardia was observed after the RA's. The administration of propranolol did not significantly change f_H and also didn't abolish the post- RA tachycardia when compared to control group. After administration of atropine, the f_H increased and remained constant. These results show that catfish, as a facultative air-breather, increases f_{RA} and decreases f_R front aquatic hypoxia, and changes in cardiac output alter f_{RA} , indicating that changes in f_H associated with air breathing may influence the efficiency the same in this species.

Key words: African catfish, Air breathing, Hypoxia, Cardiorespiratory Adjustments, Pharmacological Blockade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplar de <i>C. gariepinus</i>	22
Figura 2 - Órgão de respiração aérea (ORA) de <i>C. gariepinus</i> (Adaptado de Belão, 2010). 22	
Figura 3 - Exemplar de <i>C. gariepinus</i> anestesiado após instrumentação.	25
Figura 4 - Visão geral de <i>C. gariepinus</i> após instrumentação cirúrgica.....	25
Figura 5 - Ilustração da câmara de contenção utilizada para recuperação pós-cirúrgica dos animais (Adaptado de Belão, 2010).	26
Figura 6 - Ilustração do sistema experimental utilizado para obtenção dos dados de f_H , f_R e f_{RA}	27
Figura 7- Registro do eletrocardiograma (ECG) do bagre africano (<i>C. gariepinus</i>), em normóxia.	28
Figura 8 - Frequência de respiração branquial (f_R – resp. min ⁻¹) durante as pressões parciais de O ₂ da água nos grupos controle (CTR), propranolol (PRO) e duplo bloqueio (PRO+ATR). Linhas cinzas indicam f_R pré-RA e linhas vermelhas indicam f_R pós-RA. O número localizado próximo a cada ponto do gráfico refere-se à quantidade de réplicas (N). Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA seguido do <i>post-hoc</i> de Bonferroni. Nenhuma diferença significativa entre grupos.	34
Figura 9 - Frequência de respirações aéreas (f_{RA} – resp.h ⁻¹) durante as pressões parciais de O ₂ da água nos grupos controle (CTR), propranolol (PRO) e duplo bloqueio (PRO+ATR). Semelhança entre letra superscrita indica que não há diferença significativa entre os grupos. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA para medidas repedidas seguido de <i>post-hoc</i> de Student-Newman-Keuls (N = 7).	34

Figura 10 - Frequência cardíaca (f_H - bpm) pré (cinza) e pós (vermelho) -RA, durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos controle, propranolol e duplo bloqueio (PRO+ATR). Um asterisco indica diferença significativa para com o valor da f_H pré-RA dos animais sob o mesmo tratamento e sob a mesma PO_2 . Uma adaga dupla indica diferença significativa para com a f_H de animais não tratados (controle), sob a mesma PO_2 e sob a mesma condição em relação à respiração aérea (pré ou pós-RA). Os testes estatísticos utilizados foram : ANOVA para medidas repedidas seguido de post-hoc de Student-Newman-Keuls (N = 7).39

Figura 11 - Frequência de respiração branquial (f_R – resp. min^{-1}) durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos controle (CTR), Salina P (equivalente a injeção de propranolol) e Salina A (equivalente a injeção de atropina) Linhas tracejadas indicam f_R pré-RA e linhas contínuas indicam f_R pós-RA. O número localizado próximo a cada ponto do gráfico refere-se à quantidade de réplicas (N). Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA seguido do *post-hoc* de Bonferroni. Nenhuma diferença significativa entre grupos (N = 4).41

Figura 12- Frequência de respiração aérea (f_{RA} – resp.h-1) durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos controle (CTR), Salina P (equivalente a injeção de propranolol) e Salina A (equivalente a injeção de atropina). Semelhança entre letra superscrita indica que não há diferença significativa entre os grupos. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA para medidas repedidas seguido de post-hoc de Student-Newman-Keuls (N = 4)41

Figura 13 - Frequência cardíaca (f_H - bpm) pré (cinza escuro) e pós (cinza claro) - RA durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos Controle, Salina P (equivalente a injeção de propranolol) e Salina A (equivalente a injeção de atropina). Um asterisco indica diferença significativa para com o valor da f_H pré-RA dos animais sob o mesmo tratamento e sob a mesma PO_2 na água. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA para medidas repedidas seguido de *post-hoc* de Student-Newman-Keuls (N = 4).42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios ($\pm$ S.E.M) dos parâmetros cardiorrespiratórios de *C. gariepinus* em normóxia e hipóxia (60 e 20 mmHg) nos grupos Controle, Propranolol e Pro+Atr.....32
- Tabela 2.** Comparação dos valores de P_{CO_2} de *C. gariepinus* com os valores de outros respiradores bimodais Siluriformes e não Siluriformes, e teleósteos de respiração exclusivamente aquática (Adaptado de Belão, et al 2011)..... 35
- Tabela 3.** Comparação entre a frequência cardíaca (f_H) pré e pós- respiração aérea (RA) de *C. gariepinus*.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EO_2	Extração de oxigênio
ECG	Eletrocardiograma
f_{AB}	Frequência de respiração aérea
f_{H}	Frequência cardíaca
f_{R}	Frequência de respiração branquial
MC	Massa corpórea
MmHg	Milímetros de mercúrio
$\text{MO}_{2\text{a}}$	Consumo de oxigênio aéreo
$\text{MO}_{2\text{w}}$	Consumo de oxigênio aquático
N_2	Nitrogênio
O_2	Oxigênio
ORA	Orgão de respiração aérea
P_cO_2	Tensão crítica de oxigênio
PO_2	Pressão parcial de oxigênio
RA	Respiração aérea
RA.h^{-1}	Respiração aérea por hora
resp.min^{-1}	Ciclo respiratório por minuto
RSA	Arritmia sinusal respiratória
V_g	Ventilação branquial
VS	Volume sistólico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Hipóxia ambiental e a evolução da respiração aérea	14
1.2 Adaptações cardiorrespiratórias à hipóxia	16
1.3 Família Clariidae e o bagre africano	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos gerais	23
2.2 Objetivo específico.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Procedimentos cirúrgicos.....	24
3.3 Parâmetros cardiorrespiratórios.....	27
3.3.1 <i>Frequência cardíaca (f_H).....</i>	27
3.3.2 <i>Frequência de respiração branquial (f_R) e frequência de respiração aérea (f_{RA})</i>	28
3.4 Protocolo Experimental	28
3.5 Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Frequência de respiração branquial (f_R) e frequência de respiração aérea (f_{RA}).....	31
4.2 Frequência de cardíaca (f_H) e Controle autonômico do coração.....	35
4.3 Verificação dos efeitos da injeção.....	40
5 CONCLUSÃO.....	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipóxia ambiental e a evolução da respiração aérea

A vida com o oxigênio começou a cerca de 2,5 bilhões de anos, com a evolução de organismos capazes de converter energia solar em energia química de ligações de carbono (fotossíntese). Os organismos fotossintéticos se multiplicaram, levando a um aumento progressivo da concentração de O₂ na atmosfera. Consequentemente, alterações nas concentrações de O₂ atmosférico ao longo dos últimos 550 milhões anos estiveram intimamente associadas com a evolução de diversos grupos, inclusive dos Vertebrados (PURVES et al., 2005; BERNER et al., 2007; SEMENZA, 2007).

As oscilações nos níveis de O₂ atmosférico foram muito mais abrangentes no Paleozoico em relação às épocas mais recentes, e essas alterações apresentam efeito duplicado na água, pois o conteúdo de oxigênio aquático está muito mais sujeito a variações que o atmosférico (GRAHAM, 1997). As fontes de O₂ de corpos d'água naturais são: a fotossíntese realizada pelo fitoplâncton e macroalgas e a difusão do O₂ da atmosfera. Algumas condições físicas, como o vento e densidade das correntes verticais na água, são necessárias para o equilíbrio entre O₂ atmosférico e aquático, bem como para o transporte de O₂ dissolvido até regiões mais profundas dos corpos d'água (RANDALL et al, 1981; GRAHAM, 1978, 1997). Entretanto, em alguns ambientes esses processos não são eficientes e condições de hipóxia podem acontecer cronicamente (GRAHAM, 1997).

Atualmente a maioria dos peixes de respiração bimodal ocorrem em águas doces tropicais, e entre esses animais o estímulo para realizar respiração aérea parece ter surgido primeiramente como consequência da hipóxia aquática (JUNK et al, 1983; CARTER, 1957; JOHANSEN, 1970). Nessas regiões as condições de escassez de oxigênio estão relacionadas principalmente às altas temperaturas e à presença de grandes quantidades de matéria orgânica, que aumentam o consumo de O₂ da água por parte dos microrganismos (GRAHAM, 1997).

O processo de fotossíntese, em muitos casos, também não é suficiente para manter a normóxia aquática, pois geralmente são ambientes que apresentam a superfície encoberta por macrófitas ou são sombreados por densas camadas de árvores. Além disso, a falta de chuva durante alguns períodos aquece e represa essas águas e muitas vezes populações de peixes ficam isoladas em poças. Sendo assim, a produção limitada O₂ somado ao aquecimento da água e a grande demanda biológica de O₂ imposta pela aglomeração e decomposição de

matéria orgânica pode levar à hipóxia e até mesmo anóxia desses corpos d'água tropicais (GRAHAM, 1997).

São nesses tipos de habitats, onde mudanças extremas na disponibilidade de água e nas concentrações de O_2 ocorrem regularmente, que a seleção natural tem agido repetidamente na diversidade de peixes tropicais de água doce, resultando em uma série de especializações para a realização de respiração aérea (GRAHAM, 1997). Dessa forma, fica evidente que a variação dos níveis de O_2 foi de extrema relevância para a evolução desses animais, pois exerceu forte pressão seletiva para adaptação e sobrevivência.

Os peixes podem ser classificados de duas maneiras de acordo com a sua resposta metabólica à redução da disponibilidade de O_2 ambiental. Os oxi-conformistas tem seu metabolismo respiratório padrão/basal variando proporcionalmente às alterações da pressão parcial de oxigênio (PO_2) ou seja, sua taxa metabólica acompanha as alterações do conteúdo de O_2 ambiental. Os oxi-reguladores, por sua vez, mantêm seu metabolismo padrão/basal estável enquanto a PO_2 do meio é reduzida. A taxa de consumo de oxigênio permanece constante até uma determinada PO_2 denominada tensão crítica de oxigênio (P_{CO_2}), abaixo da qual seu metabolismo respiratório padrão/basal tende a diminuir significativamente com a redução da PO_2 (PROSSER, 1973).

Os oxi-reguladores apresentam estratégias que os permitem resistir aos decréscimos de O_2 ambiental; por exemplo, alguns processos comportamentais como fugir da situação desfavorável e buscar locais mais oxigenados (CHAPMAN e MCKENZIE, 2009). Entretanto esses mecanismos comportamentais geralmente são adequados para exposições de curto prazo a hipóxia. Há também diversas adaptações fisiológicas que possibilitam a resistência a níveis de O_2 mais baixos, como os ajustes no sistema cardiorrespiratório, que serão detalhados no item seguinte, que provavelmente melhoram a relação difusão/perfusão de O_2 nas brânquias (RANTIN et al., 1993). Existem ainda respostas moleculares e bioquímicas para a sobrevivência em ambientes hipóxicos, como alterações na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo e na afinidade da hemoglobina pelo O_2 . (FRASER et al., 2006; CHEN et al., 2013).

Em relação à respiração aérea, os peixes podem ser classificados, com base no comportamento e em fatores ambientais que afetam a respiração em: peixes de respiração aérea “anfíbios” e peixes de respiração aérea aquáticos (GRAHAM, 1997). Os peixes denominados “anfíbios” respiram ar principalmente durante períodos em que se encontram fora da água, sendo que a saída da água pode ser decorrente de diversos fatores como alimentação, fuga de predadores, procura por novos corpos d'água, dentre outros (GIBSON,

1982; GRAHAM, 1997). Mas, existem também espécies tropicais que inadvertidamente tornam-se respiradores aéreos “anfíbios” devido ao desaparecimento do habitat aquático, como geralmente ocorre em certas áreas durante a estação seca. Esses peixes ficam confinados em tocas de barro durante esse período, muitas vezes até em estados de estivação (GRAHAM, 1997).

Os peixes de respiração aérea denominados aquáticos permanecem na água e nadam até a superfície para tomadas de ar periódicas e são divididos em peixes de respiração aérea obrigatórios, que não sobrevivem apenas respirando o O_2 dissolvido na água, mesmo em condições de normóxia, e em peixes de respiração aérea não-obrigatória ou facultativa, que são capazes de sobreviver apenas respirando O_2 da água em normóxia. É importante ressaltar que essa classificação não é exata, dessa forma ela não pode ser usada para designar invariavelmente uma espécie como sendo de um tipo em oposição a outro (GRAHAM, 1997).

Esses peixes utilizam a respiração aquática e aérea em diferentes graus, dependendo, por exemplo, de fatores ambientais e do nível de atividade do animal. A importância relativa dos dois modos de respiração é refletida estruturalmente. Em peixes de respiração aérea obrigatória, as brânquias tendem a apresentar menor área de superfície e um epitélio espesso, enquanto o órgão de respiração aérea é bem vascularizado e possui uma grande área de superfície, compatível com a troca gasosa eficiente. A situação inversa prevalece nos respiradores aéreos facultativos, que dependem predominantemente da respiração aquática. Em poucas espécies ambos os órgãos de trocas gasosas aquático e aéreo são bem desenvolvidos (JOHANSEN, et al. 1970).

1.2 Adaptações cardiorrespiratórias à hipóxia

O sucesso ecológico dos peixes que habitam regiões de clima tropical é particularmente influenciado pelas suas adaptações fisiológicas para detectar as mudanças nos níveis de oxigênio da água e interpretar estas informações sensoriais para efetuar ajustes apropriados nas suas funções cardiorrespiratórias (FRITSCHÉ e NILSSON, 1993).

Tais ajustes cardiorrespiratórios em resposta à hipóxia resultam do processamento central de uma ampla variedade de “inputs” sensoriais com origem em diferentes grupos de quimiorreceptores (MILSOM, 1996). Esses quimiorreceptores tem sido identificados em Characiformes por meio de desnervação seletiva de nervos craniais e injeção de NaCN, que age como estimulante de quimiorreceptores branquiais. Com esses estudos, foram obtidas evidências de que os peixes detectam as pressões parciais de oxigênio (PO_2) da água e do

sangue por meio de quimiorreceptores sensíveis ao O_2 internos, que monitoram a PO_2 do sangue arterial, e externos, que monitoram a PO_2 da água, localizados nas brânquias, pseudobrânquias, e quimiorreceptores extrabranquiais (FLORINDO et al., 2006; MICHELI-CAMPBELL et al., 2009; SUNDIN et al., 2000).

Em situações de hipóxia a maioria dos peixes de respiração exclusivamente aquática aumenta a ventilação branquial (V_G) e a extração de O_2 (EO_2) (RANDALL, 1982). Porém nos peixes de respiração aérea, a hipóxia afeta de diversas maneiras a ventilação aquática. Em algumas espécies, os animais mantem a ventilação branquial quando expostos a hipóxia aquática, como é o caso dos gêneros *Synbranchus*, *Lepisosteus* e *Neoceratodus*. Por outro lado, em *Brochis*, *Piabucina*, *Hoplosternum*, *Erpitoichthys* e *Misgurnus*, há a diminuição da ventilação branquial. E existem ainda gêneros em que os animais hiperventilam as brânquias até certo nível de PO_2 , onde então começam a tomada de ar atmosférico, esse é o caso de *Umbra*, *Amia*, *Potopterus*, *Heteropneustes*, *Polypterus* e *Clarias* (GRAHAM, 1997).

Os peixes de respiração aérea considerados “facultativos” podem apresentar alterações na frequência de respirações aéreas (f_{RA}) e no consumo de O_2 em resposta a situações de hipóxia (GRAHAM, 1997). Lefevre e colaboradores (2010) avaliaram os ajustes ventilatórios e o consumo de oxigênio aéreo (MO_{2a}) e aquático (MO_{2w}) do “catfish” asiático *Pangasianodon hypophthalmus*, em situações de hipóxia e normóxia aquática, e observou que a f_{RA} em normóxia era insignificante e conseqüentemente, o O_2 consumido era obtido em maior proporção da água que do ar. Entretanto, em hipóxia, a respiração aérea se tornou significativamente mais efetiva, sendo que a f_{RA} aumentou consideravelmente coincidindo com uma diminuição na frequência de respiração branquial (f_R), portanto O_2 consumido foi obtido em maior proporção do ar em relação a água, demonstrando a importância da respiração aérea em ambientes hipóxicos para esses peixes.

Esse predomínio da respiração aérea em hipóxia também foi verificado no jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* e em *Amia calva* foi observado um aumento acentuado de respirações aéreas, concomitantemente com uma diminuição da respiração branquial, em tensões de O_2 de 40 a 50 mmHg a 20 °C em relação aos valores em normóxia (MCKENZIE et al., 2007; JOHANSEN et al., 1970). No bagre africano esse aumento na f_{RA} , em resposta à hipóxia aquática também foi demonstrado, sendo que f_{RA} alcançou valores máximos de 11 ± 2 respirações h^{-1} em hipóxia severa (PO_2 10 mmHg). E em contrapartida, em situações de normóxia, os animais alternaram longos períodos de inatividade com movimentos lentos para forrageio, apresentando f_{RA} baixa (BELÃO et al., 2011). O aumento da f_{RA} em peixes de respiração bimodal é praticamente uma resposta padrão à hipóxia. E acredita-se que esse

ajuste ocorra para manter o nível de O_2 do sangue arterial semelhante aos valores em normóxia. (GRAHAM, 1997).

Outra resposta à hipóxia encontrada na maioria das espécies já estudadas, inclusive nos peixes de respiração aérea, é uma diminuição considerável da frequência cardíaca (f_H), conhecida como bradicardia hipóxica (BUTLER e TAYLOR, 1971; RANDALL, 1982; TAYLOR e BARRRETT 1985). Esta bradicardia pode levar a um aumento do volume sistólico (VS) que mantém o débito cardíaco. Concomitantemente, a resistência sistêmica é aumentada, resultando na elevação da pressão sanguínea central. Assim, o aumento do VS e a diminuição da f_H , resultam em uma elevação na pressão de bombeamento sanguíneo, fazendo com que o sangue seja ejetado do coração com uma força maior a cada sístole (RANDALL, 1982). E esta bradicardia é induzida por um aumento no tônus colinérgico (vagal) inibitório, que é conhecido por atuar como um reflexo da estimulação de quimiorreceptores de O_2 (TAYLOR, 1992).

Em algumas espécies de peixes neotropicais que apresentam bradicardia hipóxica, tal reflexo parece ser iniciado pela ativação de receptores branquiais localizados tanto externa quanto internamente, como é o caso do pacu (LEITE et al., 2007), e do tambaqui (FLORINDO et al., 2006; SUNDIN et al., 2000), já em outras espécies, os quimiorreceptores branquiais envolvidos estão orientados apenas internamente, como ocorre na traíra, *Hoplias malabaricus* (SUNDIN et al., 1999). Tais resultados sugerem que espécies tolerantes à hipóxia são capazes de responder tanto à hipóxia quanto à hipoxemia, enquanto espécies menos tolerantes à hipóxia respondem diretamente a baixas concentrações de oxigênio na água.

A bradicardia hipóxica também é relatada em peixes de respiração aérea, sendo que experimentos com a desnervação completa dos nervos branquiais resultam na eliminação completa desse ajuste em algumas espécies como *A. calva*, *Ictalurus punctatus* e *Lepisosteus oculatus* (MCKENZIE et al, 1991; BURLESON e SMATRESK, 1990; SMATRESK, 1991). Entretanto, em outras espécies a desnervação não leva a abolição completa desse reflexo, e tal fato tem sido atribuído à existência de quimiorreceptores sensíveis a O_2 localizados extrabranquialmente (HUGHES e SHELTON, 1962; SAUNDERS e SUTTERLIN, 1971; BAMFORD, 1974).

Existe a hipótese de que a bradicardia hipóxica possa proteger o coração dos peixes das baixas concentrações de O_2 . Entre os benefícios estaria o aumento no tempo de permanência do sangue no lúmen do coração durante a diástole que pode aumentar o tempo para a difusão do oxigênio para as células do músculo cardíaco e o aumento no volume de

sangue no coração (VS) distenderia as fibras cardíacas, potencialmente reduzindo a distância de difusão do oxigênio para os miócitos (FARRELL, 2007). Porém, ainda não existem resultados que demonstrem esta teoria.

Uma hipótese alternativa em relação às vantagens da bradicardia hipóxica, afirma que, possivelmente, aconteça uma maior transferência de oxigênio da água para o sangue pelas brânquias quando o peixe desenvolve uma menor f_H , devido a maior permanência do sangue nas lamelas secundárias entre cada batida do coração, uma vez que, simultaneamente, a água da corrente ventilatória está passando pelas brânquias com uma maior velocidade devido à ocorrência de hiperventilação (SATCHELL, 1961; TAYLOR e BARRETT, 1985).

Entretanto ainda não existem dados suficientes para afirmar se a bradicardia hipóxica melhora ou não a transferência de O_2 pelas brânquias, pois além do fato dos estudos já realizados apresentarem resultados contraditórios, a maioria deles investigou espécies de ambientes temperados, onde a escassez de oxigênio não é tão comum quanto em ambientes tropicais, o que torna fundamental o estudo de espécies tropicais tolerantes à hipóxia para obtenção de resultados mais esclarecedores (PERRY e DESFORGES, 2006; TAYLOR e BARRETT, 1985; SHORT et al., 1979).

Em estudos realizados com peixes de respiração aérea em condições de normóxia e hipóxia foi verificada, além da ocorrência de bradicardia, uma breve taquicardia depois de tomadas de ar atmosférico. Supõe-se que esse controle cardiorrespiratório permita ao animal distribuir, de maneira mais rápida e eficiente, uma maior quantidade de O_2 a todo o seu corpo, mantendo assim o metabolismo aeróbico (JOHANSEN, 1966; JOHANSEN et al., 1970). O típico ciclo de bradicardia seguido de taquicardia pós respiração aérea (RA) foi inicialmente demonstrado no muçum, *Synbranchus marmoratus*, em estudos realizados por Johansen (1966).

Esse ciclo também foi documentado no jeju, *H. unitaeniatus* (FARRELL, 1978) e em *Anabas testudineus* (SINGH e HUGHES, 1973) e praticamente todas as espécies estudadas até hoje, exibiram mudanças na f_H relacionadas a tomada de ar atmosférico. Apesar dessa taquicardia ocorrer na grande maioria das espécies de respiração aérea, a sua real importância, principalmente para os peixes tolerantes à hipóxia, ainda não é completamente esclarecida, por isso são necessários estudos mais detalhados desse ajuste (GRAHAM, 1997).

Esses ajustes de f_H estão sob controle autonômico, uma vez que o coração dos teleósteos, assim como a maioria dos vertebrados, apresenta fibras excitatórias adrenérgicas e inibitórias colinérgicas. As fibras adrenérgicas estão distribuídas por todo o tecido cardíaco enquanto as fibras colinérgicas, que chegam ao coração pelo ramo cardíaco do nervo Vago,

inervam principalmente o seio venoso e o átrio onde supõe-se que estão localizadas as células marca-passo. Além disso, catecolaminas que chegam ao coração pela circulação (liberadas pelo tecido cromafim) se ligam à β -adrenorreceptores exercendo efeitos inotrópicos e cronotrópicos no coração. E nas terminações vagais é liberada acetilcolina que interage com receptores muscarínicos das células marca-passo, induzindo a hiperpolarização destas células e consequentemente reduzindo a f_H . Sendo assim, a f_H de peixes está sob influência dos tônus autonômicos adrenérgico e colinérgico (NILSSON et al., 1983).

1.3 Família Clariidae e o bagre africano

Dentro da ordem Siluriformes, a família Clariidae é o grupo de “catfishes” que apresentam respiração aérea e ocorrem no continente africano, sendo que dos 13 gêneros descritos, apenas *Clarias* (Scopoli, 1777) também ocorre em todo o Sudeste Asiático e *Encheloclarias* (Herre e Myers, 1937), ocorre em regiões próximas a Índia e Indonésia (TEUGELS e ADRIAENS, 2003; TEUGELS et al., 1990; HEE, 1999). As espécies do gênero *Clarias* são caracterizadas pelo seu corpo anguiforme, nadadeiras dorsal e anal longas, cabeça achatada e uma boca larga, com 4 pares de barbilhões (HEE, 1999). O gênero apresenta 32 espécies descritas, sendo que cinco espécies africanas apresentam interesse econômico: *C. anguilarus*, *C. senegalensis*, *C. lazera*, *C. mossambicus* e *C. gariepinus*, que é considerada uma das mais importantes espécies de bagres tropicais para a aquicultura (TEUGELS, 1982; DE GRAAF e JANSSEN, 1996.)

O bagre africano, *C. gariepinus*, é amplamente distribuído na África e partes da Ásia (Israel, Síria e sul da Turquia) (Figura 1). Ocorre principalmente em lagos e rios de águas calmas e em pântanos que apresentam inundações sazonais. Em sua área de distribuição natural é onívoro, alimentando-se de material vegetal, plâncton, artrópodes, moluscos, peixes, anfíbios e répteis (DE GRAAF e JANSSEN, 1996; YALÇIN et al., 2001). Apresenta nadadeiras peitorais fortes, corpo alongado, órgão de respiração aérea (ORA) e uma alta capacidade de produzir muco, tais características permitem a esses animais saírem da água, geralmente no período noturno, para forragear e/ou procurar sítios reprodutivos. (DONNELLY 1973; MILLI e TEIXEIRA, 2006).

Essa espécie apresenta grande relevância econômica, pois foi introduzida em diversas partes do mundo com fins de aquicultura, devido ao seu rápido crescimento e grande porte, tornando-se assim uma ameaça em potencial para a biodiversidade desses locais (TEUGELS e ADRIAENS, 2003). No Brasil a espécie foi introduzida em 1997, porém muitos peixes

escaparam dos tanques de piscicultura, invadindo córregos e rios adjacentes. Como em condições naturais as populações dessa espécie crescem rapidamente, consequentemente ocorreu a disseminação desses animais em diversas regiões do país, e pelo fato de ser uma espécie exótica e predadora, tem causado danos ecológicos a ictiofauna nativa (ALVES et al., 1999).

É uma espécie considerada tolerante às condições ambientais extremas, inclusive a hipóxia aquática, sendo classificados atualmente como respiradores aéreos facultativos, pois possuem brânquias capazes de extrair O_2 suficiente para manter seu metabolismo aeróbico em condições de normóxia. Entretanto a respiração aérea demonstra ter grande importância em condições hipóxicas, pois as brânquias se tornam menos eficientes na extração de O_2 da água e consequentemente o animal depende do O_2 obtido pelo ORA para manter o metabolismo aeróbico (BELÃO et al., 2011). O ORA consiste de câmaras suprabranquiais pareadas localizadas na região dorso-posterior da cavidade branquial, praticamente preenchidas pela árvore respiratória, que é coberta por um epitélio branquial modificado, especializado para respiração aérea (GRAHAM, 1997) (Figura 2).

Assim como outros teleósteos, o bagre africano em condições hipóxicas e sem acesso ao ar atmosférico desenvolve bradicardia em resposta à hipóxia, com a f_H apresentando redução de até 45% em relação aos valores em normóxia. Em situações com acesso ao ar atmosférico, o bagre africano exibe taquicardia logo após cada RA, sendo que esse aumento na f_H pode chegar a 72% em relação aos valores pré-RA. Além disso, o bagre africano, como já mencionado, apresenta um aumento acentuado na f_{RA} com concomitante decréscimo na f_R nas pressões mais críticas de O_2 (20-10 mmHg) (BELÃO et al., 2011). Entretanto, o papel desses ajustes na eficácia da respiração aérea ainda não foram investigadas nessa espécie.



Figura 1. Exemplar de *C. gariepinus*.



Figura 2. Órgão de respiração aérea (ORA) de *C. gariepinus* (Adaptado de Belão, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar a influência do ciclo bradicardia-taquicardia pós-RA na f_{RA} em normóxia e hipóxia.
- Avaliar a importância de cada modo de respiração (branquial e aérea) em normóxia e hipóxia.
- Analisar a regulação autonômica da f_H .
- Analisar a regulação autonômica da respiração branquial e aérea.

2.2 Objetivo específico

- Verificar se a abolição farmacológica dos ajustes de f_H altera a eficiência da respiração aérea nessa espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 11 exemplares de *C. gariepinus* (MC 300 $\pm$ 19,69 g), obtidos em pisciculturas próximas a região de Mogi Mirim. Os animais foram mantidos em tanques de 500L, com aeração constante, a 25°C $\pm$ 1, no Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) /UNESP. Os bagres foram alimentados “*ad libitum*” três vezes por semana com ração comercial formulada com 32% proteína. Porém, antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em jejum de 48 horas, para evitar a eliminação de fezes no sistema experimental e possíveis alterações metabólicas decorrentes da digestão durante o experimento. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IBILCE (Protocolo nº 057/2011).

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Os peixes foram primeiramente anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína (0,1 g.L⁻¹) até cessarem os movimentos operculares, então foram transferidos para uma mesa cirúrgica, onde as brânquias foram continuamente irrigadas com uma segunda solução aquosa de benzocaína (0,05 g.L⁻¹). Com o auxílio de uma microrretífica e uma broca, a região dorsal do palato foi perfurada para a introdução de uma cânula de polietileno (PE 100) na cavidade bucal. A cânula foi fixada por meio de uma flange (trava) e cola de secagem rápida (Super Bonder[®]). Essa cânula foi utilizada para analisar a f_R (Figura 3d).

Foram implantados dois eletrodos de eletrocardiograma (ECG) de acordo com o modelo descrito por Glass et. al. (1991). Um eletrodo foi introduzido na região ventral, próxima a região cardíaca, sem atingir o coração. O segundo eletrodo foi inserido na musculatura, acima da linha lateral, próximo ao início da nadadeira dorsal. Os eletrodos foram fixados à pele por pontos cirúrgicos. Estes eletrodos e mais um terceiro colocado na água da câmara experimental (eletrodo “terra”) foram utilizados para aferir a f_H (Figura 3a e 3b). Uma cânula de polietileno (PE 50) preenchida com solução salina (0,9% de NaCl) foi introduzida na cavidade peritoneal, por meio de uma pequena incisão na região ventral do animal. Para que a cânula se fixasse, foi suturada à pele por uma sutura única (Figura 3c). A administração de propranolol e atropina foi realizada por meio dessa cânula.

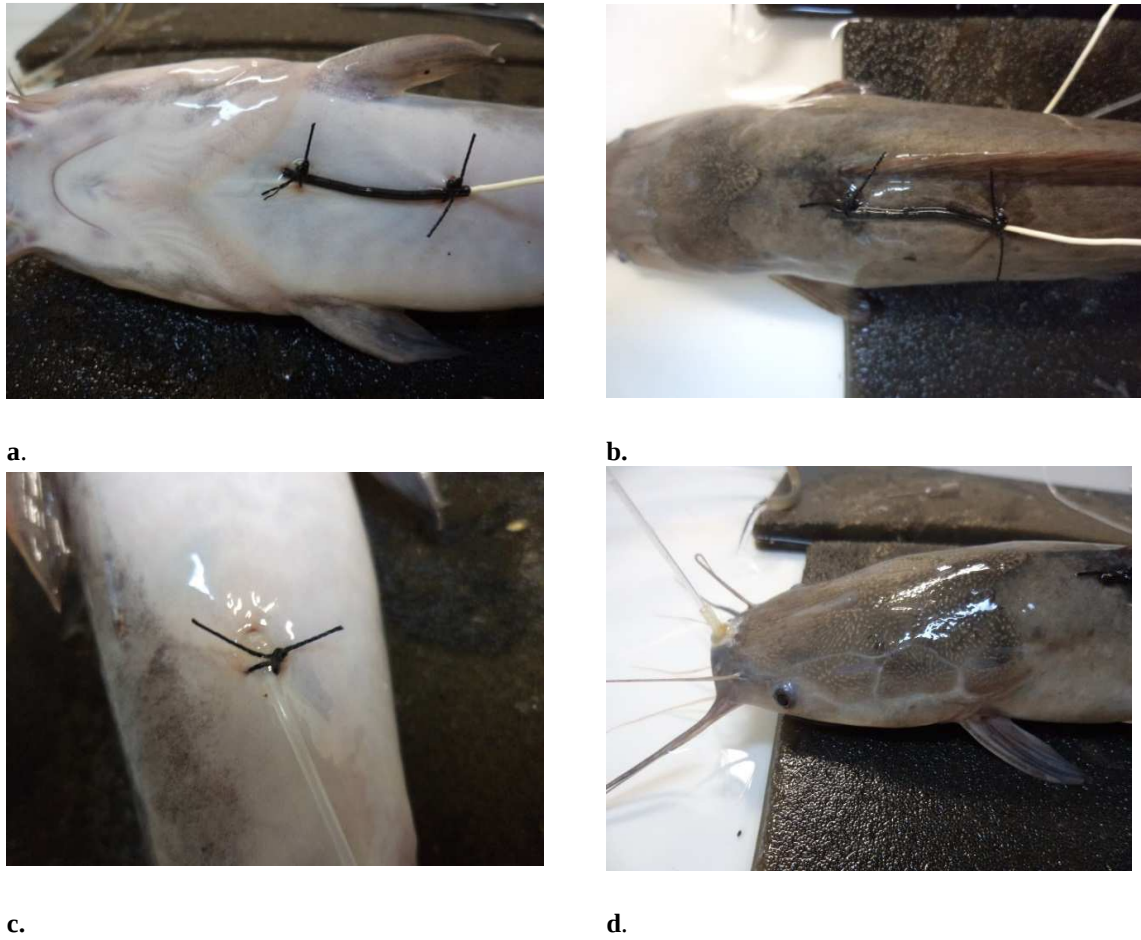


Figura 3. Exemplar de *C. gariepinus* anestesiado após instrumentação. *a;b.* Eletrodos de ECG. *c.* Cânula intraperitoneal *d.* Cânula bucal.

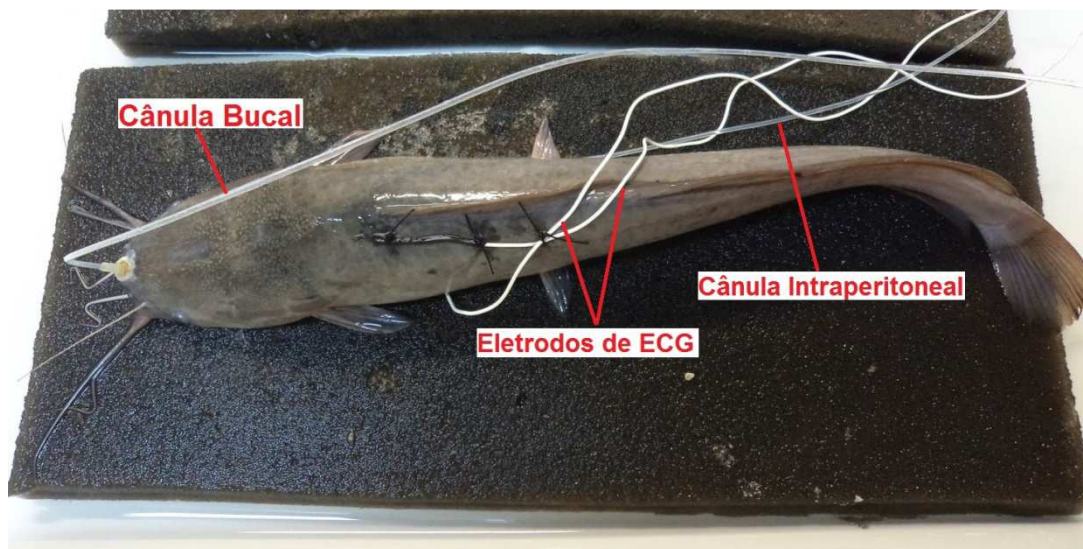


Figura 4. Visão geral de *C. gariepinus* após instrumentação cirúrgica.

Após os procedimentos cirúrgicos (Figura 4), os animais foram transferidos para uma câmara de contensão, que consiste de um cilindro de plástico com furos, posicionado dentro de uma caixa plástica escura com tampa, em sistema de recirculação contínua de água aerada, a 25 ± 1 °C (Figura 5). Esses procedimentos cirúrgicos tiveram duração de aproximadamente 30 minutos e foram realizados durante os finais de tarde, para que os animais pudessem permanecer em recuperação por mais de 12 horas (“overnight”).

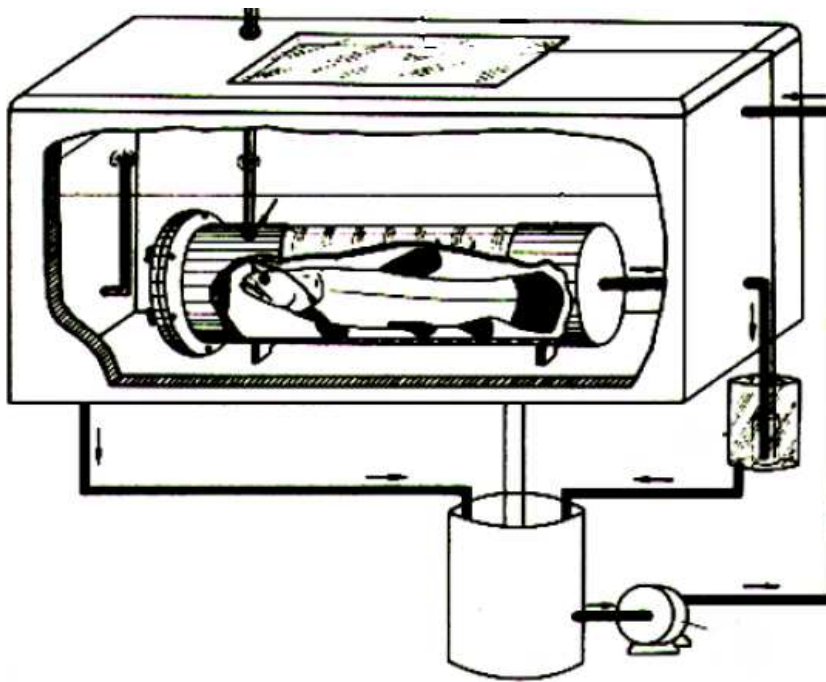


Figura 5. Ilustração da câmara de contensão utilizada para recuperação pós-cirúrgica dos animais (Adaptado de Belão, 2010).

No dia seguinte, após o período de recuperação, os animais foram transferidos para a câmara experimental, que consiste em dois compartimentos sobrepostos, um inferior e outro superior, e um sistema de ventilação localizado acima do compartimento superior. A água do compartimento inferior é constantemente bombeada para o superior e drenada novamente para o inferior através de um sifão, que tem por finalidade manter o nível constante da água no compartimento superior. Os diferentes níveis hipóxicos foram obtidos borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de N_2 no compartimento inferior, de forma que o compartimento superior sempre receberá água hipóxica. O sistema de ventilação tem por finalidade remover os excessos de N_2 e manter a superfície da água em condições similares as encontradas na natureza (Figura 6).

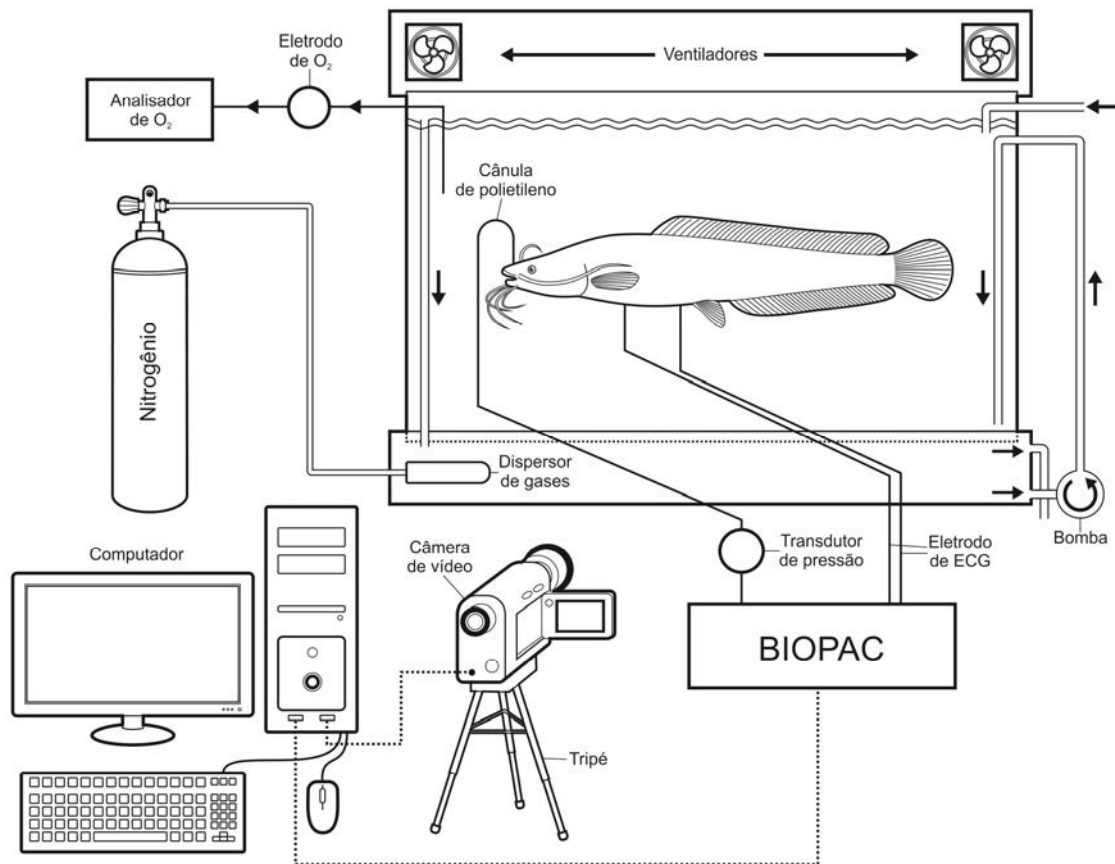


Figura 6. Ilustração do sistema experimental utilizado para obtenção dos dados de f_H , f_R e f_{RA} .

3.3 Parâmetros cardiorrespiratórios

3.3.1 Frequência cardíaca (f_H)

Após o período de recuperação, os eletrodos de ECG foram conectados a um sistema de aquisição de dados BIOPAC[®] MP36 (BIOPAC Systems Inc.) e o sinal registrado continuamente em um computador por meio do software BIOPAC[®] Student Lab PRO 3.7.3. Os valores de f_H foram obtidos pela contagem de complexos QRS do ECG do registro e expressos em bpm. A figura 7 apresenta um trecho de ECG do bagre africano em normóxia.

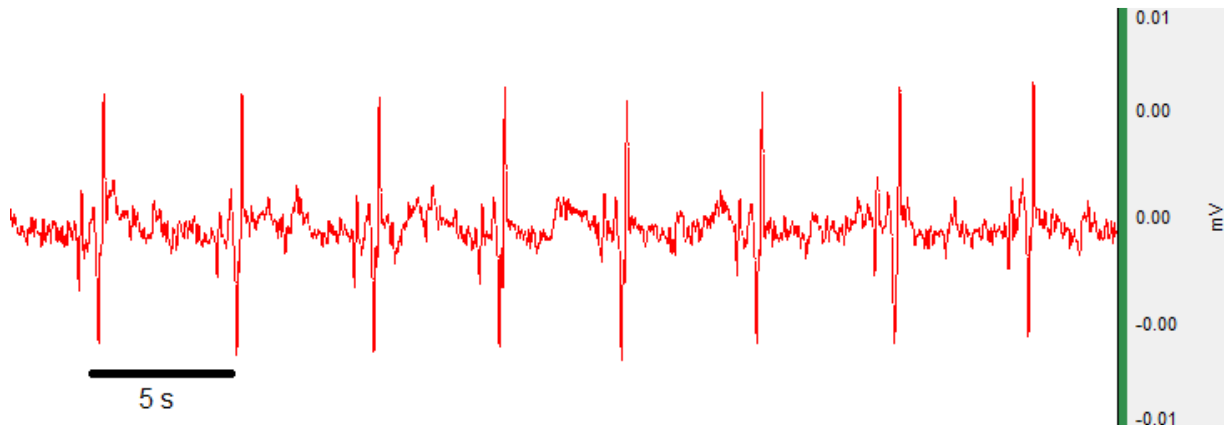


Figura 7. Registro do eletrocardiograma (ECG) do bagre africano (*C. gariepinus*), em normóxia.

3.3.2 Frequência de respiração branquial (f_R) e frequência de respiração aérea (f_{RA})

A cânula bucal foi conectada a um segundo canal do mesmo sistema de aquisição de dados e o sinal foi registrado continuamente em outro canal do software citado acima. Isso permitiu o monitoramento da variação da pressão intra-bucal, sendo assim os valores de f_R foram obtidos pela contagem dos picos de pressão durante o ciclo respiratório e expressos em resp.min^{-1} .

Os animais ficaram livres no sistema experimental, o que permitiu o livre acesso para a subida e tomada de ar atmosférico. Deste modo, a f_{RA} foi obtida pela contagem de subidas do animal para realizar respirações aéreas, monitoradas por uma câmera de vídeo acoplada a um computador, localizado atrás do sistema, onde o animal não percebe a presença do observador, impedindo assim uma movimentação por estresse. Os dados de f_{RA} estão expressos em RA.h^{-1} .

3.4 Protocolo Experimental

Depois do período de recuperação da cirurgia, da conexão dos eletrodos e da cânula bucal, os peixes permaneceram em repouso até que se estabilizassem os registros dos parâmetros cardiorrespiratórios. Então os parâmetros f_H , f_R e f_{RA} foram registrados continuamente em normóxia por uma hora. Em seguida, os peixes foram submetidos à hipóxia com PO_2 de 60 mmHg ($\sim \text{P}_{\text{CO}_2}$ da espécie) e 20 mmHg (hipóxia severa), em que os peixes permaneceram por 1 hora em cada PO_2 e os parâmetros cardiorrespiratórios foram registrados continuamente. A PO_2 da água foi constantemente monitorada por meio de um

analisador de O₂ FAC® 204A (FAC, São Carlos, SP). Ao final deste procedimento, a normóxia foi restaurada por meio do borbulhamento de ar na caixa experimental.

Após uma hora da restauração da normóxia, tempo necessário para que a f_H retornasse aos valores normóxicos, foi injetado suavemente por meio da cânula intraperitoneal 3 mg.kg⁻¹ de Cloridrato de Propranolol (Laboratórios Sigma-Aldrich – diluído em solução de 0,9% de NaCl a 10,0 mg/ml). O propranolol é um bloqueador-beta adrenérgico não-seletivo, que inibe a ação do sistema nervoso autônomo simpático na f_H . Logo após a injeção, a cânula foi lavada com 1 ml de solução salina para assegurar a completa administração do fármaco. Depois de uma hora da injeção de propranolol, tempo necessário para o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos do coração (LEITE et al., 2009; IVERSEN et al., 2010), os parâmetros cardiorrespiratórios foram mais uma vez registrados em normóxia por uma hora. Os peixes foram então submetidos novamente à hipóxia nas mesmas pressões parciais de O₂ descritas anteriormente.

A normóxia foi mais uma vez restaurada e após a f_H se estabilizar, foi injetado 1,2 mg.kg⁻¹ de Sulfato de Atropina (Atropina Fagra® – Farmagráfica do Brasil – Concentração de 10,0 mg/ml), ocasionando um bloqueio autonômico completo (duplo bloqueio) no coração do animal, uma vez que o propranolol ainda exercia seus efeitos e a atropina é um bloqueador muscarínico colinérgico, que inibe a ação do sistema nervoso autônomo parassimpático na f_H . Em seguida, a cânula foi lavada com 1 ml de solução salina para assegurar a completa administração do fármaco. Após 1 hora da injeção, tempo necessário para o bloqueio dos receptores muscarínicos do coração (LEITE et al., 2009; IVERSEN et al., 2010), os parâmetros cardiorrespiratórios foram novamente registrados em normóxia, hipóxia 60 mmHg e 20 mmHg, por uma hora em cada PO₂. Os registros de f_R e ECG foram gravados durante todo experimento, porém a coleta de dados ocorreu apenas 1 minuto antes e após cada RA. Esse protocolo foi realizado em um grupo de nove peixes.

Um teste para verificação dos efeitos da injeção foi realizado com os outros quatro animais. Após os procedimentos cirúrgicos, o período de recuperação e a transferência para a câmara, o protocolo experimental foi realizado exatamente como descrito anteriormente, exceto nos momentos de administração dos fármacos, que foram substituídos pelo volume equivalente de solução salina, também seguido por uma lavagem da cânula com 1 ml da mesma solução, cumprindo sempre os tempos e sequências usados no protocolo anterior.

3.5 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ SEM. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal dos dados. Posteriormente, a análise de variância (ANOVA) “one-way” para medidas repedidas seguida pelo *post-hoc* de Student-Newman-Keuls foi aplicado para identificação de diferenças significativas entre os tratamentos (controle, propranolol e propranolol+atropina) em cada PO_2 para os parâmetros f_H e f_{RA} . Este mesmo foi aplicado para identificar possíveis diferenças significativas entre animais controle e os que receberam solução salina. Para o parâmetro f_R foi realizado uma análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni. Os testes para determinação de normalidade, homogeneidade e os testes de variância foram executados através do programa InStat 3. Os níveis de significância para os valores foram $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Frequência de respiração branquial (f_R) e frequência de respiração aérea (f_{RA})

Os valores de f_R em normóxia e hipóxia de *C. gariepinus*, sem nenhum tratamento (CTR), estão apresentados na Figura 8 e na Tabela 1. Em normóxia, o bagre apresentou uma f_R praticamente constante ($\sim 43,16 \text{ resp.min}^{-1}$), não havendo diferenças significativas entre os valores pré e pós-RA, somente pequenas oscilações entre estas. Nas duas tensões hipóxicas (60 e 20 mmHg) a f_R também se manteve relativamente constante, apenas com as pequenas oscilações antes e após uma RA. Porém, ao comparar esses valores pré-RA com os respectivos valores em normóxia, foi verificada uma diminuição, embora não significativa, da respiração branquial ($\sim 39,12 \text{ resp.min}^{-1}$ e $\sim 34,97 \text{ resp.min}^{-1}$ respectivamente) (Figura 8 e Tabela 1).

Uma diminuição na f_R sugere que o bagre africano esteja em processo de diminuição de consumo de energia decorrente da respiração branquial (SHELTON, 1970). Tal estratégia também indica uma maior dependência da obtenção de O_2 pela respiração aérea do que pela respiração branquial, em situação de hipóxia. Essa hipoventilação branquial em resposta a hipóxia severa foi verificada em *Channa maculata*, *Amia calva*, *P. hypophthalmus* e em outros teleósteos de respiração bimodal, e também já foi verificada em outros estudos com a espécie (YU e WOO, 1985; JOHANSEN et al., 1970; LEFEVRE et al, 2010; GRAHAM, 1997; BELÃO et al., 2011).

A administração de propranolol e a atropina não causou alterações significativas na f_R quando comparado com a mesma condição (pré e pós-RA) e PO_2 no controle (Figura 8 e Tabela 1). Mckenzie e colaboradores (2007, 1995) observaram um declínio acentuado na respiração branquial posteriormente ao bloqueio adrenérgico com propranolol durante hipóxia no jeju, *H. unitaeniatus* (peixe de respiração bimodal) e no esturjão *Acipenser naccarii* (peixe de respiração aquática). Essa resposta sugere a existência de um papel adrenérgico no controle dos quimiorreceptores sensíveis a O_2 e na regulação da respiração branquial desses peixes (MCKENZIE et al., 1995), o que não parece ocorrer em *C. gariepinus*. Os resultados mostraram portanto, que a hipoventilação em resposta a hipóxia nessa espécie não é mediada por receptores adrenérgicos (β_1 , β_2) e muscarínicos colinérgicos.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ S.E.M) dos parâmetros cardiorrespiratórios de *C. gariepinus* em normóxia e hipóxia (60 e 20 mmHg) nos grupos Controle, Propranolol e Pro+Atr.

CONTROLE					
PO₂ (mmHg)	f_{RA} (RA.h⁻¹)	f_R (resp.min⁻¹)		f_H (bpm)	
		pré-RA	pós-RA	pré-RA	pós-RA
140	1,85 $\pm$ 0,73	43,16 $\pm$ 1,74	46,66 $\pm$ 1,95	67,00 $\pm$ 9,30	83,71 $\pm$ 9,40
60	5,42 $\pm$ 1,19	39,12 $\pm$ 1,58	41,13 $\pm$ 2,08	57,49 $\pm$ 6,99	79,23 $\pm$ 7,00
20	7,4 $\pm$ 1,39	34,97 $\pm$ 1,78	37,23 $\pm$ 2,41	59,02 $\pm$ 8,17	84,36 $\pm$ 7,72
PROPRANOLOL					
	f_{RA}	f_R		f_H	
		pré-RA	pós-RA	pré-RA	pós-RA
140	3 $\pm$ 0,48	43,76 $\pm$ 2,39	45,89 $\pm$ 2,96	71,80 $\pm$ 5,75	82,97 $\pm$ 5,61
60	4,5 $\pm$ 0,89	40,09 $\pm$ 2,74	42,58 $\pm$ 2,38	66,24 $\pm$ 7,69	83,40 $\pm$ 6,07
20	5 $\pm$ 0,75	33,17 $\pm$ 2,41	35,86 $\pm$ 2,54	63,93 $\pm$ 7,45	82,66 $\pm$ 5,78
PRO+ATR					
	f_{RA}	f_R		f_H	
		pré-RA	pós-RA	pré-RA	pós-RA
140	2 $\pm$ 0,92	42,90 $\pm$ 3,33	45,94 $\pm$ 1,57	99,35 $\pm$ 3,04	97,80 $\pm$ 2,64
60	3,85 $\pm$ 0,91	38,36 $\pm$ 3,23	41,08 $\pm$ 3,42	92,20 $\pm$ 3,67	95,39 $\pm$ 2,62
20	5,42 $\pm$ 1,04	35,94 $\pm$ 1,94	38,51 $\pm$ 2,60	94,26 $\pm$ 2,74	96,17 $\pm$ 2,26

A frequência de respirações aéreas (f_{RA}) dos animais controle está apresentada na Figura 9 e na Tabela 1. As respirações aéreas ocorreram em todas as PO₂ do experimento (140, 60 e 20 mmHg), mas em normóxia (140 mmHg) a f_{RA} foi bem reduzida ($\sim$ 1,85 RA.h⁻¹). Essa baixa f_{RA} permite classificar *C. gariepinus* como respirador aéreo facultativo, pois apresentam brânquias capazes de extrair O₂ suficiente para manter seu metabolismo aeróbico em condições de normóxia, corroborando com o que foi observado em outros estudos realizados com essa espécie (BELÃO et al., 2011).

Belão e colaboradores (2011) realizaram experimentos em respirometria fechada e determinaram a P_cO₂ de *C. gariepinus* em aproximadamente 60 mmHg, ou seja, abaixo dessa PO₂ o bagre não é capaz de manter as demandas de O₂ apenas pela respiração branquial e necessita acionar seu mecanismo de respiração acessória. Esse valor é elevado quando comparado a outros teleósteos, tanto de respiração exclusivamente aquática quanto de

respiração bimodal, e sugere que essa espécie é mais dependente do O₂ obtido pela respiração aérea que a maioria dos teleósteos de respiração bimodal (BELÃO, et al. 2011) (Tabela 2).

Isso justifica o aumento da f_{RA} ocorrido em hipóxia 60 mmHg (próxima a P_{cO_2}), e também a elevação mais acentuada desse parâmetro quando os animais eram submetidos a hipóxia 20 mmHg, demonstrando que a dependência da obtenção de O₂ pela respiração aérea aumenta conforme a hipóxia aquática se intensifica (Figura 9 e Tabela 1). Esse aumento da f_{RA} em hipóxia foi provavelmente resultado da estimulação de quimiorreceptores sensíveis ao O₂, os quais informam o sistema nervoso central sobre a hipóxia ou hipoxemia, desencadeando tais respostas. (SMATRESK et al, 1986; SMATRESK et al, 1988; MCKENZIE et al, 1991).

Tanto a administração de propranolol quanto a de atropina (duplo bloqueio) alteraram significativamente a f_{RA} em relação ao controle apenas durante a hipóxia mais severa (20 mmHg) (Figura 9 e na Tabela 1). Tal modificação apenas pode ter sido desencadeada pela alteração do débito cardíaco induzida por tais fármacos, pois caso houvesse participação de receptores adrenérgicos β_1 , β_2 e receptores muscarínicos colinérgicos (que são bloqueados por estes fármacos) nos mecanismos efetores que promovem a respiração aérea haveria modificações da f_{RA} nas outras PO_2 .

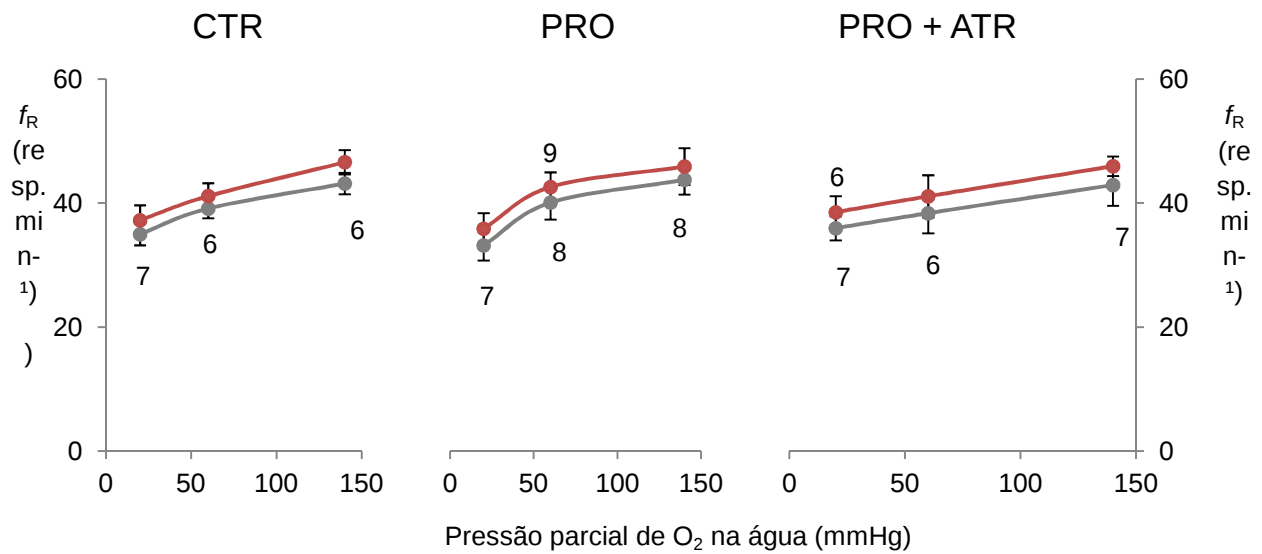


Figura 8. Frequência de respiração branquial (f_R – resp. min^{-1}) durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos controle (CTR), propranolol (PRO) e duplo bloqueio (PRO+ATR). Linhas cinzas indicam f_R pré-RA e linhas vermelhas indicam f_R pós-RA. O número localizado próximo a cada ponto do gráfico refere-se à quantidade de réplicas (N). Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA seguido do *post-hoc* de Bonferroni. Nenhuma diferença significativa entre grupos.

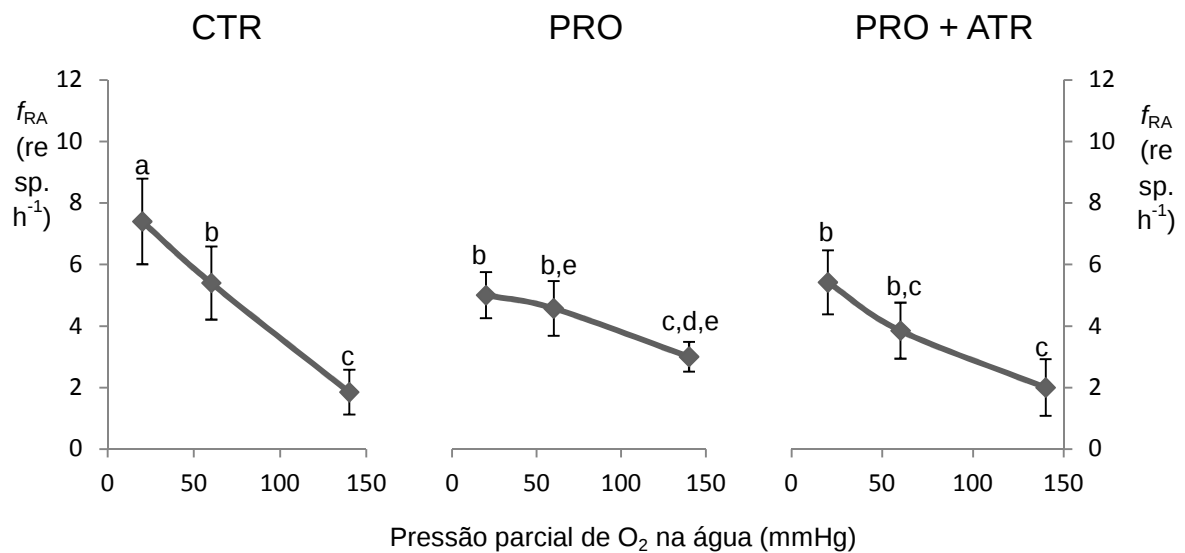


Figura 9. Frequência de respirações aéreas (f_{RA} – resp. h^{-1}) durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos controle (CTR), propranolol (PRO) e duplo bloqueio (PRO+ATR). Semelhança entre letra superscrita indica que não há diferença significativa entre os grupos. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA para medidas repetidas seguido de *post-hoc* de Student-Newman-Keuls ($N = 7$).

Tabela 2. Comparação dos valores de P_{CO_2} de *C. gariepinus* com os valores de outros respiradores bimodais Siluriformes e não Siluriformes, e teleósteos de respiração exclusivamente aquática (Adaptado de Belão, et al 2011).

Especie	P_{CO_2} (mmHg)	Referência
Respiradores Bimodais		
Siluriformes		
<i>Hoplosternum littorale</i>	50	Affonso e Rantin (2005)
<i>Hypostomus regani</i>	34	Mattias et al. (1998)
Cascudo, <i>Rhinelepis strigosa</i>	24	Takasuki (1998)
<i>Hypostomus plecostomus</i>	33	Perna e Fernandes (1996)
<i>Heteropneustes fossilis</i>	50	Hughes e Singh (1971)
Bagre africano, <i>C. gariepinus</i>	60	Belão et al. (2011)
Outros		
Jeju, <i>H. unitaeniatus</i>	40	Oliveira et al. (2004)
<i>Channa maculata</i>	40	Yu e Woo (1985)
<i>Synbranchus marmoratus</i>	40	Bicudo e Johansen (1979)
<i>Piabucina festae</i>	25	Graham et al (1977)
Respiradores aquáticos		
Dourado, <i>Salminus maxillosus</i>	42	Souza et al. (2001)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	34	Rantin et al. (1998)
Tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i>	18	Fernandes e Rantin (1994)
Traíra, <i>Hoplias malabaricus</i>	20	Rantin et al. (1992)
Trairão, <i>Hoplias lacerda</i>	35	Rantin et al. (1992)

4.2 Frequência de cardíaca (f_H) e Controle autonômico do coração

Os dados foram coletados 1 minuto antes e após cada RA, em normóxia, hipóxia 60 mmHg e de 20 mmHg, nos grupos: controle (CTR), propranolol (PRO) e duplo bloqueio (PRO+ATR). No grupo controle, tanto em normóxia quanto em hipóxia (60 e 20 mmHg), foi observada a ocorrência de taquicardia logo após as RA's. Essa taquicardia foi observada pela primeira vez no muçum, *S. marmoratus* (JOHANSEN, 1966), sendo uma resposta praticamente padrão nos peixes de respiração aérea, que inclusive já foi verificada em *C. gariepinus*, em estudos realizados por Belão e colaboradores (2011) (Tabela 3).

Entretanto, ao contrário do observado por esses autores, os animais não exibiram bradicardia hipóxica antes das RA's. Farrell (2007) propôs que peixes de respiração aérea não deverão apresentar bradicardia hipóxica caso sua “estratégia de respiração aérea” lhes permita manter a extração de O_2 em níveis semelhantes aos de normóxia. Essa ausência de bradicardia hipóxica também foi relatada no jeju, *H. unitaeniatus*, o animal manteve sua f_H próxima aos valores em normóxia, exibindo apenas taquicardia decorrente de RA's (MCKENZIE et al.,

2007). Esses dados reforçam a hipótese proposta por Farrel (2007), porém essa hipótese ainda não foi testada.

Tabela 3. Comparação entre a frequência cardíaca (f_H) pré e pós- respiração aérea (RA) de *C. gariepinus* com outros peixes de respiração bimodal. Letra superscrita indica durante hipóxia.

Espécie	Temp (°C)	f_H (bpm)		Referencia
		pré-RA	pós-RA	
<i>S. marmoratus</i>	20-25	6	30	Johansen (1966)
<i>Ancistrus chagresi</i>	25-27	132	156	Graham (1983)
<i>Monopterus albus</i>	25-27	25	42	Graham et al. (1995)
<i>Monopterus cuchia</i>	20	14	34	Lomholt e Johansen (1976)
<i>Anabas testudineus</i>	25	~25 ^a	~60 ^a	Singh e Hughes (1973)
<i>H. unitaeniatus</i>	26	26 ^a	48 ^a	McKenzie et al. (2007)
<i>C. gariepinus</i>	25	30 ^a	52 ^a	Belão et al.(2011)

Os efeitos da injeção de propranolol na f_H estão representados na Figura 10 e na Tabela 1. O propranolol é um antagonista β -adrenérgico não seletivo, ou seja, bloqueia os receptores β_1 e β_2 . (FINKEL et al, 2010). A administração de propranolol geralmente induz um decréscimo da f_H , que causa uma diminuição do débito cardíaco e da pressão arterial (FINKEL et al, 2010). Porém, o propranolol também pode ocasionar uma vasoconstrição sistêmica, a qual recruta reservatórios venosos, aumentando o VS e consequentemente o débito cardíaco (f_H multiplicada pelo VS). Esta vasoconstrição ocorre por meio do bloqueio dos adrenorreceptores β_2 , cuja expressão varia entre espécies.

Uma possível explicação para o decréscimo na f_H não ter sido observado é que *C. gariepinus* apresente um tônus adrenérgico extremamente baixo, visto que é o caso de algumas espécies de peixes, como *Pagothenia borchgrevinki*, *Pagothenia bernacchii*, *Thunnus thunnus*, *Katsuwonus pelamis*, *Dicentrarchus labrax*, *Carassius auratus*, dentre outras, sendo assim um bloqueio adrenérgico (propranolol) não resultaria em alterações significativas da f_H (AXELSSON et al., 1992; KEEN et al., 1995; IVERSEN et al, 2010; CAMERON, 1979).

O duplo bloqueio autonômico aumentou significativamente e aboliu todas as variações na f_H que acompanhavam cada RA (Figura 10 e Tabela 1). Na maioria dos vertebrados, a regulação da atividade cardíaca ocorre por meio do equilíbrio entre “inputs” colinérgicos

(parassimpático) e adrenérgicos (simpático) do sistema nervoso autônomo. Um aumento no tônus colinérgico (vagal) e/ou diminuição do tônus adrenérgico reduz a frequência e força de contratilidade cardíaca, enquanto o contrário eleva essas variáveis (GRAHAM, et al., 1995). Esse autor e seus colaboradores afirmam que alterações de tônus podem ser induzidas por estímulos de estresse, por hipóxia e/ou por “inputs” tanto de mecano como de quimiorreceptores.

Alguns estudos têm indicado que a taquicardia pós-RA seja mediada por estimulação de quimio e mecanorreceptores na câmara buco-faríngeal durante a tomada de ar, que conduz a uma inibição do tônus vagal no coração (GRAHAM, et al. 1995; MILSOM, 1990; SMATRESK, 1988, 1990). Os resultados obtidos corroboram esta hipótese, uma vez que o bloqueio adrenérgico realizado pelo propranolol não eliminou essa taquicardia. Já após o duplo bloqueio autonômico (estabelecido com a administração de atropina) as variações da f_H foram abolidas, indicando um predomínio do tônus colinérgico na regulação da atividade cardíaca associada a respiração aérea.

Na enguia, *Monopterus albus*, o bloqueio farmacológico dos receptores muscarínicos e adrenérgicos mostraram que a f_H baixa apresentada pelos animais enquanto estavam na água era devido a um tônus colinérgico alto que inibe as células marcapasso do coração e que a taquicardia associada com a inflação da cavidade bucal era principalmente resultado da diminuição desse tônus inibitório (IVERSEN et al., 2011). Em teleósteos o predomínio do tônus colinérgico sobre a f_H é amplamente verificado (ALTIMIRAS et al 1997; AXELSSON et al. 1992; MCKENZIE et al., 2007; LEITE et al., 2009, SANDBLOM e AXELSSON, 2011).

A função da taquicardia pós-RA ainda permanece desconhecida. McKenzie e colaboradores (2007) em estudos realizados com o peixe, *H. unitaeniatus*, em normóxia e hipóxia, verificaram a ocorrência de taquicardia pós-RA, porém não observaram diferença entre a f_{RA} de animais controle e animais que estavam sob efeito de atropina e propranolol (duplo bloqueio autonômico), ou seja, não exibiam ajustes de f_H . Esses autores sugeriram que os ajustes de f_H que acompanham cada RA possam facilitar a captação de oxigênio no ORA apenas em condições em que a demanda metabólica seja alta, por exemplo, durante o exercício aeróbico.

Esses autores também evidenciaram a existência de componentes comportamentais na subida a superfície para respirar ar. Por exemplo, o medo de predação (*fear of predation*) pode ser um fator importante e que influencie os padrões de atividade dos peixes de respiração bimodal na superfície, como previamente proposto por Smith e Kramer (1986). Sendo assim,

as mudanças na f_H durante a respiração aérea podem ser reflexo de “inputs” comportamentais ligados à aproximação do peixe a superfície da água.

Além disso, Graham e colaboradores (1995) propuseram que as variações cíclicas na f_H que acompanham a respiração aérea sejam homólogas a arritmia sinusal respiratória (RSA) de mamíferos. Na RSA desses animais a f_H varia de acordo com o ciclo ventilatório, durante a inspiração a atividade nos neurônios pré-ganglionares é inibida e então o tônus vagal parassimpático inibitório sobre o coração diminui e consequentemente a f_H sobe. O tônus parassimpático é posteriormente desinibido, produzindo uma bradicardia na expiração (JORDAN e SPYER, 1987; TAYLOR et al., 1999). Acredita-se que estas alterações no tônus vagal melhorem a eficiência das trocas gasosas pulmonares por combinar a perfusão com a ventilação dentro de cada ciclo respiratório (GIARDINO et al., 2003).

Por esse fato, Mckenzie e seus colaboradores não descartaram a hipótese de os ajustes de f_H associados a RA influenciarem a f_{RA} e a captação de O_2 no jejú. Pois ressaltaram que é muito difícil detectar o papel da RSA na otimização das trocas gasosas em mamíferos (GIARDINO et al., 2003), e por esse motivo não se pode desconsiderar tal pressuposto e que essa é uma área interessante para futuras pesquisas em peixes de respiração aérea.

Nossos resultados mostraram que os animais realizaram menos respirações aéreas após a realização dos bloqueios autonômicos em hipóxia severa (20 mmHg), considerando que tais bloqueios aumentaram o débito cardíaco (dado que débito cardíaco = $f_H \times VS$), é plausível que essa alteração aumente a perfusão sanguínea de todos os tecidos do corpo, favorecendo tanto a captação de O_2 no ORA quanto a distribuição deste gás pelo organismo, suprimindo melhor a demanda metabólica dos peixes, o que está de acordo com o proposto por Johansen (1966, 1970). Um aumento de débito cardíaco concomitante com a taquicardia pós-RA já foi observado na enguia, *M. albus* e no muçum, *S. marmoratus* (IVERSEN et al., 2011; SKALS et al., 2006).

No duplo bloqueio a f_H aumentou e permaneceu constante, o que explica a menor f_{RA} em hipóxia severa quando comparada a essa mesma condição no grupo controle. Apesar de não ter alterado significativamente a f_H , é possível que o propranolol tenha causado uma vasoconstrição sistêmica nos animais, gerando um aumento do débito cardíaco por elevação do VS, o que justifica a menor f_{RA} em hipóxia severa quando comparada a mesma condição no controle (Figura 10 e Tabela 1).

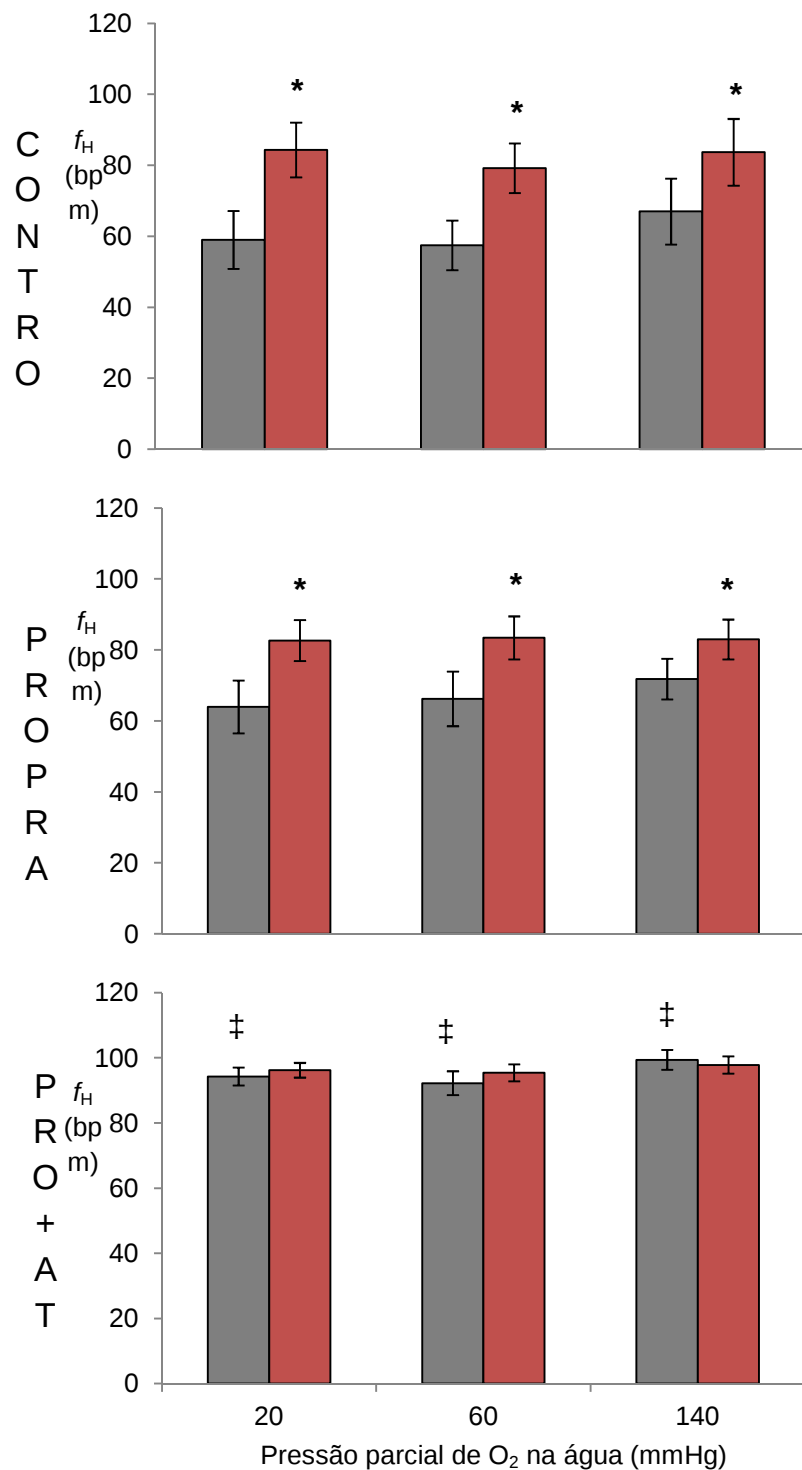


Figura 10. Frequência cardíaca (f_H - bpm) pré (cinza) e pós (vermelho) -RA, durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos controle, propranolol e duplo bloqueio (PRO+ATR). Um asterisco indica diferença significativa para com o valor da f_H pré-RA dos animais sob o mesmo tratamento e sob a mesma PO_2 . Uma adaga dupla indica diferença significativa para com a f_H de animais não tratados (controle), sob a mesma PO_2 e sob a mesma condição em relação à respiração aérea (pré ou pós-RA). Os testes estatísticos utilizados foram : ANOVA para medidas repedidas seguido de post-hoc de Student-Newman-Keuls (N = 7).

4.3 Verificação dos efeitos da injeção

Não existem diferenças significativas em nenhum dos parâmetros cardiorrespiratórios (f_H , f_R e f_{RA}) entre os peixes controle (CTR) e tratados com solução salina (Salina P e Salina A) (Figuras 11, 12 e 13). A taquicardia pós-RA foi observada, assim como nos animais Controle e Propranolol do outro protocolo experimental. Nas tensões 140 e 60 mmHg do grupo Salina P essa taquicardia pós-RA não foi estatisticamente significativa, provavelmente devido ao número reduzido de réplicas, entretanto é possível observar nitidamente um aumento da f_H pós-RA no gráfico. Isso demonstra que as variáveis observadas nos demais testes são seguras, e não foram induzidas pelo estresse da aplicação dos fármacos e/ou pelo veículo que os dissolveram.

Mas, apesar dos nossos resultados, mais estudos são necessários, tanto com a própria espécie, quanto com outras espécies de respiração bimodal, para poder afirmar se de fato a taquicardia pós-RA influencia a eficiência da respiração aérea, ou se essa é uma adaptação espécie-específica, ou ainda se essa influência depende de algum outro fator ambiental ou fisiológico.

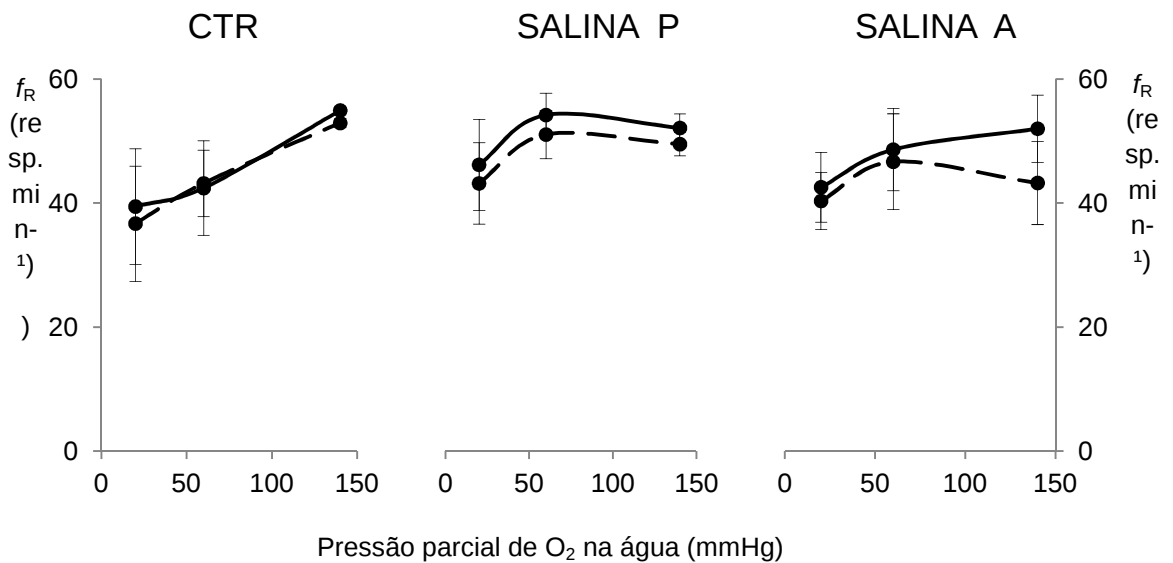


Figura 11. Frequência de respiração branquial (f_R – resp. min⁻¹) durante as pressões parciais de O₂ da água nos grupos controle (CTR), Salina P (equivalente a injeção de propranolol) e Salina A (equivalente a injeção de atropina). Linhas tracejadas indicam f_R pré-RA e linhas contínuas indicam f_R pós-RA. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA seguido do *post-hoc* de Bonferroni. Nenhuma diferença significativa entre grupos (N= 4).

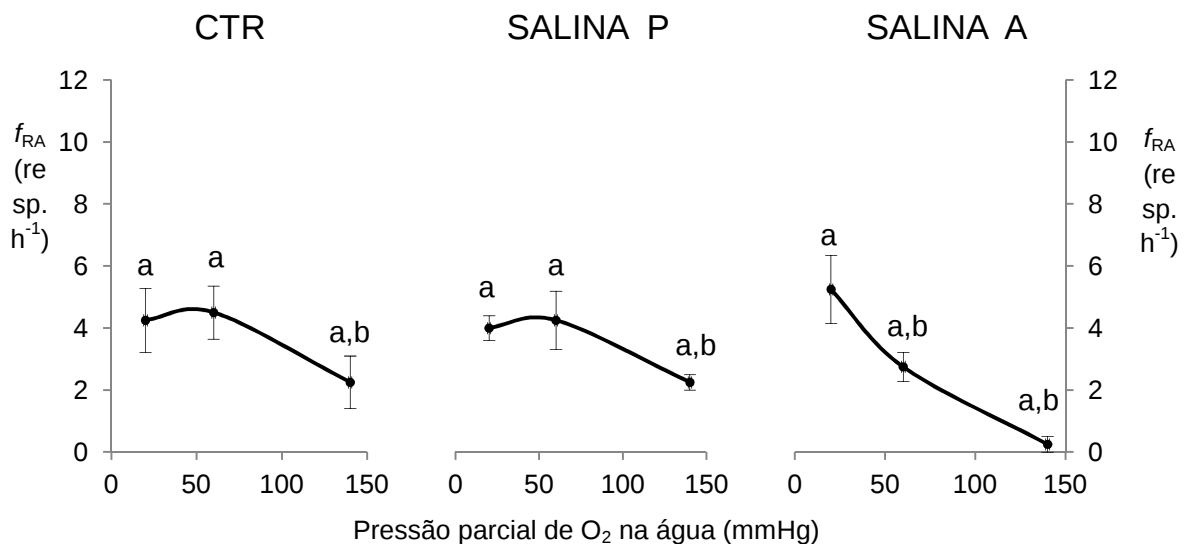


Figura 12. Frequência de respiração aérea (f_{RA} – resp. h⁻¹) durante as pressões parciais de O₂ da água nos grupos controle (CTR), Salina P (equivalente a injeção de propranolol) e Salina A (equivalente a injeção de atropina). Semelhança entre letra superscrita indica que não há diferença significativa entre os grupos. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA para medidas repetidas seguido de *post-hoc* de Student-Newman-Keuls (N = 4).

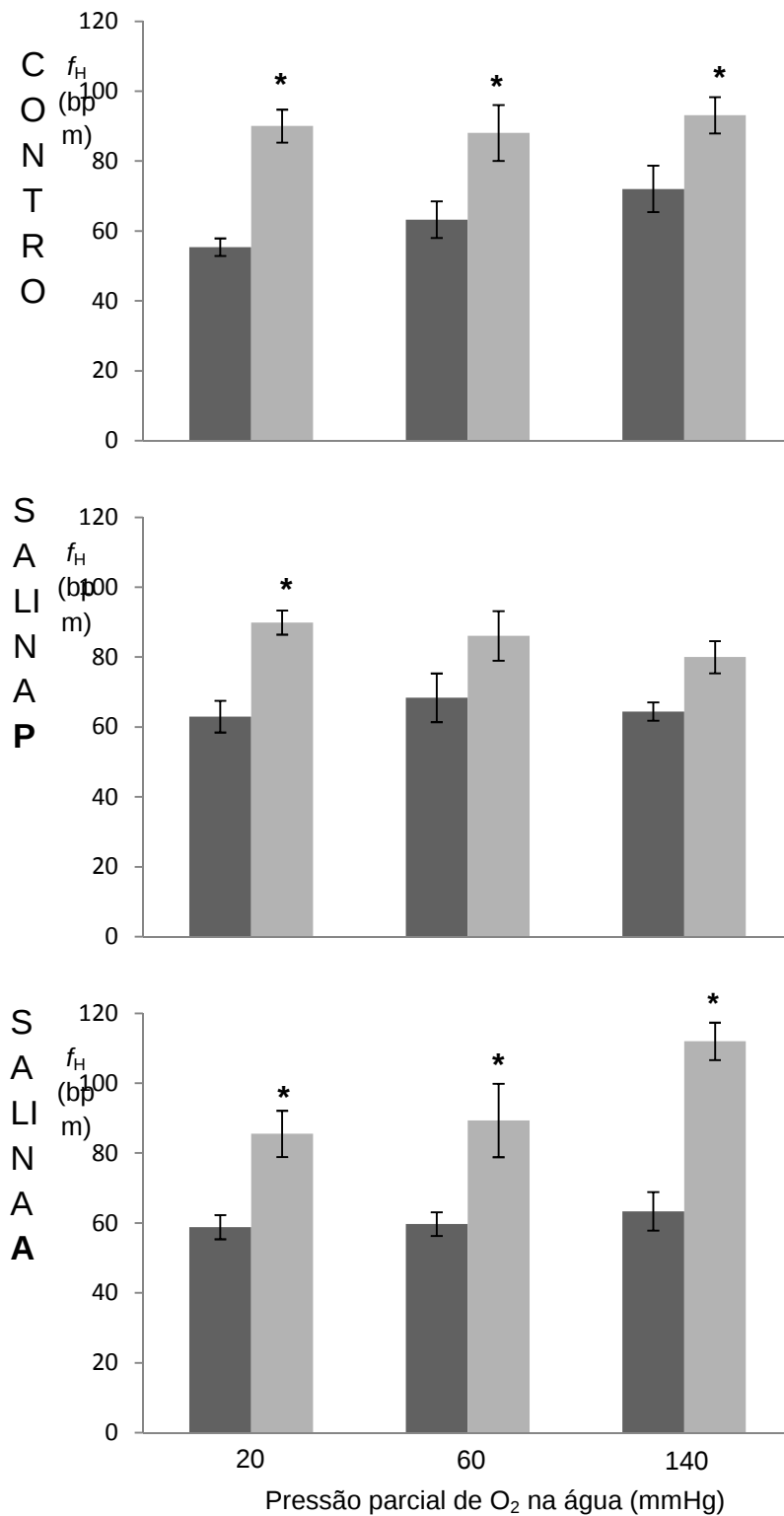


Figura 13. Frequência cardíaca (f_H - bpm) pré (cinza escuro) e pós (cinza claro) - RA durante as pressões parciais de O_2 da água nos grupos Controle, Salina P (equivalente a injeção de propranolol) e Salina A (equivalente a injeção de atropina). Um asterisco indica diferença significativa para com o valor da f_H pré-RA dos animais sob o mesmo tratamento e sob a mesma PO_2 na água. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA para medidas repedidas seguido de *post-hoc* de Student-Newman-Keuls (N = 4).

5 CONCLUSÃO

- O bagre africano como um respirador aéreo facultativo, aumenta a respiração aérea em detrimento a respiração branquial frente a hipóxia aquática.
- A regulação da f_R e da f_{RA} não é mediada por receptores adrenérgicos (β_1 , β_2) e muscarínicos colinérgicos nessa espécie.
- A taquicardia pós-RA é regulada predominantemente pelo tônus colinérgico em *C. gariepinus*.
- Os bloqueios autonômicos indicam que modificações do débito cardíaco alteram a f_{RA} , sugerindo assim que as alterações de f_H associadas a respiração aérea podem influenciar a eficiência da mesma.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO E.G; RANTIN F.T. Respiratory responses of the air breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. **Comp Biochem Physiol** v. 141, p.275–280, 2005.

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. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.16, n. 1, p. 259 - 263, 1999.

ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L.; AXESSON, M. Cholinergic and adrenergic tones in the control of the heart rate in teleosts. How should they be calculated? **Comp. Biochem. Physiol**. v. 118A, p. 131–139, 1997.

AXELSSON, M.; DAVISON, W.; FORSTER, M.E.; FARRELL, A.P. Cardiovascular responses of the red-blooded antarctic fishes *Pagothenia bernacchii* and *P. borchgrevinki*. **J. Exp. Biol**. v. 167, p.179– 201, 1992.

BAMFORD, O.S. Oxygen reception in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp.Biochem. Physiol**. v.11, p.131-137, 1974.

BELÃO, T. **Respostas cardiorrespiratórias do teleosteo de respiração aérea, *Clarias gariepinus*, exposto à hipóxia gradual**. 50 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

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.

BERNER, R. A.; VANDENBROOKS, J. M.; WARD, P.D. Oxygen and Evolution. **Science**. v. 316, p. 557-558, 2007.

BICUDO, J.E.W.P, JOHANSEN, K. Respiratory gas exchange in the air breathing fish, *Synbranchus marmoratus*. **Environ Biol Fishes**. v. 4, p.55–64, 1979.

BURLESON, M. L.; SMATRESK, N. J. Effects of sectioning cranial nerves IX and X on cardiovascular and ventilatory reflex responses to hypoxia and NaCN in channel catfish. **J. Exp. Biol.**, v. 154, p.407-420, 1990.

BUTLER, P. J.; TAYLOR, E. W. Response of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) to slowly induced and rapidly induced hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 39A, p. 307–323, 1971.

CARTER, G.S. Air breathing. In: Brown, M. (ed) **Physiology of fishes**. New York: Academic Press, 1957. p 65-79.

CAMERON, J.S. Autonomic nervous tone and regulation of heart rate in the goldfish *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v.63, P.341–349, 1979.

CHAPMAN, L.J.; MCKENZIE, D.J. Behavioral responses and ecological consequences. In: Farrell, A.P. and Brauner, C.J. (eds). **Fish Physiology: Hypoxia**. San Diego: Academic Press, 2009, p. 25-77.

CHEN, K.; COLE, R.B.; REES, B.B. Hypoxia-induced changes in the zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscle proteome. **J. Proteomics**. v. 78, p. 477-485, 2013.

DE GRAAF, G.; JANSSEN, H. Artificial Reproduction and Pond Rearing of the African Catfish *Clarias gariepinus* in Sub-Saharan África – A Handbook. **FAO Fisheries Technical Paper**. v. 362, 1996.

DONNELLY, B.G. Aspects of behaviour in the catfish *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) during periods of habitat desiccation. **Arnoldia Rhodesia** v. 6, p. 1–8, 1973.

FARRELL, A.P. Cardiovascular events associated with air breathing in two teleosts, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Arapaimas gigas*. **Can.J. Zool.** v. 56, p. 953-958, 1978.

FARRELL, A. P. Tribute to P. L. Lutz: a message from the heart – why hypoxic bradycardia in fishes? **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 1715-1725, 2007.

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, p. 339–346, 1994.

FINKEL, R.; CUBEDDU, L.X.; CLARK, M.A. **Farmacologia Ilustrada** 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

FRASER, J.; MELLO, L.V.; WARD, D.; REES, H.H.; WILLIAMS, D.R.; FANG, Y.; BRASS, A.; GRACEY, A.Y.; CROSSINS, A.R. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 103, n. 8, p. 2977–2981, 2006.

FRITSCHÉ, R.; NILSSON, S. Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. In: Rankin, J.C.; Jensen, F.B. (eds). **Fish Ecophysiology**, Chapman & Hall: London, 1993. p.180-206.

GIARDINO, N. D.; GLENNY, R. W.; BORSON, S.; CHAN, L. Respiratory sinus arrhythmia is associated with efficiency of pulmonary gas exchange in healthy humans. **Am. J. Physiol.** v.284, p. 1585-1591, 2003.

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.

GRAHAM, J.B.; KRAMER, D.L.; PINEDA, E. Respiration of the air breathing fish *Piabucina festae*. **J Comp Physiol.** v.122, p. 295–310, 1977.

GRAHAM, J.B.; ROSENBLATT, R.H.; GANS, C. Vertebrate air breathing arose in fresh waters and not in the ocean. *Evolution.* v. 32, n. 2, p. 459-463, 1978.

GRAHAM, J.B. The transition to air breathing in fishes: II. Effects of hypoxia acclimation on the bimodal gas exchange of *Ancistrus chagresi* (Loricariidae). *J. Exp. Biol.* v. 102, p. 157-173, 1983.

GRAHAM, J.B.; LAI, N.C.; CHILLER, 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.

GRAHAM, J.B. **Air breathing fishes: evolution, diversity and adaptation**. San Diego: Academic Press, 1997. 299 p.

HEE, N.H. Two new species of catfishes of the genus *Clarias* from Borneo (Teleostei: Clariidae). **The Raffles Bulletin of Zoology**. v. 47, p. 17-32, 1999.

HUGHES, G. M; SINGH, B.N. Gas exchange with air and water in an air-breathing catfish, *Saccobranhus* (= *Heteropneustes*) *fossilis*. **J Exp Biol**. v. 55, p.667–682, 1971.

HUGHES, G. M.; SHELTON, G. Respiratory mechanisms and their nervous control in fish. **Adv. comp. Physiol. Biochem**. v.1, p. 275-374, 1962.

IVERSEN, N.K ; MCKENZIE, D.J.; MALTE, H.; WANG, T. Reflex bradycardia does not influence oxygen consumption during hypoxia in the European eel (*Anguilla anguilla*). **J. Comp. Physiol. B**. v. 180, p.495–502, 2010.

JOHANSEN, K. Air breathing in the teleost *Symbranchus marmoratus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 18, p. 383-395, 1966.

JOHANSEN, K.; Air breathing in fishes. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. (eds). **Fish Physiology**. vol IV. San Diego: Academic Press, 1970. p.361- 411.

JOHANSEN, K.; HANSON, D.; LENFANT, C. Respiration in a primitive air breather, *Amia calva*. **Respiration Physiology**. v. 9, p.162-174, 1970.

JORDAN, D.; SPYER, K. M. Central mechanisms mediating respiratory-cardiovascular interactions. In: Taylor, E.W. (ed) **Neurobiology of the Cardiorespiratory System**. Manchester: Manchester University Press, 1987. p. 322-341

JUNK, W.J.; SOARES, G.M.; CARVALHO, F.M. Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (lago do Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. **Amazoniana**. v. 7, p. 397, 1983.

KEEN, J.E.; AOTA, S.; BRILL, R.W.; FARRELL, A.P.; RANDALL, D.J. Cholinergic and adrenergic regulation of heart rate and ventral aortic pressure in two species of tropical tuna, *Katsuwonus pelamis* and *Thunnus albacares*. **Can. J. Zool**. v.73, p.1681–1688, 1995.

LEFEVRE, S.; HOUNG, D.T.T.; WANG, T.; PHUONH, N.T.; BAYLEY, M. Hypoxia tolerance and partitioning of bimodal respiration in the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Comp. Biochem. Physiol., Part A**. v.158, p. 207–214, 2010.

LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALIIN, A. L.; MILSON, W.K.; RANTIN, F. T. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **J. Comp. Physiol. A**. v. 193, p. 1001-1011, 2007.

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. Gas exchange in the amphibious fish *Amphipnous cuchia*. **J. Comp. Physiol.** v. 107, p. 141-157, 1976.

MATTIAS, A.T; RANTIN, F.T; FERNANDES, M.N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comp Biochem Physiol.** v.129, p.311–315, 1998.

MCKENZIE, D. J.; BURLESON, M.L.; RANDALL, D.J. The effects of branchial denervation and pseudobranch ablation on cardioventilatory control in an air-breathing fish. **J. Exp Biol.** v. 161, p. 347-365, 1991.

MCKENZIE, D. J., TAYLOR, E. W., BRONZI, P. AND BOLIS, L. Aspects of cardioventilatory control in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). **Respir. Physiol.** v. 100, p. 44-52, 1995.

MCKENZIE, D.J.; CAMPBELL, H.A.; TAYLOR, E.W.; MICHELL, 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, *Hoplerthrinus unitaeniatus*. **J. Exp. Biol.** v. 210, p. 4224-4232, 2007.

MICHELI-CAMPBELL, M.A.; CAMPBELL, H.A.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The relationship between O₂ chemoreceptors, cardio-respiratory reflex and hypoxia tolerance in the neotropical fish *Hoplias lacerdae*. **Comp. Biochem. Physiol, Part A**. v 154, p.224–232, 2009.

MILLI, P.S.M.; TEIXEIRA, R.L. Notas ecológicas do bagre-africano, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Teleostei, Clariidae), de um córrego Sudeste do Brasil. **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão**. n. 19, p. 45-51, 2006.

MILSOM, W. K. Mechanoreceptor modulation of endogenous respiratory rhythms in vertebrates. **Am. J. Physiol.** v. 259, p. 898–910, 1990.

MILSOM, W. K. Control of breathing in fish: role of chemoreceptors. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. **Physiology and Biochemistry of the Amazon**, Manaus, p. 359-377, 1996.

NILSSON, S.; HOLMGREN, S.; FANGE, R. Autonomic nerve functions in fish. In: Rankin, J.C.; Pitcher, T.J.; Duggan, R.T. (eds) **Control process in fish physiology**. New York: Springer, 1983. p 1-22.

OLIVEIRA, R.D; LOPES, J.M; SANCHES, J.R; KALININ, A.L; GLASS, M.L; RANTIN F.T. Cardiorespiratory response 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.

PERNA, S.A; FERNANDES, M.N. Gill morphometry of the facultative air-breathing loricariid fish, *Hypostomus plecostomus* (Walbaum) with special emphasis on aquatic respiration. **Fish Physiol Biochem.** v. 15, p.213–220, 1996.

PERRY, S. F.; DESFORGES, P. R. Does bradycardia or hypertension enhance gas transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 144 A, p. 163–172, 2006.

PROSSER, C.L. Oxygen: respiration and metabolism. In Prosser, C.L (ed). **Comparative Animal Physiology**. Washington: W.B. Saunders Company, 1973, 165-206.

PURVES, W.; SADAVA, D.; ORIAN, G.; HELLER, H. **Vida: a ciência da biologia. [Life: the science of biology]**. In: Vinagre, A.P.S. (Trad.) 6 ed. v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 382.

RANDALL, D.J.; BURGGREN, W.W.; FARRELL, A.P.; HASWELL, M.S. **The Evolution of Air Breathing in Vertebrates**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 131p.

RANDALL, D.J. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.** v. 100, p. 175–188, 1982.

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.; VERTOLA, R.M.M., FERNANDES, M.N. Cardio-respiratory responses in two ecological distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environ. Biol. Fish.** v. 36, p. 93–97, 1993.

RANTIN, F.T.; GUERRA, C.D.R.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotomicus*. **Comp Biochem Physiol.** v. 119, p. 991–997, 1998.

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

SATCHELL, G.H. The response of the dogfish to anoxia. **J. Exp. Biol.** v. 38, p. 531–543, 1961.

SAUNDERS, R. L.; SUTTERLIN, A. M. Cardiac and respiratory responses to hypoxia in the sea raven *Hemitripterus americanus* and an investigation of possible control mechanisms. **Fish. Res. Bd Can.** v.28, p. 491–503, 1971.

SEMENZA, G.L.; Life with Oxygen. **Science.** v. 318, n. 5847, p. 62–64, 2007.

SHELTON, G. The regulation of breathing. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. (eds). **Fish Physiology.** vol. IV. San Diego: Academic Press, 1970. p. 293–352.

SHORT, S.; TAYLOR, E. W.; BUTLER, P. J. The effectiveness of oxygen transfer during normoxia and hypoxia in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) before and after cardiac vagotomy. **J. Comp. Physiol.**, v. 132 B, p. 289–295, 1979.

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

- 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 air breathing teleost *Synbranchus marmoratus*: importance of the venous system. **J. Exp. Biol.** v. 209, p.4167–4173, 2006.
- SMATRESK, N. J. Ventilatory and cardiac reflex responses to hypoxia and NaCN in *Lepisosteus osseus*, an air-breathing fish. **Physiol. Zool.** v. 59, p. 385-397, 1986.
- SMATRESK, N. J. Control of the respiratory mode in air breathing fishes. **Can. J. Zool.** v. 66, p. 144-151, 1988.
- SMATRESK, N. J. Chemoreceptor modulation of endogenous respiratory rhythms in vertebrates. **Am. J. Physiol.** v. 259, p. 887–997, 1990.
- SMATRESK, N. J. Effects of sectioning cranial nerves IX and X on hypoxic reflexes in an air-breathing fish (*Lepisosteus oculatus*). **Physiol. Zool.** (in press), 1991.
- 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.
- SOUZA, R.H.S.; SONCINI R., GLASS, M.L.; SANCHES, J.R.; RANTIN, F.T. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. **J Comp Physiol.** v.171, p.483–489, 2001.
- SUNDIN, L.; REID, S. G.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*) O₂ chemoresponses. **Respiratory Physiology**, v. 116, p. 181–199, 1999.
- SUNDIN, L.; REID, S. G.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Branchial receptors and Cardiovascular reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **J.Exp. Biol.** v. 203, p. 1225–1239, 2000.
- TAKASUKI J, FERNANDES MN, 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.; BARRETT, D. J. Evidence of a respiratory role for the hypoxic bradycardia in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 80 A, p. 99–102, 1985.
- TAYLOR, E. W. Nervous Control of the Heart and Cardiorespiratory Interactions. **Fish Physiology**, v. 12, Academic Press, New York, p. 343–387, 1992.

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.

TEUGELS, G.G. Preliminary data of a systematic outline of the African species of the genus *Clarias* (Pisces; Clariidae). **Rev. Zool. Afr.**v.96, p. 731-748, 1982.

TEUGELS, G.G.; DENAYER, B.; LEGENDRE, M. A systematic revision of the African catfish genus *Heterobranchus* Geoffroy-Saint-Hilaire,1809 (Pisces: Clariidae). **Zoological Journal of Linnean Society**. v. 98, p. 237-257, 1990.

TEUGELS, G.G.; ADRIAENS, D. Taxonomy and Phylogeny of Clariidae – An overview. In: Arratia, G. et al (eds). **Catfishes**. New Hampshire: Science Publishers, 2003. cap.16, p. 465-466.

YALÇIN, S.; AKYURT, I.; SOLAK, K. Stomach contents of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in the River Asi (Turkey). **Turkish Journal of Zoology**. v. 25, p. 461–468, 2001.

YU, K.L; WOO, N.Y.S. Effects of ambient oxygen tension and temperature on the bimodal respiration of an air-breathing teleost, *Channa maculate*. **Physiol Zool**. v.58, p. 181–189, 1985.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 25 / 04 / 2014

Mariana Tedoro Teixeira
Assinatura