



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

MARIANA TEODORO TEIXEIRA

Localização dos barorreceptores e análise das respostas cronotrópicas
decorrentes de alterações pressóricas induzidas em teleósteos com e sem
respiração aérea

São José do Rio Preto - SP
2019

MARIANA TEODORO TEIXEIRA

Localização dos barorreceptores e análise das respostas cronotrópicas
decorrentes de alterações pressóricas induzidas em teleósteos com e sem
respiração aérea

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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 Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

Coorientador: Prof. Dr. Tobias Wang

São José do Rio Preto
2019

T2661

Teixeira, Mariana Teodoro

Localização dos barorreceptores e análise das respostas cronotrópicas decorrentes de alterações pressóricas induzidas em teleósteos com e sem respiração aérea / Mariana Teodoro Teixeira. -- São José do Rio Preto, 2019
82 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Luiz Henrique Florindo

Coorientador: Tobias Wang

1. Barorrecepção. 2. Barorreflexo. 3. Traíra. 4. Jeju. 5. Truta arco-íris. I.
Título.

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.

MARIANA TEODORO TEIXEIRA

Localização dos barorreceptores e análise das respostas cronotrópicas decorrentes de alterações pressóricas induzidas em teleósteos com e sem respiração aérea

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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. Kênia Cardoso Bicego
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

Prof^a. Dr^a. Diana Amaral Monteiro
UFScar – Câmpus de São Carlos

Prof^a. Dr^a. Monica Jones Costa
UFScar – Câmpus de Sorocaba

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin
UFScar – Câmpus de São Carlos

São José do Rio Preto
08 de março de 2019

Dedico esse trabalho ao meu avô Nico, que sempre se preocupou com o meu futuro e morará para sempre no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo, por todas as oportunidades, confiança, pelos inúmeros ensinamentos, e principalmente pela grande amizade e parceria de todos esses anos.

Ao meu coorientador, Tobias Wang, pela oportunidade incrível de pesquisar em seu laboratório em Aarhus me proporcionando umas das melhores experiências de vida tanto profissional quanto pessoal. Agradeço também todo o carinho, ensinamentos e amizade recebidos antes, durante e depois de minha estadia na Dinamarca.

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 não apenas ao longo desses anos, mas por toda a minha vida.

Ao meu noivo, Marcos, por todo o amor e apoio nos momentos bons e ruins de cada etapa, pela dedicação, pela ajuda, e especialmente por ser esse companheiro incrível com quem eu quero compartilhar a minha vida inteira.

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

Ao Professor Dr. Mark Bayley pelas valiosas discussões e contribuições durante minha estadia na Dinamarca, além é claro pelo convívio e amizade.

Aos meus amigos de laboratório, minha família LZCV: Ariela, Vinicius, Victor, Leonardo, Isadora, Natália, Igor, Gabrielle e Gabriela pelo convívio, pelo companheirismo e principalmente pelas boas risadas e pelo apoio nas horas difíceis.

Aos meus colegas de laboratório na Aarhus University: Catherine, Rasmus, Charlie, Mikkel, John, Heidi e Claus, por todo o suporte, pelos ensinamentos e pelo carinho durante meus 4 meses de doutorado sanduíche, que fizeram com que essa etapa se tornasse ainda mais

especial. Além é claro, do Vinicius, meu companheiro de todos os dias, de muitas aventuras e momentos inesquecíveis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP) pelo auxílio financeiro da presente pesquisa (Processo FAPERP 001/2016).

À Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro e ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pela doação dos espécimes de Hoplias malabaricus

A todos que, apesar de não citados nominalmente, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo de todos esses anos.

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

“Eu faço parte dos que pensam que a Ciência é belíssima. ”

Marie Curie

RESUMO

O barorreflexo é um dos mecanismos mais importantes de regulação da pressão arterial que permite valores de pressão de perfusão estáveis e homeostasia cardiovascular nos vertebrados. Existem amplas evidências de que a frequência cardíaca em peixes teleósteos responde reciprocamente às alterações de pressão sanguínea e, enquanto os barorreceptores foram localizados nas brânquias desses animais, permanece incerto se receptores em outros locais estão envolvidos. Além disso, não há praticamente nenhuma informação sobre a regulação da pressão arterial em peixes que respiram ar. O presente estudo, portanto, teve como objetivo investigar a localização de barorreceptores em dois peixes estreitamente relacionados pertencentes à família Erythrinidae, onde *Hoplias malabaricus* é uma espécie exclusivamente aquática, enquanto *Hoplerythrinus unitaeniatus* é um respirador aéreo facultativo. Como grupo externo foi escolhido *Oncorhynchus mykiss*, devido ao seu habitat ser distinto dos demais, o que o torna um animal com um histórico de vida diferente, submetido a pressões evolutivas também distintas. Além disso, as respostas cardiorrespiratórias da truta arco-íris também são bem definidas e descritas. Para caracterizar a ocorrência do reflexo barostático, analisou-se a frequência cardíaca derivada do eletrocardiograma antes e depois das infusões intraperitoneais do agonista alfa-adrenérgico fenilefrina ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) para causar vasoconstrição e do doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$) para causar vasodilatação (grupo IN). Para localizar os barorreceptores responsáveis por essas respostas, as manipulações farmacológicas da pressão arterial foram repetidas após a desnervação (grupo G4) de todos os nervos branquiais. Os resultados revelam que os reflexos barostáticos estavam ausentes no grupo G4 em *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss*, o que demonstra que os barorreceptores estão localizados exclusivamente nos arcos branquiais nas três espécies estudadas.

Palavras-chave: Barorrecepção. Frequência cardíaca. Barorreflexo. Traíra. Jeju. Truta arco-íris.

ABSTRACT

*The barostatic reflex is one of the most important blood pressure regulating mechanisms that enables stable perfusion pressures and cardiovascular homeostasis in vertebrates. There is ample evidence that heart rate in teleost fish responds reciprocally to blood pressure, and while baroreceptors have been located in the gills, it remains uncertain whether receptors at other locations are involved. Furthermore, there is virtually no information on blood pressure regulation in air-breathing fishes. The present study, therefore, was designed to investigate the localization of baroreceptors in two closely related fish belonging to the Erythrinidae family, where *Hoplias malabaricus* is an exclusively water breathing species, while *Hoplerythrinus unitaeniatus* is a facultative air-breather that uses the swimbladder for gas exchange. We chose *Oncorhynchus mykiss* as an outgroup due to the distribution / habitat distinct from the other, thus presents a very different life history and consequently suffered different evolutionary pressures, besides its cardiorespiratory responses are well-known. To characterize the cardiac limb of the barostatic reflex, heart rate was derived from the eletrocardiogram before and after intraperitoneal infusions of the alpha-adrenergic agonist phenylephrine ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) to cause vasoconstriction and the vasodilating nitric oxide donor sodium nitroprusside ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$). Both drugs were infused through a cannula inserted into the peritoneal cavity through a small cutaneous incision under anaesthesia on the previous day. To locate the baroreceptors responsible for these responses, the pharmacological manipulations of blood pressure were repeated after denervation (G4 group) of all branchial nerves. The results reveal that barostatic reflexes were absent in the G4 group in *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* and *O. mykiss* which demonstrates that baroreceptors are exclusively located in the gill arches in these three species.*

Key words: Baroreception. Heart rate. Baroreflex. Trahira. Jeju. Rainbow trout.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema mostrando os mecanismos de retroalimentação do barorreflexo em situações de pressão arterial reduzida (**A**) e aumentada (**B**). DC: débito cardíaco; RVS: resistência vascular sistêmica; SNC: sistema nervoso central Fonte: adaptada de Klabunde (2011) e Armelin (2015). 23
- Figura 2** – Eventos sequenciais por meio dos quais a ingestão de sal aumenta a pressão arterial. Fonte: GUYTON e HALL (2011) 25
- Figura 3.** Componentes de um nervo craniano em um peixe. O ramo faríngeo, para o revestimento da faringe, e o pequeno ramo pré-tremático, para a frente da fenda faríngea, transportam fibras sensitivas viscerais. O ramo dorsal da pele é composto de fibras sensitivas somáticas. O ramo pós-tremático que percorre a parte posterior da fenda faríngea inclui fibras sensitivas e motoras. A parte rostral está à direita da figura. 27
- Figura 4.** Derivação filogenética dos nervos cranianos. **A.** Condição ancestral hipotética. Cada fenda faríngea era inervada por um nervo. O primeiro nervo ou nervo terminal (*T*) inervava um arco anterior que foi perdido precocemente na evolução dos vertebrados. **B.** Inervação para arcos branquiais associados. Os nervos cranianos V, VII, IX e XXI inervam os seguintes: mandibular (*1*), hioide (*2*), terceiro (*3*) e quarto ao sétimo (*4 a 7*) arcos, respectivamente. Essas associações entre os nervos cranianos e seus derivados permanecem estáveis em todos os teleósteos e tetrápodes. Fendas branquiais perdidas nos gnatostomados (*0, 0'*), fendas branquiais habitualmente presentes nos gnatostomados (*1 a 5*), fenda espiracular (*S*). Fonte: KARDONG, 2015. 28
- Figura 5** – Fotografia de um exemplar de *O. mykiss*. Fonte: KOTTELAT e FREYHOF (2007) 33
- Figura 6** – Fotografia de um exemplar de *H. malabaricus*. Fonte: AMAZON WATERS (2018) 33
- Figura 7** – Fotografia de um exemplar de *H. unitaeniatus*. Fonte: LEAL et al., (2010) 35

Figura 8 Fotografia de um exemplar de *H. malabaricus* logo após o término da inserção dos eletrodos de ECG e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está conectado ao cabo vermelho, enquanto o eletrodo de referência (-) está conectado ao cabo branco. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta. Fonte: elaborada pela autora.39

Figura 9. Fotografia de um exemplar de *H. unitaeniatus* logo após o término da inserção dos eletrodos de ECG e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está indicado pela letra A, enquanto o eletrodo de referência (-) está indicado pela letra B. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta branca. Fonte: elaborada pela autora. 40

Figura 10. Fotografia de um exemplar de *O. mykiss* logo após o término da inserção dos eletrodos de ECG e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está conectado ao cabo vermelho, enquanto o eletrodo de referência (-) está conectado ao cabo branco. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta. Fonte: elaborada pela autora. 40

Figura 11. Esquema do encéfalo e nervos cranianos de um teleósteo (A), com os nervos glossofaríngeo (IX) e vago (X) em detalhe, as linhas vermelhas indicam onde foram realizadas as secções (B). Fotografias das autópsias de *O. mykiss* mostrando que no grupo G4 o nervo glossofaríngeo e todos os ramos branquiais do nervo vago foram seccionados bilateralmente (C) (D). Fonte: adaptado de MILSOM et al., (2002) e ARMELIN (2015). 42

Figura 12. Fotografias das cavidades operculares esquerda (E) e direita (D) realizadas *post-mortem* em um exemplar de *H. malabaricus* do grupo G4, confirmando a transecção correta dos nervos. Fonte: elaborada pela autora. 43

Figura 13. Fotografias das cavidades operculares esquerda (E) e direita (D) realizadas *post-mortem* em um exemplar de *H. unitaeniatus* do grupo G4, confirmando a transecção correta dos nervos. Fonte: elaborada pela autora. 43

| | |
|---|----|
| Figura 14. Fotografias das cavidades operculares esquerda (E) e direita (D) realizadas <i>post-mortem</i> em um exemplar de <i>O. mykiss</i> do grupo G4, confirmando a transecção correta dos nervos. Fonte: elaborada pela autora. | 43 |
| Figura 15. Eletrocardiograma de um exemplar intacto e sob efeito de nenhum fármaco de <i>H. malabaricus</i> (A), <i>H. unitaeniatus</i> (B) e <i>O. mykiss</i> (C). Fonte: elaborada pela autora. | 45 |
| Figura 16. Representação esquemática demonstrando os grupos experimentais, o número de indivíduos para cada grupo, a ordem do protocolo experimental e os tempos de recuperação. Fonte: elaborada pela autora. | 47 |
| Figura 17. Gráficos descritivos mostrando a f_H de <i>H. malabaricus</i> (A, B), <i>H. unitaeniatus</i> (C, D) e <i>O. mykiss</i> (E, F) antes e depois da administração de fenilefrina em animais intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em <i>H. malabaricus</i> e <i>O. mykiss</i> ; $N=5$ em <i>H. unitaeniatus</i>). Fonte: elaborada pela autora. | 50 |
| Figura 18. Gráficos descritivos mostrando a f_H de <i>H. malabaricus</i> (A, B), <i>H. unitaeniatus</i> (C, D) e <i>O. mykiss</i> (E, F) antes e depois da administração de SNP em animais intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em <i>H. malabaricus</i> e <i>O. mykiss</i> ; $N=5$ em <i>H. unitaeniatus</i>). Fonte: elaborada pela autora. | 51 |
| Figura 19. f_H antes e depois das administrações farmacológicas de animais intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) em <i>H. malabaricus</i> (A, B) <i>H. unitaeniatus</i> (C, D) e <i>O. mykiss</i> (E, F). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em <i>H. malabaricus</i> e <i>O. mykiss</i> ; $N=5$ em <i>H. unitaeniatus</i>). Fonte: elaborada pela autora. | 53 |
| Figura 20. f_H pós-infusão farmacológica em porcentagem relativa à f_H -pré infusão farmacológica (f_H pós / f_H pré X 100) em animais intactos (IN), e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) de <i>H. malabaricus</i> , (A,B), <i>H. unitaeniatus</i> (C,D) e <i>O. mykiss</i> | |

(E,F) Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0,05$); Um asterisco indica diferença significativa em relação a uma linha de base de 100%. Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*). Fonte: elaborada pela autora. 54

Figura 21. Variabilidade total do intervalo R-R (RMSSD) de *H. malabaricus* (A, B), *H. unitaeniatus* (C, D) e *O. mykiss* (E, F) intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*). Fonte: elaborada pela autora. 56

Figura 22. Tempo decorrido até a resposta cronotrópica barorreflexa máxima de *H. malabaricus* (A), *H. unitaeniatus* (B) e *O. mykiss* (C), em animais intactos (IN) e falso-operados (SH). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0,05$). Não há dados acerca dos indivíduos submetidos à desnervação dos quatro pares de arcos branquiais (G4) e ao teste salina (SA) porque esses não apresentaram reflexo barostático. Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*). Fonte: elaborada pela autora. 60

Figura 23. Localização da artéria branquial aferente (A) e do sistema arteriovenoso caudal (B) em teleósteos. Fonte: (A) Imagem modificada de Armelin, 2015; Sandblom e Axelsson (2005); (B) Esquema adaptado de <<http://people.eku.edu/ritchisong/342notes2.htm>> Acesso em maio de 2018. 62

Figura 24. Representação esquemática dos arcos branquiais, pseudobrânquias e sua inervação. Visão lateral esquerda do suprimento nervoso para os arcos branquiais e pseudobrânquias dos nervos cranianos (VII, IX e X). PB = Pseudobrânquias em teleósteos; VA = aorta ventral; DA = aorta dorsal. Estruturas branquiais são inervadas por divisões pós-ganglionares (vermelhas) de ramos pré-tremáticos (pr) e pós-tremáticos (po). Fonte: adaptado de JONZ e NURSE (2008). 66

Figura 25. Esquema mostrando a localização dos barorreceptores nos grandes grupos de vertebrados estudados até o presente estudo, em fase adulta. Os círculos vermelhos representam os barorreceptores já mencionados na literatura, círculos amarelos representam os barorreceptores localizados no presente estudo. Fonte: adaptada de BAGSHAW (1985) e ARMELIN (2015). 68

Figura 26. Diagrama ilustrando a distribuição dos barorreceptores nos principais grupos de vertebrados, suas inervações e suas origens embrionárias, com base na literatura científica e o nos dados do presente estudo. Círculos vermelhos: derivação do 3º arco faríngeo embrionário; Círculos amarelos: derivação do 4º arco faríngeo embrionário; Círculos verdes: derivação do 5º arco faríngeo embrionário; Círculos azuis: derivação do 6º arco faríngeo embrionário; AF: arco faríngeo embrionário; SRA: superfície de respiração aérea. Fonte: adaptada de MILSOM e BURLESON (2007). 69

Figura 27. Filogenia dos principais grupos de Sarcopterygii. As 3 famílias viventes de Dipnoi estão inclusas na Ordem Ceratodontiformes. Fonte: NELSON et al., 2016 71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Receptores dos neurotransmissores autonômicos e suas principais funções. Fonte: adaptado de RANG et al., 2007 23
- Tabela 2.** Frequência cardíaca de *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss* intactos (IN), falso-operados (SH) e teste salina (SA). Valores expressos em média \pm EPM. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos IN, SH e SA nas três espécies estudadas, assim como anteriormente e posteriormente o tratamento com solução salina isotônica (ANOVA de via única complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; $P \leq 0,05$). Fonte: elaborada pela autora. 57
- Tabela 3.** f_H pós-administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré-administração farmacológica (f_H pós-administração / f_H pré-administração \times 100) *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss* em animais intactos (IN), falso-operados (SH) e teste salina (SA). Valores expressos em média \pm EPM. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos IN, SH e SA nas três espécies estudadas, um asterisco indica diferença estatisticamente significativa para com uma linha de base de 100% ($p \leq 0,05$). Fonte: elaborada pela autora. 58
- Tabela 4.** Variabilidade total do intervalo RR (RMSSD) de *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss* intactos (IN), falso-operados (SH) e teste salina (SA). Valores expressos em média \pm EPM. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos IN, SH e SA nas três espécies estudadas, assim como anteriormente e posteriormente o tratamento com solução salina isotônica (ANOVA de via única complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; $P \leq 0,05$). Fonte: elaborada pela autora. 58
- Tabela 5.** Regiões barossensíveis em vertebrados, suas origens embrionárias e inervações. * Exceto nos anfíbios urodelos. Fonte: KARDONG, 2015. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| bpm | Batimento por minuto |
| ECG | Eletrocardiograma |
| G4 | Grupo de peixes com os quatro pares de arcos branquiais desnervados |
| f_H | Frequência cardíaca |
| IN | Grupo de peixes com os arcos branquiais intactos |
| min | Minuto(s) |
| ms | Milissegundo(s) |
| N | Número de réplicas |
| PE 50 | Polietileno calibre 50 |
| ORA | Órgão de respiração aérea |
| SA | Grupo de peixes intactos e tratados com solução salina |
| SH | Grupo de peixes com as inervações branquiais expostas e não desnervadas |
| SNP | Nitroprussiato de sódio |
| SNA | Sistema nervoso autônomo |
| SNC | Sistema nervoso central |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 - INTRODUÇÃO | 19 |
| <i>1.1 Sistema cardiovascular e a pressão sanguínea</i> | 19 |
| <i>1.2 Regulação da pressão arterial</i> | 21 |
| <i>1.3 Evolução do barorreflexo em vertebrados</i> | 26 |
| <i>1.4 Acerca dos modelos experimentais</i> | 31 |
| 2 - OBJETIVOS | 37 |
| <i>2.1 Objetivos gerais</i> | 37 |
| <i>2.2 Objetivos específicos</i> | 37 |
| 3 - MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| <i>3.1 Animais</i> | 38 |
| <i>3.2 Procedimentos cirúrgicos</i> | 38 |
| <i>3.3 Fármacos</i> | 44 |
| <i>3.4 Protocolo Experimental</i> | 45 |
| <i>3.5 Confirmação dos resultados: Teste Salina e Grupo SH</i> | 46 |
| <i>3.6 Resumo do delineamento experimental</i> | 46 |
| <i>3.7 Análise das respostas barorreflexas</i> | 47 |
| <i>3.8 Análise estatística</i> | 49 |
| 4- RESULTADOS | 50 |
| <i>4.1 Grupos IN e G4</i> | 50 |
| <i>4.2 Grupo SH e Teste Salina</i> | 57 |
| 5. DISCUSSÃO | 61 |
| <i>5.1 – Crítica ao método</i> | 61 |
| <i>5.2 – Localização dos barorreceptores e respostas barorreflexas</i> | 62 |
| <i>5.3 – Evolução do barorreflexo em vertebrados</i> | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 6. CONCLUSÃO | 72 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |



1 - INTRODUÇÃO

1.1 Sistema cardiovascular e a pressão sanguínea

O sistema cardiovascular possui a importante função de suprir as necessidades dos tecidos corporais dos animais, sendo responsável pelo transporte rápido de oxigênio, dióxido de carbono, nutrientes, excedentes orgânicos, hormônios, agentes do sistema imune, calor, além de outras substâncias através do corpo. Isto torna este sistema um dos principais responsáveis pelo bom funcionamento de um organismo, pois mantém o ambiente adequado em todos os líquidos teciduais para que as células possam sobreviver e realizar suas funções adequadamente (GUYTON e HALL, 2011; HILL et al., 2012).

Nos vertebrados e em alguns invertebrados, o sangue, líquido pelo qual os diversos elementos citados acima são transportados, é conduzido no interior de vasos e sua propulsão é determinada por um gradiente de pressão criado por um órgão contrátil que atua como uma bomba, o coração (HILL et al., 2012). Esses vasos sanguíneos podem possuir características morfofisiológicas diferentes, apresentando, portanto, a seguinte classificação (GUYTON e HALL, 2011):

- **Artérias:** Formam a primeira fase do transporte sanguíneo, recebem sangue bombeado pelo coração em altas pressões e o conduzem para o restante do corpo. A pressão arterial também está envolvida em outros processos fisiológicos muito importantes, como a movimentação de plasma do sangue para os espaços intersticiais, por meio do endotélio capilar, manutenção do fluxo linfático e a filtração glomerular nos rins, entre outros. Neste contexto a aorta é a principal artéria por funcionar como reservatório de pressão.
- **Arteriolas e Metarteriolas:** são os ramos terminais do sistema arterial, cujos diâmetros são continuamente controlados pelos tecidos adjacentes, variando de acordo com as necessidades metabólicas desses tecidos, regulando assim o fluxo sanguíneo disponibilizado para os capilares que os irrigam.
- **Capilares:** são vasos muito finos e altamente permeáveis, sendo sua principal função possibilitar a difusão de líquidos, gases respiratórios, nutrientes, eletrólitos, hormônios e outras substâncias entre o sangue e os tecidos adjacentes. A região dos capilares é a porção do sistema vascular que apresenta resistência mais elevada, sendo, portanto, a região que mais promove redução da pressão sanguínea proveniente do sistema arterial. Essa



resistência também é responsável por fazer com que o fluxo sanguíneo capilar seja lento, o que promove uma difusão maior dos fatores citados anteriormente.

- **Vênulas:** são vasos muito finos que coletam o sangue dos capilares e se agregam progressivamente formando as **veias**.
- **Veias:** transportam o sangue de volta ao coração, constituem a porção pós circulação capilar e por essa razão, as vênulas e veias apresentam pressão sanguínea baixa, porém geralmente suficiente para promover o retorno venoso. Tanto as vênulas quanto as veias possuem paredes delgadas e com camada reduzida de músculo liso.

Para uma perfusão de órgãos e tecidos adequada, a pressão arterial deve ser suficiente para superar a resistência ao fluxo sanguíneo oriunda de toda a vasculatura, assim como exceder a força da atração gravitacional nos vasos em que o fluxo sanguíneo é ascendente (LILLYWHITE, 1996; GUYTON; HALL, 2011). Porém, essa pressão também não pode ser muito elevada, pois pressões excessivamente altas provocam desequilíbrio hidroeletrólítico, edemas, rompimento de vasos sanguíneos e danos graves a órgãos mais sensíveis à hipertensão (como o cérebro e os rins) (GUYTON; HALL, 2011; KLABUNDE, 2011).

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

A regulação do fluxo sanguíneo tecidual é realizada por meio de constrições e dilatações das metarteríolas, que podem ser induzidas por substâncias vasoativas secretadas pelos tecidos vizinhos e também por um déficit nutricional local. A primeira situação ocorre quando o aumento metabólico do tecido diminui a disponibilidade de nutrientes no local, o que induz as células a liberarem substâncias vasodilatadoras que se difundem até as metarteríolas e promovem um aumento do fluxo sanguíneo naquela região. A segunda situação, por sua vez, é caracterizada por uma vasodilatação causada apenas pela carência nutricional local, que faz com que a musculatura lisa das metarteríolas perca tonificação até que o maior fluxo sanguíneo nutrifique esses tecidos novamente (GUYTON E HALL, 2011).



Em algumas situações o controle de fluxo sanguíneo tecidual local impõe um trabalho cardíaco muito intenso, como por exemplo durante atividade física e/ou digestão. Durante uma atividade física, a resistência vascular nos músculos esqueléticos diminui em consequência da elevada atividade metabólica desses tecidos, o que aumenta o fluxo sanguíneo para os mesmos e, conseqüentemente, exige um maior trabalho cardíaco – pois a quantidade de vasos dilatados é muito grande (LAUGHLIN, 1999).

Do mesmo modo, durante a digestão, a taxa metabólica do sistema gastrointestinal aumenta por conta das diversas alterações fisiológicas e mecânicas relacionadas ao processo digestório (a chamada ação dinâmica específica ou SDA), resultando em uma dilatação na grande quantidade de vasos sanguíneos que o sistema gastrointestinal apresenta (SECOR, 2009).

Ante os fatos apresentados, as vasodilatações e vasoconstricções locais ocasionadas pelo controle do fluxo sanguíneo tecidual podem modificar expressivamente a pressão arterial, de acordo com a amplitude das alterações na resistência vascular. Considerando que as demandas teciduais oscilam de forma ininterrupta, torna-se evidente que a preservação da pressão sanguínea em valores ideais trata-se de uma condição imprescindível para a homeostase de um indivíduo (GUYTON e HALL, 2011). Sendo assim, devido a essa necessidade de valores pressóricos estáveis, importantes mecanismos reguladores da pressão sanguínea foram selecionados durante a história evolutiva dos animais, estando presentes em todos os vertebrados atuais (HILL et al., 2012; BAGSHAW, 1985; ARMELIN et al., 2016; WEST e VAN VLIET, 1994; LILLYWHITE e DONALD, 1994; ZENA et al., 2016a; ADAMS, 1962; HAGENSEN et al., 2010).

1.2 Regulação da pressão arterial

Como estabelecido no item anterior, os mecanismos reguladores da pressão arterial visam manter a estabilidade pressórica frente às diversas situações que podem alterá-la, assegurando que as funções relacionadas a essa variável não sejam prejudicadas. Tais ajustes pressóricos podem ocorrer a curto, médio e longo prazo (GUYTON e HALL, 2011).

A regulação a curto prazo é modulada predominantemente pelo sistema nervoso autônomo (SNA), enquanto as demais estão muito relacionadas com hormônios, mecanismos renais de eliminação ou retenção de água e solutos, e com a base neural da sede e do apetite por sal. Os ajustes de curto prazo são chamados de barorreflexos e acontecem em poucos



segundos/minutos. Já aqueles que possuem outra origem estão mais associados à homeostasia do volume de líquido corporal e podem ser verificados em horas e até mesmo dias (KLABUNDE, 2011).

O reflexo barorreceptor é o mecanismo nervoso de controle da pressão arterial mais conhecido (BAGSHAW, 1985). Esse reflexo é desencadeado por receptores de estiramento, os chamados barorreceptores, os quais possuem conexões neurais aferentes para o encéfalo, ao qual enviam constantemente informações sobre o estado da pressão arterial (BAGSHAW, 1985; GUYTON e HALL, 2011).

Qualquer aumento ou redução da pressão em relação a seu ponto de funcionamento normal (*set-point*) promove *inputs* aferentes para o sistema nervoso central, onde a informação é integrada e gera uma resposta extremamente rápida, caracterizada principalmente por: (1) alteração da frequência cardíaca e da força contrátil do coração, de forma a modular a quantidade de sangue que este órgão envia para a circulação a cada minuto, o chamado débito cardíaco; (2) dilatação ou constrição dos vasos sanguíneos, que por consequência tendem a retornar a pressão arterial ao seu estado normal modificando a resistência vascular (DAMPNEY, 1994; ALTIMIRAS et al., 1998; BIANCHI-DA-SILVA et al., 2000; SANDBLOM e AXELSSON, 2005; SANDBLOM e AXELSSON, 2011; KLABUNDE, 2011; ZENA et al., 2016b).

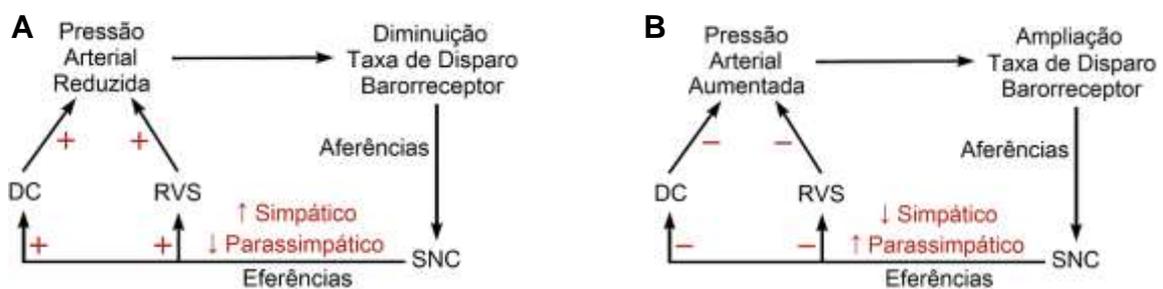
A bradicardia, a taquicardia e as regulações vasomotoras associadas aos barorreflexos são respostas induzidas pelo SNA por meio de duas vias antagônicas, a simpática e a parassimpática, que atuam respectivamente através da liberação de noradrenalina e acetilcolina (BAGSHAW, 1985; RANDALL et al., 2000). O aumento reflexo da pressão arterial está relacionado à ampliação do tônus simpático cardíaco e vascular e à redução do tônus parassimpático cardíaco, que resulta em vasoconstrição sistêmica, elevação da frequência cardíaca e aumento da contratilidade miocárdica. Por outro lado, a redução da pressão arterial é consequência dos efeitos inversos (Figura 1) (PANG, 2001; KLABUNDE 2011).

É importante ressaltar que tais respostas são desencadeadas pela interação dos neurotransmissores autonômicos com receptores específicos, por exemplo os α_1 -adrenérgicos, β_1 -adrenérgicos e os muscarínicos-colinérgicos – sendo que os dois primeiros apresentam afinidade pela noradrenalina e o último pela acetilcolina (SMITH e GANNON, 1978; RANG et al., 2007). Tais receptores podem estar localizados nos mais diversos tecidos de um organismo. Os receptores α_1 -adrenérgicos estão localizados na vasculatura sistêmica e quando



estimulados promovem vasoconstrição, já os receptores β_1 -adrenérgicos e muscarínicos-colinérgicos são encontrados no coração e modulam a frequência cardíaca, aumentando-a ou diminuindo-a, respectivamente, quando estimulados. Os β_2 -adrenérgicos por sua vez, estão localizados na vasculatura, principalmente do músculo esquelético, e promovem vasodilatação quando ativados (RANG et al., 2007). Na tabela 1 podemos observar a relação dos receptores conhecidos e suas principais funções em Vertebrados.

Figura 1. Esquema mostrando os mecanismos de retroalimentação do barorreflexo em situações de pressão arterial reduzida (A) e aumentada (B). DC: débito cardíaco; RVS: resistência vascular sistêmica; SNC: sistema nervoso central.



Fonte: adaptada de Klabunde (2011) e Armelin (2015).

Tabela 1. Receptores dos neurotransmissores autonômicos e suas principais funções

| Tipos de Receptores | Ao serem estimulados promovem: |
|-----------------------------|--|
| α_1 -adrenérgicos | Vasoconstrição, Contração Uterina, Constrição Brônquica. |
| α_2 -adrenérgicos | Redução na Liberação de Catecolaminas e de Insulina (<i>Feedback</i> Negativo). |
| β_1 -adrenérgicos | Taquicardia, Aumento do Débito Cardíaco e Liberação de Renina. |
| β_2 -adrenérgicos | Dilatação Brônquica, Vasodilatação no Músculo Esquelético, Lipólise. |
| β_3 -adrenérgicos | Estimulação da Lipólise. |
| Muscarínicos - Colinérgicos | Bradycardia e Redução da Força de Contratilidade Miocárdica. |

Fonte: adaptado de RANG et al., (2007).

A atuação do barorreflexo é bastante rápida e eficiente, pois mesmo alterações mínimas na pressão arterial, derivadas de oscilações praticamente insignificantes na demanda por fluxo sanguíneo de algum órgão ou tecido, induzem alterações cronotrópicas que podem acontecer no período compreendido entre um batimento do coração e outro (GUYTON e



HALL, 2011). Portanto, como as demandas por fluxo sanguíneo de órgãos e tecidos oscilam de forma constante, o mesmo é observado com a frequência cardíaca por conta do barorreflexo, constituindo diferenças no tempo de duração de cada ciclo cardíaco – a chamada variabilidade de curto prazo (ou de alta frequência) da frequência cardíaca. Existem outros fatores que também podem exercer grande influência sobre essa variabilidade, como por exemplo, a arritmia sinusal respiratória e o quimiorreflexo, porém o barorreflexo constitui um de seus componentes predominantes (ALTIMIRAS, 1999).

Por outro lado, os denominados ajustes de médio e longo prazo, como mencionado anteriormente, apresentam potentes mecanismos para a regulação da pressão arterial ao longo de semanas e até meses. Esses tipos de controle da pressão arterial, estão mais relacionados à homeostasia do volume de líquido corporal, determinado pelo balanço entre a ingestão e a eliminação de líquido. Para que haja esse controle a longo prazo, a ingestão e a eliminação de líquido precisam ser rigorosamente balanceadas. Tal função é realizada por múltiplos controles nervosos e hormonais, além de sistemas de controle local nos rins, que regulam a excreção de sal e água (GUYTON e HALL, 2011).

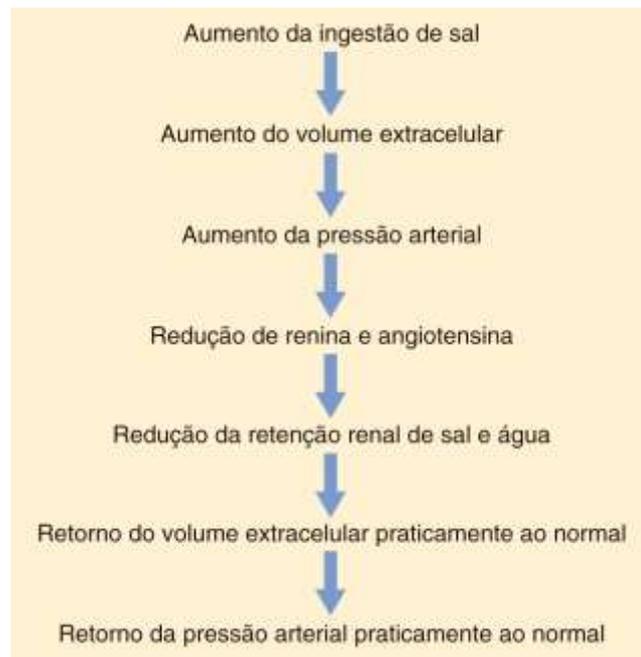
Os três principais mecanismos de controle de pressão a médio prazo, ou seja, que agem após vários minutos são: (1) o mecanismo vasoconstritor da renina-angiotensina, (2) o relaxamento por estresse da vasculatura e (3) o deslocamento de líquido capilar, através das paredes capilares para dentro ou fora da circulação, reajustando o volume de sangue, de acordo com a necessidade (GUYTON e HALL, 2011).

O mecanismo vasoconstritor da renina-angiotensina tem como principal função permitir que o indivíduo consuma quantidades muito pequenas ou grandes de sal, sem ocasionar grandes variações na pressão arterial ou no volume de líquido extracelular (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011). Essa função é explicada pela figura 2, que expressa o efeito primário do aumento da ingestão de sal – que é elevar o volume do líquido extracelular – que por sua vez eleva a pressão arterial (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011). Logo, a pressão arterial elevada aumenta o fluxo sanguíneo pelos rins, isso então diminui a secreção de renina para um nível muito mais baixo, e provoca sequencialmente a redução de retenção de água e sal, o que tende a normalizar o volume do líquido extracelular e, conseqüentemente, a pressão arterial. (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011).



Sendo assim, o sistema renina-angiotensina é um mecanismo de *feedback* automático que coopera para a manutenção da pressão arterial em níveis normais mesmo quando a ingestão de sal aumenta ou diminui em demasia (GUYTON e HALL, 2011).

Figura 2. Eventos sequenciais por meio dos quais a ingestão de sal aumenta a pressão arterial



Fonte: GUYTON e HALL (2011).

O mecanismo do relaxamento por estresse, por sua vez, pode ser claramente entendido pelo seguinte exemplo: quando a pressão nos vasos sanguíneos se eleva muito, esses vasos são ininterruptamente estirados por minutos ou até horas; como resultado, a pressão nesses vasos sanguíneos retorna ao normal (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011). Esse estiramento contínuo dos vasos, chamado de relaxamento por estresse, pode atuar como “tampão” da pressão que age por períodos intermediários (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011).

Já o mecanismo do deslocamento de líquido capilar ocorre da seguinte forma: quando a pressão capilar diminui a níveis muito baixos, o líquido é reabsorvido pelas membranas capilares dos tecidos para a circulação, aumentando o volume sanguíneo e a pressão na circulação (GUYTON e HALL, 2011). De maneira oposta, quando a pressão capilar sobe excessivamente, o líquido é perdido da circulação para os tecidos, diminuindo assim o volume sanguíneo, bem como a pressão na circulação (GUYTON e HALL, 2011).



Esses 3 mecanismos de médio prazo são ativados principalmente depois de 30 minutos até várias horas. Durante esse período, os mecanismos nervosos (de curto prazo) em geral vão perdendo a eficácia, portanto essas medidas não nervosas de controle da pressão nesses períodos intermediários são de extrema importância (GUYTON e HALL, 2011).

Por fim, o mecanismo rim-volume sanguíneo de controle da pressão, que leva algumas horas para começar a apresentar resposta significativa, é considerado o principal mecanismo de regulação de pressão a longo prazo (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011). Tal mecanismo também envolve a participação da angiotensina, porém de maneira mais indireta. (GUYTON e HALL, 2011).

Quando o sistema renina-angiotensina é ativado, a intensidade da secreção de aldosterona em geral se eleva; uma importante função subsequente da aldosterona é ocasionar um aumento acentuado da reabsorção de sódio pelos túbulos renais, elevando sua concentração no líquido extracelular (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011). Essa elevação, por sua vez, causa retenção de água, aumentando o volume do líquido extracelular e provocando de forma secundária uma elevação maior ainda da pressão arterial a longo prazo (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011). Desse modo, tanto o efeito direto da angiotensina sobre os rins quanto o efeito indireto por meio da aldosterona são importantes no controle da pressão arterial a longo prazo (GUYTON e HALL, 2011).

Portanto, podemos concluir que o controle da pressão arterial começa a agir por meio de medidas emergenciais pelos mecanismos nervosos (de curto prazo), continua com características de sustentação pelos mecanismos de médio prazo da pressão e por fim é estabilizado pelo mecanismo rim-líquidos corporais (de longo prazo) (COWLEY, 1992; GUYTON e HALL, 2011).

1.3 Evolução do barorreflexo em vertebrados

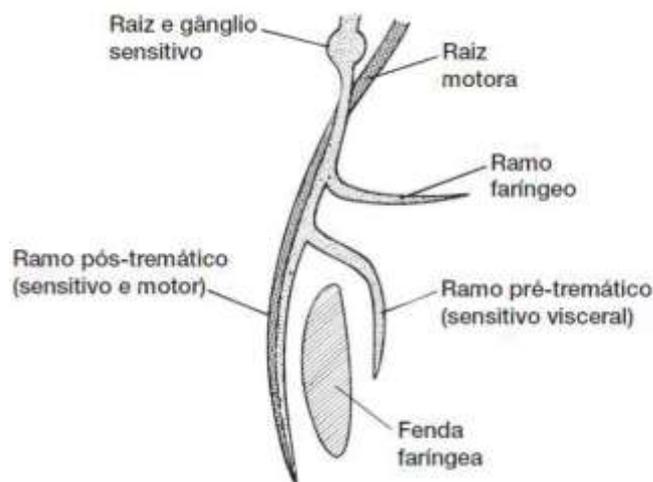
É importante destacar que a regulação a curto prazo da pressão arterial parece ser evolutivamente conservada nos vertebrados, atuando em uma grande quantidade de animais dos táxons inclusos nesse subfilo, excetuando-se os ciclostomados (BAGSHAW, 1985; WEST e VAN VLIET, 1994; NILSSON, 2011; TAYLOR et al., 2014). Ademais, a organização dos nervos cranianos também demonstra ser bastante semelhante nos diferentes táxons. Do ponto de vista filogenético, é pressuposto que os nervos cranianos tenham evoluído a partir de nervos dorsais e ventrais de alguns nervos espinhais anteriores, que se



incorporaram a caixa craniana. Os nervos dorsais e ventrais se unem no tronco, mas não na cabeça, e geram duas séries: nervos cranianos dorsais (V, VII, IX e X) e nervos cranianos ventrais (III, IV, VI e XII) (KARDONG, 2015).

Todos os nervos cranianos que suprem as bolsas branquiais formavam três ramos por bolsa: pré-tremático, pós-tremático e faríngeo (figura 23). Nos amniotas, esses nervos tendem a ser perdidos, ou suas homologias se tornam incertas. Tal como os nervos espinais, os nervos cranianos inervam tecidos somáticos e viscerais e transmitem a informação sensorial e motora geral. Alguns nervos cranianos consistem apenas em fibras sensitivas ou apenas em fibras motoras. Outros nervos são mistos, contendo ambos os tipos (KARDONG, 2015).

Figura 3. Componentes de um nervo craniano em um peixe. O ramo faríngeo, para o revestimento da faringe, e o pequeno ramo pré-tremático, para a frente da fenda faríngea, transportam fibras sensitivas viscerais. O ramo dorsal da pele é composto de fibras sensitivas somáticas. O ramo pós-tremático que percorre a parte posterior da fenda faríngea inclui fibras sensitivas e motoras. A parte rostral está à direita da figura.



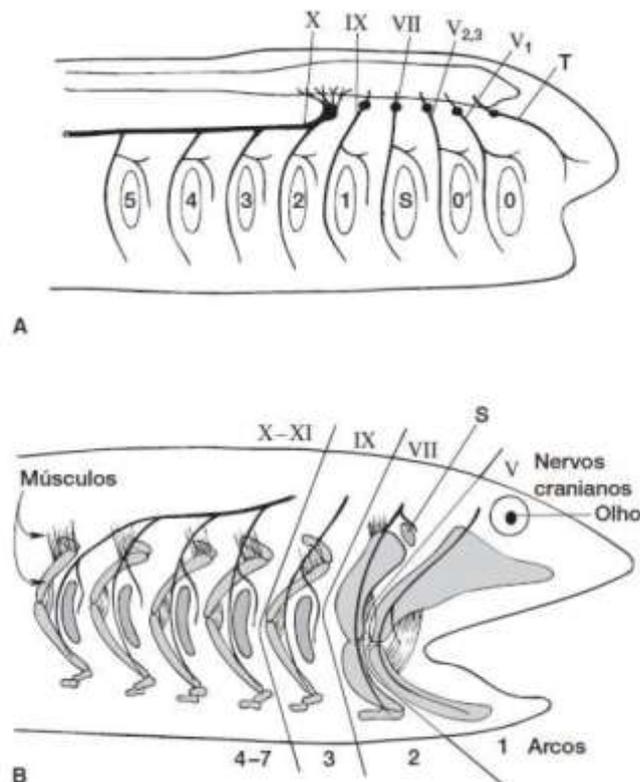
Fonte: KARDONG, 2015

O glossofaríngeo (IX), por exemplo, é um nervo misto que inerva o terceiro arco branquial. Contém fibras sensoriais das papilas gustativas, da primeira bolsa branquial e do revestimento faríngeo adjacente, enquanto as fibras motoras inervam músculos do terceiro arco branquial. O vago (X), por sua vez, também é um nervo misto e acertadamente recebe esse nome em latim que significa perambulação, visto que segue um trajeto bastante sinuoso, inervando áreas da boca, da faringe e da grande maioria das vísceras. É formado pela união de várias raízes por meio de diversos segmentos da cabeça e, em certas situações, nervos adicionais da linha lateral também se fundem com o nervo vago. (KARDONG, 2015).



Quando associado ao arco branquial, cada nervo craniano exibe fidelidade com aquele arco específico e seus músculos. Em todos os vertebrados podemos observar que o primeiro arco (arco mandibular) é sempre inervado pelo nervo trigêmeo (V); o segundo (hióideo), pelo nervo facial (VII); o terceiro, pelo nervo glossofaríngeo (IX); e os arcos remanescentes, pelos nervos vago (X) e acessório espinal (XI) (figura 24) (KARDONG, 2015).

Figura 4. Derivação filogenética dos nervos cranianos. **A.** Condição ancestral hipotética. Cada fenda faríngea era inervada por um nervo. O primeiro nervo ou nervo terminal (*T*) inervava um arco anterior que foi perdido precocemente na evolução dos vertebrados. **B.** Inervação para arcos branquiais associados. Os nervos cranianos V, VII, IX e XXI inervam os seguintes: mandibular (1), hióideo (2), terceiro (3) e quarto ao sétimo (4 a 7) arcos, respectivamente. Essas associações entre os nervos cranianos e seus derivados permanecem estáveis em todos os teleósteos e tetrápodos. Fendas branquiais perdidas nos gnatostomados (0, 0'), fendas branquiais habitualmente presentes nos gnatostomados (1 a 5), fenda espiracular (*S*).



Fonte: KARDONG, 2015

Em relação ao reflexo barostático, embora o mesmo pareça evolutivamente conservado, a localização dos barorreceptores envolvidos permanece elusiva em muitos grupos de vertebrados ectotérmicos (BAGSHAW, 1985; WEST e VAN VLIET, 1994; NILSSON, 2011; TAYLOR et al., 2014; JONES e MILSOM, 1982).

Em peixes, os primeiros indícios da existência de barorreflexo são oriundos de estudos que verificaram ocorrência de bradicardia em resposta a estimulações branquiais em elasmobrânquios e teleósteos. O pioneiro foi o trabalho de McWilliam (1885), que constatou



que estimulações elétricas, mecânicas, químicas e térmicas nas brânquias de *Anguilla anguilla* causavam bradicardia reflexa de origem autonômica, a qual podia ser eliminada por meio de desnervações branquiais.

Algumas décadas depois, Lutz (1930) observou que estimulações elétricas e mecânicas realizadas nas brânquias e no coração também resultavam em bradicardia reflexa em um elasmobrânquio (*Scyllium canicula*), e que a mesma era estabelecida por um aumento no tônus parassimpático. Posteriormente, Lutz e Wyman (1932a), utilizando metodologias que permitiam modificar a perfusão sanguínea nas brânquias, demonstraram a ocorrência de diminuição na frequência cardíaca relacionada ao aumento súbito da pressão de perfusão branquial em *Squalus acanthias*. Anos mais tarde, a pesquisa de McWilliam (1885) foi retomada por Mott (1951), que comprovou que não só a estimulação elétrica das inervações branquiais ou do ramo cardíaco do vago causavam uma bradicardia reflexa, como também diminuía a pressão arterial em *A. anguilla*.

Embora esses estudos apresentem poucos indícios que relacionem os fenômenos observados com o barorreflexo propriamente dito, eles demonstram a existência de um controle rápido da frequência cardíaca em elasmobrânquios e teleósteos, que é fundamental para a ocorrência de uma regulação a curto prazo da pressão arterial, além da possível existência de barorreceptores nas brânquias.

As evidências iniciais que sugeriram de fato a presença de controle a curto prazo da pressão arterial foram decorrentes de observações secundárias, durante pesquisas que apresentavam outros objetivos centrais. Estes estudos verificaram, em diferentes espécies de peixes, que uma administração de adrenalina produzia um aumento da pressão arterial seguido de uma bradicardia transitória de origem parassimpática (HELGASON e NILSSON, 1973; RANDALL e STEVENS, 1967; STEVENS et al., 1972). Fato que foi ratificado posteriormente por Wood e Shelton (1980). Farrell (1986) também relatou a ocorrência de bradicardia reflexa em *Hemitripterus americanus*, quando estes eram submetidos a condições que elevavam a pressão arterial.

Bagshaw (1985) sugeriu então que o controle reflexo da pressão arterial em teleósteos parece ser baseado essencialmente em ajustes da frequência cardíaca, e que esta regulação passou a envolver atividades vasomotoras apenas nos vertebrados mais derivados. Posteriormente, Conklin et al. (1997), Olson et al. (1997) e Zhang et al. (1998) demonstraram que peixes possuem um mecanismo para modular a capacitância venosa, apesar de não relacionar esta ocorrência com barorreflexos. Sandblom e Axelsson (2005, 2011), por sua vez,



constatarem que ambos os mecanismos podem ser desencadeados por barorreflexos na truta, *Oncorhynchus mykiss*, e atestaram a importância destes para a homeostase cardiovascular dos peixes.

Os resultados de Mott (1951), Ristori (1970), Ristori e Dessaux (1970), Sandblom e Axelsson (2005, 2011), e a revisão de Sundin e Nilsson (2002) trouxeram evidências fundamentais de que as brânquias são a principal região de barossensibilidade em teleósteos, pois revelaram que alterações na pressão sanguínea intrabranquial, geradas por oclusões temporárias nas aortas ventral e dorsal, acarretaram uma bradicardia ou taquicardia reflexa.

Por fim, recentemente o estudo de Armelin e colaboradores (2016) demonstrou que no teleósteo *Colossoma macropomum*, os barorreceptores são de fato exclusivamente intrabranquiais e encontram-se dispersos por todos os arcos branquiais. Além disso, nessa espécie, as aferências barorreceptoras são constituídas pelos nervos glossofaríngeo e vago (cranianos IX e X), similarmente à maioria dos vertebrados.

Embora os barorreceptores tenham sido localizados na região das brânquias nos animais dos estudos supracitados, ainda permanece incerto se há o envolvimento de receptores alocados fora desta região (OLSON et al., 1997, SUNDIN e NILSON, 2002; SANDBLOM et al., 2016). Atrelado a isso, as informações acerca das regulações pressóricas em peixes com respiração aérea são quase inexistentes

Porém, nenhum desses trabalhos tinha como objetivo localizar os barorreceptores e, portanto, não apresentavam metodologias que permitissem tais conclusões. Apenas recentemente, com o trabalho de Armelin e colaboradores (2016), cujo objetivo do trabalho foi determinar a localização dos barorreceptores em uma espécie de teleósteo (tambaqui), essas suspeitas foram ratificadas. Entretanto, apesar do estudo apresentar uma metodologia adequada para localizar e entender o funcionamento dos barorreceptores, o estudo abrangeu apenas uma espécie de teleósteo, sendo, portanto, necessário mais estudos investigando esse assunto em peixes, ainda mais por se tratar de um grupo tão antigo e tão diverso (NELSON et al., 2016).

Já em relação aos anfíbios, existem muitas evidências indicando que os barorreceptores também estão localizados na vasculatura central, mais especificamente nos arcos aórticos, arcos pulmocutâneos e artérias carótidas, em anuros (WEST e VAN DE VLIET, 1994). Nos urodelos, as poucas evidências existentes apontam para as brânquias e para a vasculatura pulmonar como sítios barossensíveis (LUTZ e WYMAN, 1932b; JOHANSEN, 1963). Já gimnofíonios, até o presente momento não existem estudos que apresentem evidências sobre a localização dos barorreceptores.



Por sua vez, em répteis, tanto Chelonia quanto Squamata (Lacertilia e Ophidia) parecem apresentar o *truncus arteriosus* como sítio barorreceptor principal (FEDELE, 1937; ADAMS 1962; BAGSHAW, 1985; LILLYWHITE e DONALD, 1994; SEYMOUR e ARNDT, 2004). Nos crocodilianos, não foi encontrada nenhuma evidência sobre a localização dos barorreceptores na literatura científica.

Em relação às aves e mamíferos, existe um grande volume de trabalhos acerca da localização dos barorreceptores e da resposta barorreflexa. Esses estudos indicam que nesses dois grupos de vertebrados a localização dos barorreceptores é muito similar. Nos dois táxons os barorreceptores se encontram nas artérias carótidas e nos arcos aórticos e na raiz de grandes vasos (GREEN, 1953; AUMONIER, 1972; KIRCHHEIM, 1976; ABDEL-MAGIED et al., 1982; JONES, 1973; TAHA et al., 1983; BAGSHAW, 1985).

1.4 Acerca dos modelos experimentais

Nesse trabalho foram estudadas 3 espécies de peixes teleósteos, duas delas de clima neotropical e uma espécie de clima temperado. Essa diferença de distribuição/habitat indica que essas espécies tenham evolutivas muito distintas, e conseqüentemente sofreram pressões evolutivas diferentes. Além disso, as três espécies também apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas em relação ao sistema respiratório, o que amplia ainda mais a robustez do estudo. (KOTTELAT e FREYHOF, 2007; GRAHAM, 1997).

As duas espécies neotropicais *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 e *Hoplerythrinus unitaeniatus* Spix & Agassiz, 1829 pertencem à família Erythrinidae (OYAKAWA, 2003). *H. malabaricus* apresenta respiração exclusivamente aquática enquanto que *H. unitaeniatus* possui respiração aérea facultativa, sendo, portanto, um respirador bimodal (GRAHAM, 1997). *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 por sua vez, pertence à família Salmonidae, também apresenta respiração exclusivamente aquática, e diferentemente das outras duas espécies, possui pseudobrânquias (KOTTELAT e FREYHOF, 2007; LAURENT e ROUZEAU, 1972).

O. mykiss, foi utilizada como um grupo externo nesse estudo. Além das razões supracitadas, essa espécie foi escolhida pelo fato de ser um modelo experimental muito utilizado em estudos sobre fisiologia animal, portanto suas respostas cardiorrespiratórias são amplamente descritas (LAURENT e ROUZEAU, 1972; PERRY et al., 1999; REID e PERRY. 2003; SANDBLOM et al., 2005; GOLD et al. 2015).



A espécie é popularmente conhecida como truta arco-íris, sendo nativa do América do Norte, desde o norte do México (Rio Santa Domingo) até rios do sul do Alasca e do Canadá (Kuskokwim River, Mackenzie River e rios dos estados de Alberta e British Columbia) (PAGE e BURR, 1991). Porém, a espécie foi introduzida em diversas outras regiões de clima temperado, principalmente na Europa (PAGE e BURR, 1991; KOTTELAT e FREYHOF, 2007).

O habitat natural da truta arco-íris é a água doce a uma temperatura de cerca de 12°C, sendo tolerante a temperaturas de 0 a 25°C (GALL e CRANDELL, 1992). Porém, a espécie sobrevive em água do mar após atingir um tamanho mínimo, mas essa tolerância parece depender de vários fatores e diferir de indivíduo para indivíduo (GALL e CRANDELL, 1992). Esses peixes apresentam corpo alongado e a coloração varia de acordo com o habitat, sendo de coloração mais escura em água doce, e mais prateada em água salgada, além de poder variar de acordo com o tamanho e fase do ciclo reprodutivo (SPILLMAN, 1961). Além disso, o nome popular “truta arco-íris” se deve à presença de uma faixa larga bastante característica, de tonalidade que oscila de rosa a vermelho, da cabeça à base da cauda (Figura 3) (SPILLMAN, 1961; KOTTELAT e FREYHOF, 2007).

Tanto as formas anádromas quanto as de água doce podem migrar longas distâncias para os realizar a desova (KOTTELAT e FREYHOF, 2007). A espécie realiza comportamento de corte e os ovos ficam depositados em ninhos construídos pela fêmea (GALL e CRANDELL, 1992). É uma espécie carnívora que se alimenta de invertebrados, principalmente cefalópodes quando estão em água salgada, e/ou peixes de menor tamanho (KOTTELAT e FREYHOF, 2007).

Já a espécie neotropical *H. malabaricus*, popularmente conhecida como traíra, ocorre principalmente em ambientes lênticos de água doce desde a Argentina até a Costa Rica (PAIVA, 1974; BUCKUP et al., 2007). No Brasil, apresenta ampla distribuição, pois pode ser encontrada nas Bacias do Amazonas, São Francisco, Doce, Paraná, Paraíba e Paranaíba (LEITÃO, 1947; PAIVA, 1974).



Figura 5. Fotografia de um exemplar de *O. mykiss*.



Fonte: KOTTELAT e FREYHOF (2007).

A traíra possui um leve prognatismo na boca e o corpo com coloração variando de parda a marrom (Figura 4) (BRITSKI et al., 1988). As nadadeiras dorsais, anais e caudais possuem listras escuras alternadas com claras, as nadadeiras peitorais são manchadas e não apresenta nadadeira adiposa (BRITSKI et al., 1988). Em relação ao comportamento reprodutivo, a espécie realiza fecundação externa com desova parcelada e apresenta cuidado parental (PRADO e FROEHLICH, 2006). Quanto à alimentação, na fase larval se alimenta de plâncton, é insetívora na fase juvenil; e piscívora na fase adulta (AZEVEDO e GOMES, 1943; PAIVA, 1974).

A espécie não apresenta hábitos migratórios na fase adulta e é bem adaptada a viver em populações pequenas e isoladas, sendo muito resistente a condições adversas, como por exemplo, suporta longos períodos de jejum além de sobreviver em ambientes de águas rasas e com pouco oxigênio dissolvido (PAIVA, 1974; SANTOS et al., 2009).

Figura 6. Fotografia de um exemplar de *H. malabaricus*



Fonte: AMAZON WATERS (2018).



Por sua vez, a espécie *H. unitaeniatus*, conhecida vulgarmente como jeju, também ocorre em ambientes de água doce por quase toda a América do Sul, com uma distribuição que abrange Peru, Bolívia, Venezuela, Guianas, Brasil e Paraguai (FOWLER, 1950; GODOY, 1987) No Brasil, o jeju pode ser encontrado nas bacias dos rios São Francisco, Amazonas e Paraná-Paraguai (GRAÇA e PAVANELLI, 2007).

Possui corpo alongado com uma faixa longitudinal escura sobre a linha lateral (do opérculo até o pedúnculo caudal), e uma mancha escura arredondada no opérculo (Figura 5) (OYAKAWA, 2003; GRAÇA e PAVANELLI, 2007). É uma espécie de hábitos sedentários e se alimenta de invertebrados aquáticos e peixes de menor tamanho (SANTOS, 1981; NOMURA, 1984, GODOY, 1987; HAHN et al., 2004). Em relação ao comportamento reprodutivo, também é uma espécie que realiza fecundação externa e apresenta cuidado parental (SATO et al., 2003).

A espécie utiliza a bexiga natatória como órgão de respiração aérea (ORA) (WEIBEZAHN, 1967). Estudos mais detalhados mostraram que essa bexiga natatória é do tipo esponjosa e composta por uma câmara anterior e uma posterior (KRAMER, 1978). A porção posterior é ricamente vascularizada e apresenta uma organização epitelial característica de superfícies de trocas gasosas (KRAMER, 1978; HÖFLING et al., 1980).

Em normóxia o jeju extrai cerca de 30% de O₂ por meio da bexiga natatória, enquanto que em situações de hipóxia aquática o animal passa a respirar quase que exclusivamente ar atmosférico. (STEVENS e HOLETON; 1978). Sendo assim, torna-se evidente a importância do ORA, pois a espécie normalmente ocorre em corpos d'água rasos e com pouca corrente que com frequência apresentam períodos de hipóxia aquática (GRAHAM, 1997; PLANQUETTE et al., 1996).

Ao subir a superfície para capturar o ar atmosférico, parte do ar engolido imediatamente escapa pelos opérculos, passando pelas brânquias (KRAMER, 1978). Além disso, nos intervalos entre uma respiração aérea e outra, o animal solta o excedente de ar pela boca e opérculos (expiração) (CARTER e BEADLE, 1931; KRAMER, 1978). Desta forma, considerando os estudos que apontam para as brânquias como o principal sítio de barorrecepção dos teleósteos, o processo de respiração aérea, ao promover a passagem de ar pelas brânquias (o qual é menos denso que a água), possivelmente interfere na barorrecepção – podendo inclusive ter alterado a importância das brânquias na barorrecepção ao longo da história evolutiva dos peixes de respiração aérea.



Além disso, estudos de Zaccone e colaboradores (2003) utilizando técnicas imunohistoquímicas observaram a presença de inervação nitrérgica na bexiga natatória de *Heteropneustes fossilis*. Porém, com essa metodologia não foi possível confirmar se essas inervações eram relacionadas a mecano, quimio ou barorrecepção. Ainda assim, trata-se de um forte indício de presença de barorreceptores em um órgão de respiração aérea.

Um último motivo para a escolha do jeju é o fato de pertencer à mesma família da traíra, o que torna as observações e as discussões acerca do funcionamento e localização dos barorreceptores muito mais completa e pertinente.

Figura 7. Fotografia de um exemplar de *H. unitaeniatus*



Fonte: LEAL, M.E. et al. (2010).

Por fim, a escolha das 3 espécies se sustenta no fato de que o recente aumento da temperatura global pode infligir sérios danos aos corpos d'água em que essas espécies habitam, principalmente as 2 espécies de região subtropical. Esta condição eleva a atividade e a abundância de uma grande variedade de microrganismos, o que pode alterar a disponibilidade de oxigênio e a quantidade de matéria orgânica na água, assim como ampliar a síntese bacteriana de compostos orgânicos tóxicos como o sulfeto de hidrogênio (AFFONSO et al., 2002; ANTTILA et al., 2013; STEAD, 2013).

Somado a tudo isso, o calor também promove um aumento no metabolismo dos peixes, o que juntamente a possíveis contaminações ambientais com xenobióticos pode resultar em significantes desbalanceamentos na homeostase destes animais (KENNEDY e WALSH, 1997; REID et al., 1997; SANDBLOM et al., 2016). Sendo assim, o melhor entendimento da fisiologia dessas espécies torna-se muito importante para a fundamentação



de futuros estudos que sejam relacionados à tolerância destes peixes às mudanças ambientais e à sua conservação.

Em vista disso, o presente estudo visou investigar se a localização e o funcionamento dos barorreceptores é pariforme em teleósteos, com e sem respiração bimodal, que além de possuírem estratégias respiratórias diferentes, apresentam histórias de vida bastante distintas.



2 - OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

O presente estudo teve como objetivo investigar se a localização dos barorreceptores é estritamente branquial, extrabranquial ou mista e se essa localização é semelhante nessas 3 espécies de teleósteos. E também analisar as respostas barorreflexas quando estes animais são submetidos a aumento ou redução da pressão arterial.

2.2 *Objetivos específicos*

- a) averiguar se os barorreflexos ocorrem em peixes com as aferências branquiais intactas e seccionadas, de forma a evidenciar a localização dos barorreceptores.
- b) verificar quais os reflexos induzidos pela administração de um vasoconstritor e um vasodilatador em animais “intactos” e desnervados, assim como suas intensidades.
- c) verificar se existem diferenças na localização dos barorreceptores e nas respostas barorreflexas entre *H. malabaricus* (respiração aquática), *H. unitaeniatus* (respiração bimodal), *O. mykiss* (respiração aquática, grupo externo).



3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

A primeira etapa do estudo foi realizada no Brasil, no Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados da UNESP de São José do Rio Preto com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da mesma instituição (Protocolo CEUA nº 111/2015).

Foram utilizados 18 espécimes de *H. malabaricus* (massa entre 100 e 310 gramas) e 14 espécimes de *H. unitaeniatus* (massa entre 50 e 110 gramas) de ambos os sexos, obtidos em pisciculturas. Depois de transportados para a Universidade, os animais foram mantidos em caixas d'água de polietileno de 500 litros abastecidas com água normóxica, sem cloro, constantemente aerada, termostatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os indivíduos ficaram expostos a um fotoperíodo natural e a alimentação foi realizada 3 vezes por semana com carne bovina e ração comercial para peixes. Um período de aclimação mínimo de 30 dias foi realizado previamente a qualquer procedimento experimental.

A segunda etapa foi realizada na Dinamarca, no Departamento de Zoofisiologia da Aarhus University, na cidade de Aarhus, de acordo com as normas do Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

Nessa etapa foram utilizados 18 espécimes de *O. mykiss* de ambos os sexos, com massa entre 210 e 860 g obtidos em pisciculturas do país. Após serem transferidos para a Universidade, os animais foram mantidos em caixas d'água de fibra de vidro de 5000 litros abastecidas com água normóxica, sem cloro, constantemente aerada, termostatizada a $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Os indivíduos ficaram expostos a um fotoperíodo artificial (12 h de claro/ 12 h de escuro) e a alimentação foi realizada com ração comercial para peixes diariamente. Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes dinamarquesas de experimentação e bem-estar animal.

Todos os animais passaram por um período de jejum de dois dias antes dos experimentos, para evitar a eliminação de fezes nas câmaras experimentais, assim como possíveis influências da digestão nos parâmetros fisiológicos que foram coletados.

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Para a indução da anestesia, os peixes foram colocados em um recipiente abastecido com solução aquosa de benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) até apresentarem perda de equilíbrio e ausência

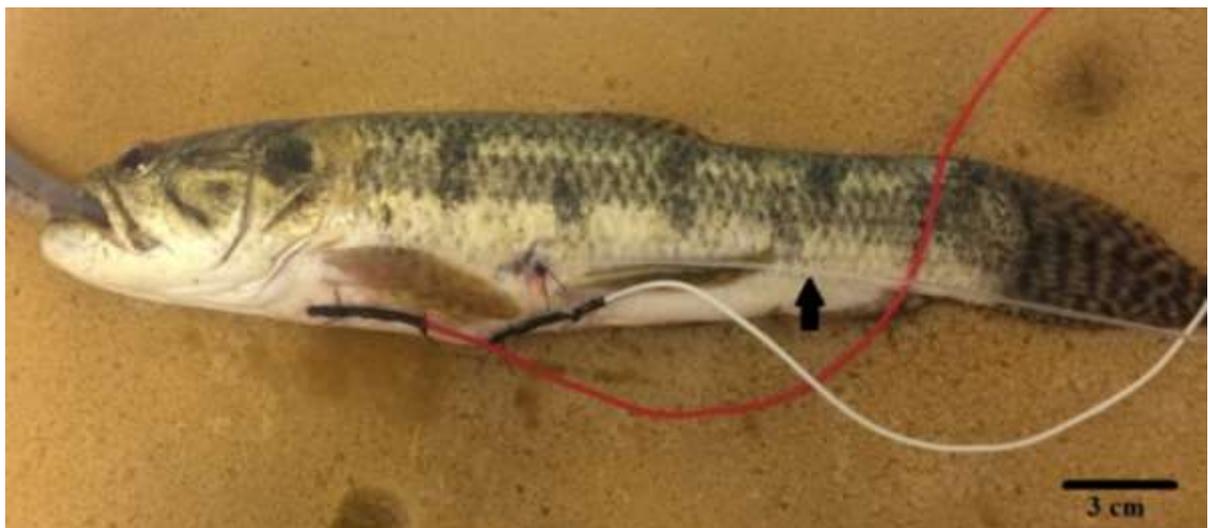


de movimentos operculares. Em seguida, foram transferidos para uma mesa cirúrgica onde foram ventilados artificialmente com uma solução aquosa aerada menos concentrada de benzocaína ($0,05\text{g.L}^{-1}$) com o intuito de se manter a anestesia. Tais procedimentos anestésicos foram adotados por Sundin et al. (1999) e Lopes et al. (2010).

Foram implantados dois eletrodos de eletrocardiograma (ECG) de acordo com o modelo descrito por Rantin et al. (1992). O eletrodo principal (+) foi introduzido na região ventral, próxima à região cardíaca, sem atingir o coração. O segundo eletrodo – eletrodo de referência (-) – foi implantado lateralmente alguns centímetros próximo à nadadeira pélvica. Os eletrodos foram fixados à pele por pontos cirúrgicos. Esses eletrodos e mais um terceiro colocado na água da câmara experimental (eletrodo “terra”) foram utilizados para aferir a frequência cardíaca (f_H).

Para a administração de fármacos, uma cânula de polietileno (PE 50) preenchida com solução salina (0,9% de NaCl) foi introduzida na cavidade peritoneal, por meio de uma punção por agulha realizada próximo ao segundo eletrodo, de acordo com os procedimentos descritos por McKenzie et al. (2007). Assim como os eletrodos, a cânula foi sutura à pele por um ponto cirúrgico (Figuras 6, 7 e 8)

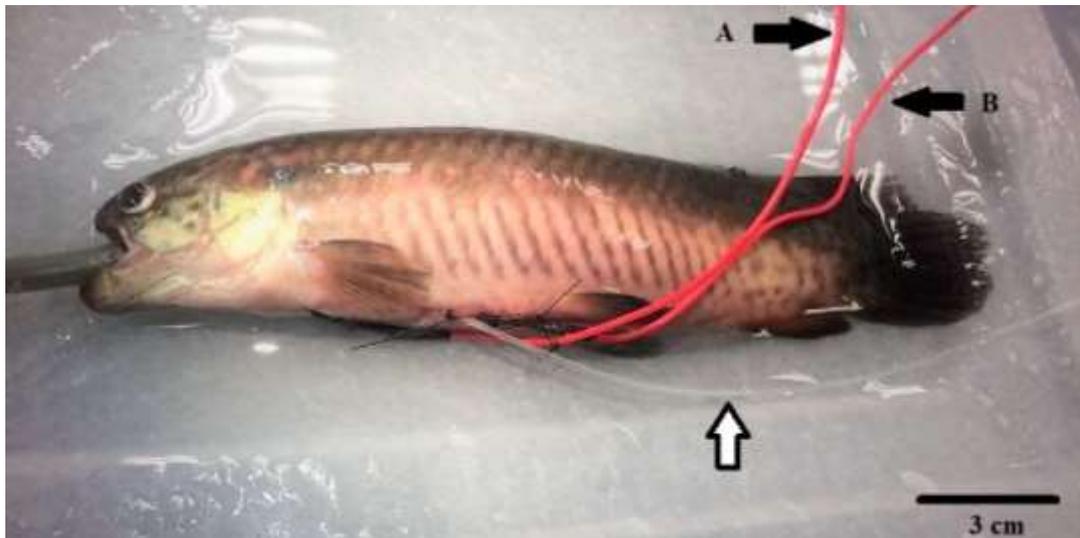
Figura 8. Fotografia de um exemplar de *H. malabaricus* logo após o término da inserção dos eletrodos de ECG e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está conectado ao cabo vermelho, enquanto o eletrodo de referência (-) está conectado ao cabo branco. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta.



Fonte: elaborada pela autora.



Figura 9. Fotografia de um exemplar de *H. unitaeniatus* logo após o término da inserção dos eletrodos de ECG e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está indicado pela letra A, enquanto o eletrodo de referência (-) está indicado pela letra B. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta branca.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 10. Fotografia de um exemplar de *O. mykiss* logo após o término da inserção dos eletrodos de ECG e cânula intraperitoneal. O eletrodo de eletrocardiograma principal (+) está conectado ao cabo vermelho, enquanto o eletrodo de referência (-) está conectado ao cabo branco. A cânula intraperitoneal está indicada pela seta.



Fonte: elaborada pela autora.

Posteriormente, o opérculo dos animais foi mantido aberto e uma pequena incisão foi realizada no epitélio do teto opercular logo acima do primeiro e segundo arcos branquiais – permitindo acesso ao nervo craniano IX (glossofaríngeo) e aos ramos branquiais do nervo craniano X (vago). Para a desnervação branquial completa (Grupo G4) as inervações de todos



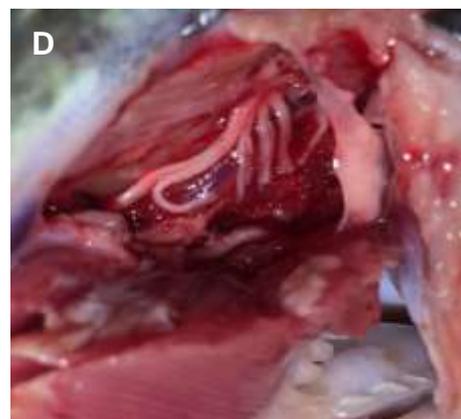
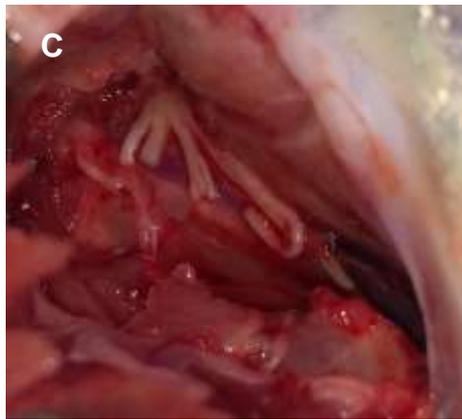
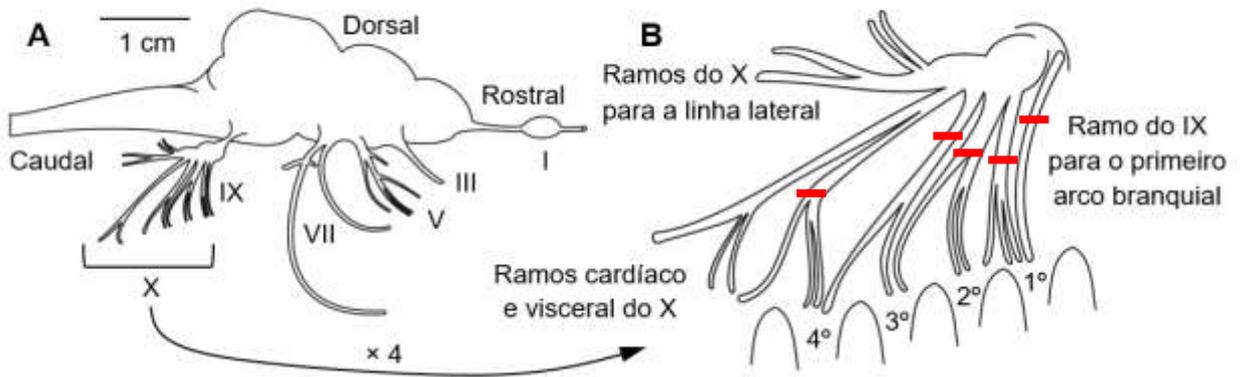
os arcos branquiais foram expostas e seccionadas (nervo craniano IX e ramo pré e pós-tremático do nervo craniano X que inerva os quatro arcos branquiais) (Figura 9). No Grupo Intacto (Grupo IN) a cavidade opercular não passou por nenhum procedimento. É importante salientar que o ramo cardíaco e visceral do nervo vago foi mantido intacto em todos os casos. Todas as desnervações foram confirmadas *post-mortem* por autópsia e fotografadas (Figura 10, 11 e 12).

Depois da cirurgia, os animais foram ventilados com água aerada até apresentarem sinais do término da indução anestésica, e transferidos para uma câmara de contenção individual feita de PVC, com dimensões levemente superiores à dos animais, a qual foi colocada em uma câmara experimental maior (aproximadamente 20 litros). A câmara de contenção apresentava inúmeros orifícios que permitiam a passagem de água e da cânula. No momento da transferência dos peixes, a câmara maior foi abastecida com água em condições semelhantes à utilizada na aclimatação, ademais, houve um ciclo constante de água durante a permanência dos animais na mesma, através de um influxo de água nova no sistema e um efluxo do excedente (o que a manteve livre de metabólitos e com pH estável).

Assim como nos protocolos de desnervação utilizados por Milsom et al. (2002), Florindo et al. (2004), Florindo et al. (2006), Lopes et al. (2010) todos os procedimentos supracitados foram completados em aproximadamente 40 minutos e um período de recuperação pós-operatório de 24 horas foi dado aos animais antes dos experimentos. Esse período de recuperação foi reduzido para 12 horas para os experimentos com *O. mykiss* e *H. unitaeniatus*, devido ao fato de que os indivíduos dessas espécies submetidos a desnervação não sobreviviam mais do que 30 horas, portanto foi necessário reduzir o protocolo experimental. Tal redução não comprometeu os resultados visto que diversos estudos utilizando metodologias semelhantes obtiveram valores de f_H próximos ao obtidos nesse estudo (levando em consideração a massa dos animais e temperatura em que o protocolo experimental foi conduzido) (VERA e PRIEDE 1991; REID e PERRY. 2003; MCKENZIE et al., 2007).



Figura 11. Esquema do encéfalo e nervos cranianos de um teleósteo (A), com os nervos glossofaríngeo (IX) e vago (X) em detalhe, as linhas vermelhas indicam onde foram realizadas as secções (B). Fotografias das autópsias de *O. mykiss* mostrando que no grupo G4 o nervo glossofaríngeo e todos os ramos branquiais do nervo vago foram seccionados bilateralmente (C) (D).



Caudal

Rostral



Fonte: A e B adaptado de MILSOM et al. (2002) e ARMELIN (2015); C e D elaborada pela autora.



Figura 12. Fotografias das cavidades operculares esquerda (E) e direita (D) realizadas *post-mortem* em um exemplar de *H. malabaricus* do grupo G4, confirmando a transecção correta dos nervos.

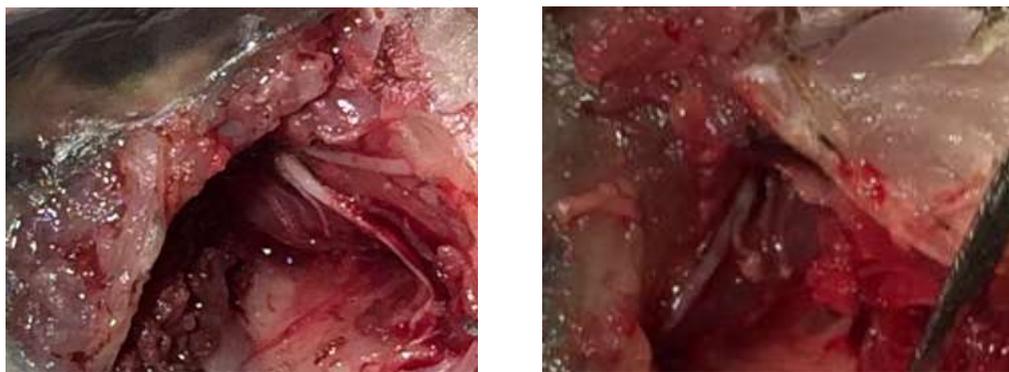


E

D

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 13. Fotografias das cavidades operculares esquerda (E) e direita (D) realizadas *post-mortem* em um exemplar de *H. unitaeniatus* do grupo G4, confirmando a transecção correta dos nervos.



E

D

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 14. Fotografias das cavidades operculares esquerda (E) e direita (D) realizadas *post-mortem* em um exemplar de *O. mykiss* do grupo G4, confirmando a transecção correta dos nervos.



E

D

Fonte: elaborada pela autora.



3.3 Fármacos

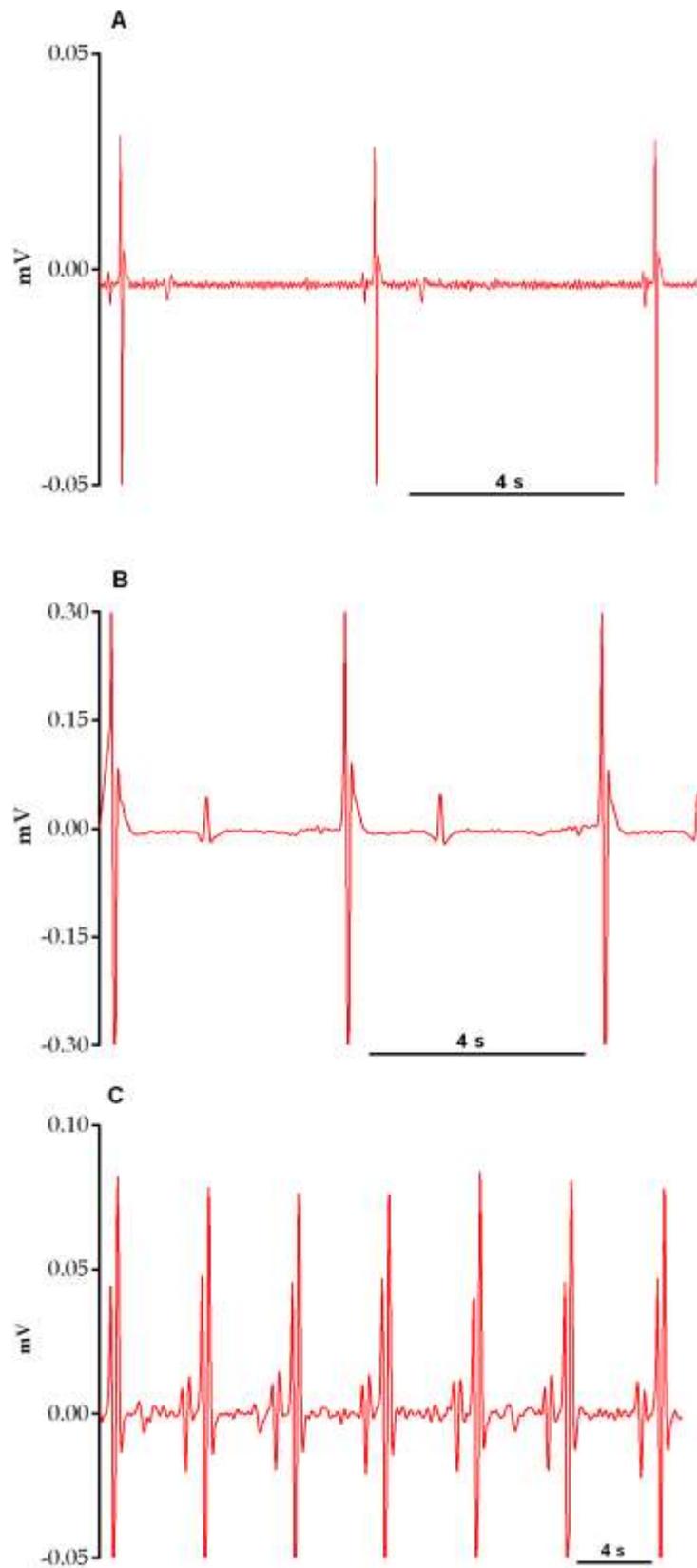
Todos os fármacos utilizados (SNP, fenilefrina e benzocaína) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para produzir as soluções anestésicas (0,05g.L⁻¹ e 0,1g.L⁻¹), a benzocaína foi pré-dissolvida em 3 ml de álcool 100% e posteriormente diluída em volume conhecido de água. O SNP e a fenilefrina foram dissolvidos em solução salina isotônica (0,9%). As doses de benzocaína utilizada para indução e manutenção da anestesia já foram amplamente utilizadas em outros estudos com peixes (SUNDIN et al., 1999; REID et al. 2003; LOPES et al., 2010). Por sua vez, as doses de fenilefrina e SNP foram baseadas em estudos prévios com anuros (ZENA et al., 2016b) e nos trabalhos de Sandblom e colaboradores (2016) e Armelin e colaboradores (2016) que utilizaram teleósteos como modelos experimentais.

3.4 Protocolo Experimental

Os eletrodos de ECG foram conectados a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC MP36 – BIOPAC Systems Inc.) que realizou um registro contínuo da f_H dos animais (taxa de amostragem de 1000 Hz) em um computador. A f_H foi acessada por meio da contagem dos complexos QRS, em batimentos por minuto (bpm) (Figura 13). Após a recuperação da cirurgia, a f_H dos animais foi coletada por 15 minutos anteriormente a qualquer intervenção farmacológica. Em seguida, agonista α_1 -adrenérgico cloridrato de fenilefrina (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foi administrado por meio da cânula intraperitoneal seguido de um *flush* de solução salina isotônica (0,4 ml), e a f_H foi monitorada por mais 15 minutos. Depois disso, os peixes passaram por outro período de recuperação de 24h (12h para *H. unitaeniatus* e *O. mykiss*) para que os efeitos da fenilefrina cessassem. Então, o protocolo foi repetido, porém ao invés de fenilefrina houve a administração do vasodilatador SNP (250 $\mu\text{g kg}^{-1}$) também seguido de um *flush* de solução salina isotônica (0,4 ml). As soluções de fenilefrina e SNP foram preparadas momentos antes da administração. As administrações desses compostos tiveram a finalidade de induzir desbalanços na pressão arterial dos animais (aumenta-la e reduzi-la, respectivamente) para que a via cronotrópica do barorreflexo pudesse ser observada.



Figura 15. Eletrocardiograma de um exemplar intacto e sob efeito de nenhum fármaco de *H. malabaricus* (A), *H. unitaeniatus* (B) e *O. mykiss* (C)



Fonte: elaborada pela autora.



3.5 Confirmação dos resultados: Teste Salina e Grupo SH

Para confirmar se os resultados obtidos não foram induzidos pelo veículo dos fármacos ou pelo estresse derivado da administração farmacológica, 4 animais do grupo IN foram submetidos ao teste salina (Grupo SA). Esses animais foram previamente submetidos a um protocolo experimental praticamente idêntico ao descrito no item 3.4, porém substituindo-se a infusão de fenilefrina e SNP pelos seus veículos puros (solução salina isotônica). Logo após a infusão da solução salina a f_H foi monitorada por 15 minutos e então depois de 1 hora iniciou-se o protocolo experimental exatamente como descrito no item 3.4.

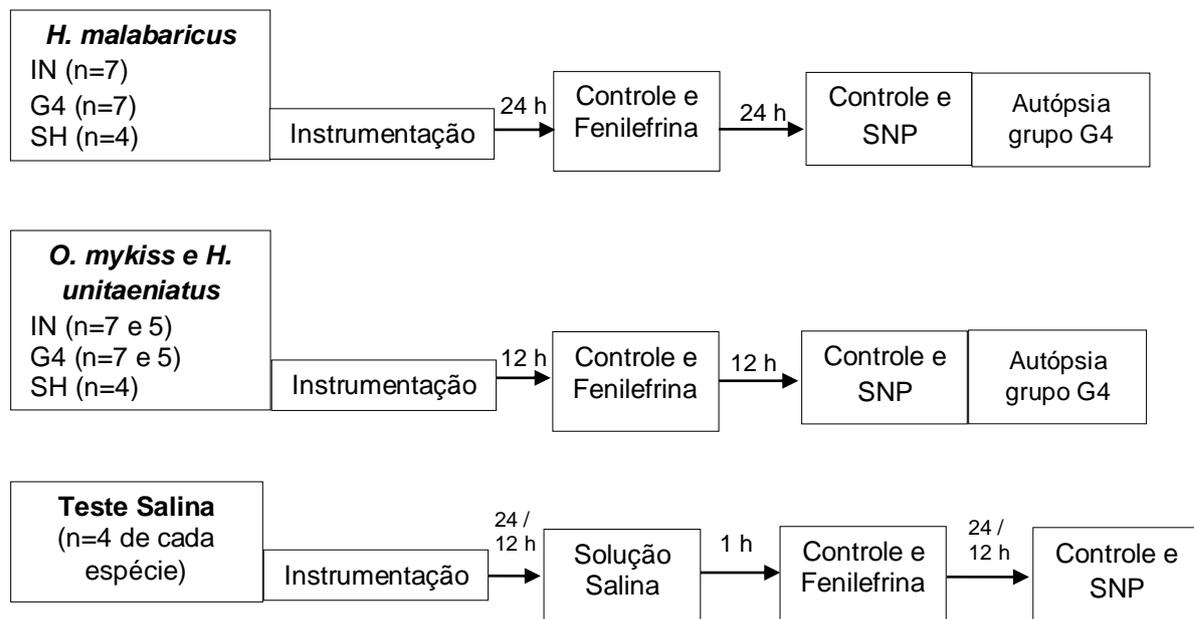
Por fim, um outro grupo de peixes passou por um procedimento de falsa operação, ou *sham-operated* (Grupo SH, n=4), na qual as inervações branquiais foram expostas, mas não transeccionadas, a fim de se observar se a exposição dos nervos ao ambiente externo já era suficiente para alterar os parâmetros coletados e/ou as respostas fisiológicas aos fármacos.

3.6 Resumo do delineamento experimental

É importante ressaltar que os protocolos descritos nos itens 3.3 e 3.4 foram realizados nas 3 espécies (*H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss*). Para facilitar o entendimento da metodologia proposta, os grupos experimentais e a ordem do protocolo experimental estão representados no fluxograma a seguir (Figura 14). Além disso, tanto na etapa realizada no Brasil quanto na realizada na Dinamarca, ao final de cada experimento os animais de todos os grupos foram eutanasiados. E como já mencionado, nos animais do grupo G4 foram realizadas autópsias para a confirmação das desenervações.



Figura 16. Representação esquemática demonstrando os grupos experimentais, o número de indivíduos para cada grupo, a ordem do protocolo experimental e os tempos de recuperação.



Fonte: elaborada pela autora.

3.7 Análise das respostas barorreflexas

As respostas barorreflexas induzidas pelas infusões farmacológicas foram analisadas, em todos os grupos experimentais, de diversas maneiras. Primeiramente, a f_H dos animais foi derivada do ECG e os dados foram plotados em gráficos descritivos, possibilitando uma observação completa dos resultados durante todo o protocolo experimental. Após, a média dos cinco minutos que antecederam as administrações farmacológicas e o valor de maior modificação na f_H contido nos 10 minutos posteriores a tais administrações (menor f_H para o experimento com fenilefrina e maior f_H para o experimento com SNP) foram plotados em gráficos comparativos e utilizados na realização dos métodos estatísticos inferenciais.

Ainda levando em consideração esses dados, o valor da f_H pós-administração farmacológica em relação à f_H pré-administração foi calculado para cada fármaco e grupo experimental, em porcentagem, por meio da equação abaixo – o que permitiu a análise das respostas barorreflexas sem a interferência das influências que as desnervações possuem na f_H .



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

A fim de observar a eficiência do reflexo barostático, também foi analisado o tempo necessário para que as respostas cronotrópicas induzidas pelos desbalanços pressóricos atingissem o seu máximo, observando-se o tempo compreendido entre as infusões farmacológicas e a maior modificação na f_H contida nos 10 minutos após as infusões (menor f_H para o experimento com fenilefrina e maior f_H para o experimento com SNP).

Por fim, considerando a relação existente entre o barorreflexo e a variabilidade da f_H , foi calculado a variabilidade total contida nos cinco minutos que antecederam as manipulações farmacológicas e nos 10 minutos que as sucederam, como método para se mensurar o quanto a f_H variou (batimento-a-batimento) nesses momentos.

Para isso, foram selecionados trechos de eletrocardiograma que estivessem livres de artefatos e ruídos. Estes trechos foram escolhidos dentro do intervalo de ação farmacológica mencionado acima. Dessa forma, foram utilizados trechos contendo 256 batimentos cardíacos para os grupos IN, G4, SH e SA de todas as espécies do estudo, assegurando assim uma quantidade suficiente de ciclos de variações necessárias para a análise espectral (CAMPBELL 2004).

A partir desses trechos selecionados, foram gerados tacogramas - gráficos nos quais são plotados os intervalos batimento-a-batimento ao longo do tempo no software BIOPAC Student Lab Pro v3.7 (BIOPAC Systems Incorporated, Goleta, CA, EUA). Então, por meio da raiz quadrada da média do quadrado das diferenças (RMSSD - Root Mean Square of the Successive Differences) entre os intervalos R-R no eletrocardiograma obtidos nos tacogramas foi possível calcular a variabilidade da f_H em milissegundos (ms).

É importante notar que os dados contidos além dos 10 minutos que prosseguem as infusões farmacológicas não foram utilizados em nenhuma análise, essa padronização foi estabelecida para garantir que mecanismos de controle a longo prazo da pressão arterial não exercessem influência nas variáveis estudadas.



3.8 Análise estatística

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

- A análise de variância one-way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, que foi utilizada para se comparar as variáveis observadas nos grupos IN, SH e SA (uma análise para cada variável).
- A análise de variância one-way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, que foi utilizada para se comparar as variáveis observadas nos grupos IN e G4 (uma análise para cada variável). Além disso, na análise da f_H pós-administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré-administração farmacológica (f_H pós-administração / f_H pré-administração $\times 100$) os dados também foram comparados a uma linha de base de 100% – referente à ausência de modificação na f_H derivada da intervenção farmacológica. Um p de 0,05 foi empregado em todas as análises de variância. As análises estatísticas e os gráficos foram plotados com auxílio do software Prism 5.0 (GraphPad Inc.). Todos os dados foram expressos como média \pm EPM.

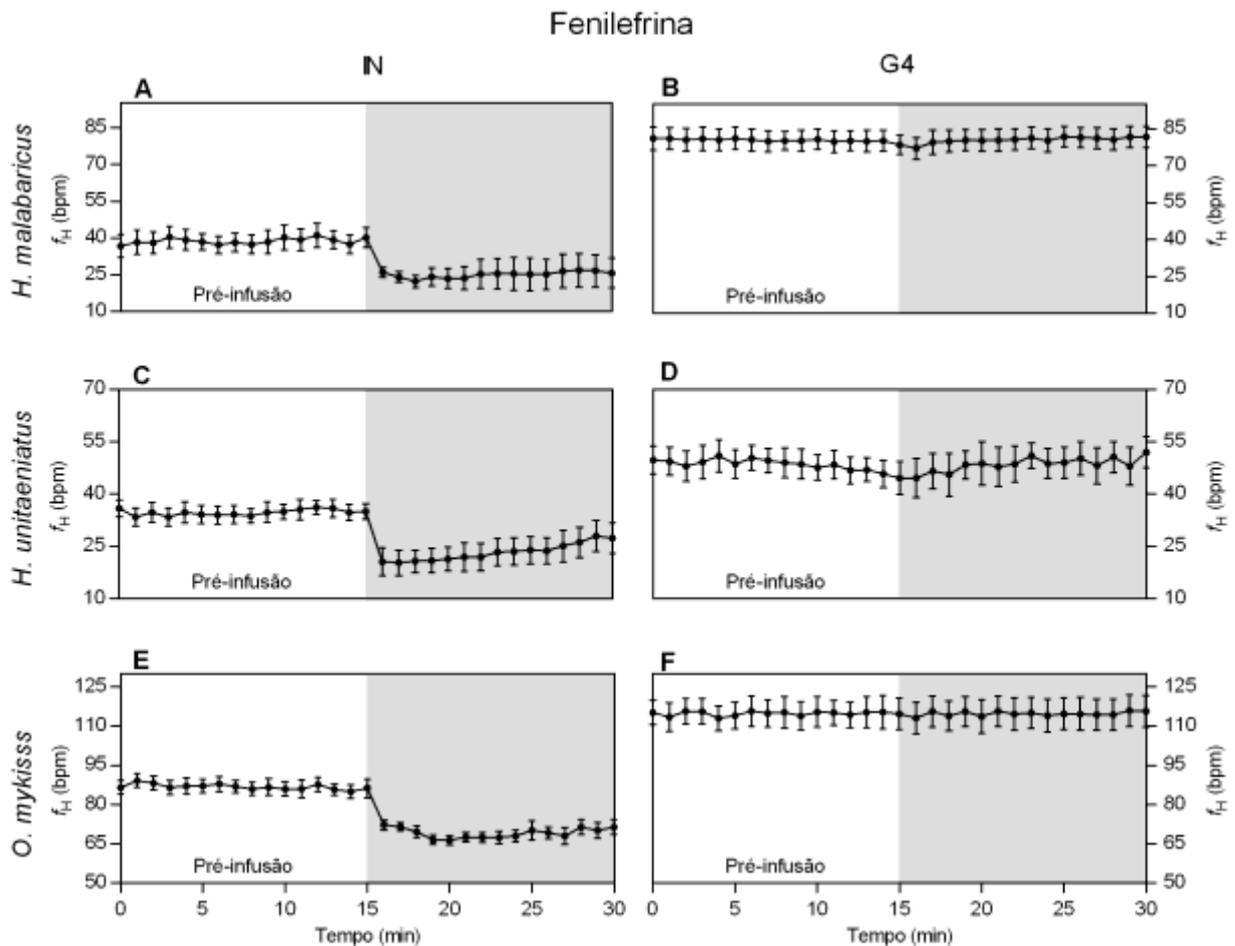


4- RESULTADOS

4.1 Grupos IN e G4

As figuras 17, 18 e 19 apresentam os valores da f_H antes e depois das infusões farmacológicas nos grupos IN e G4 nas 3 espécies estudadas. A infusão de fenilefrina promoveu uma bradicardia reflexa, enquanto a de SNP induziu uma taquicardia nos indivíduos dos grupos IN. Por outro lado, nos grupos G4, tanto a infusão de fenilefrina quanto a de SNP não provocaram alterações na f_H em nenhuma das espécies. Além disso, é possível notar que nas 3 espécies a f_H dos grupos G4 encontram-se mais elevadas em relação à f_H do respectivo grupo IN.

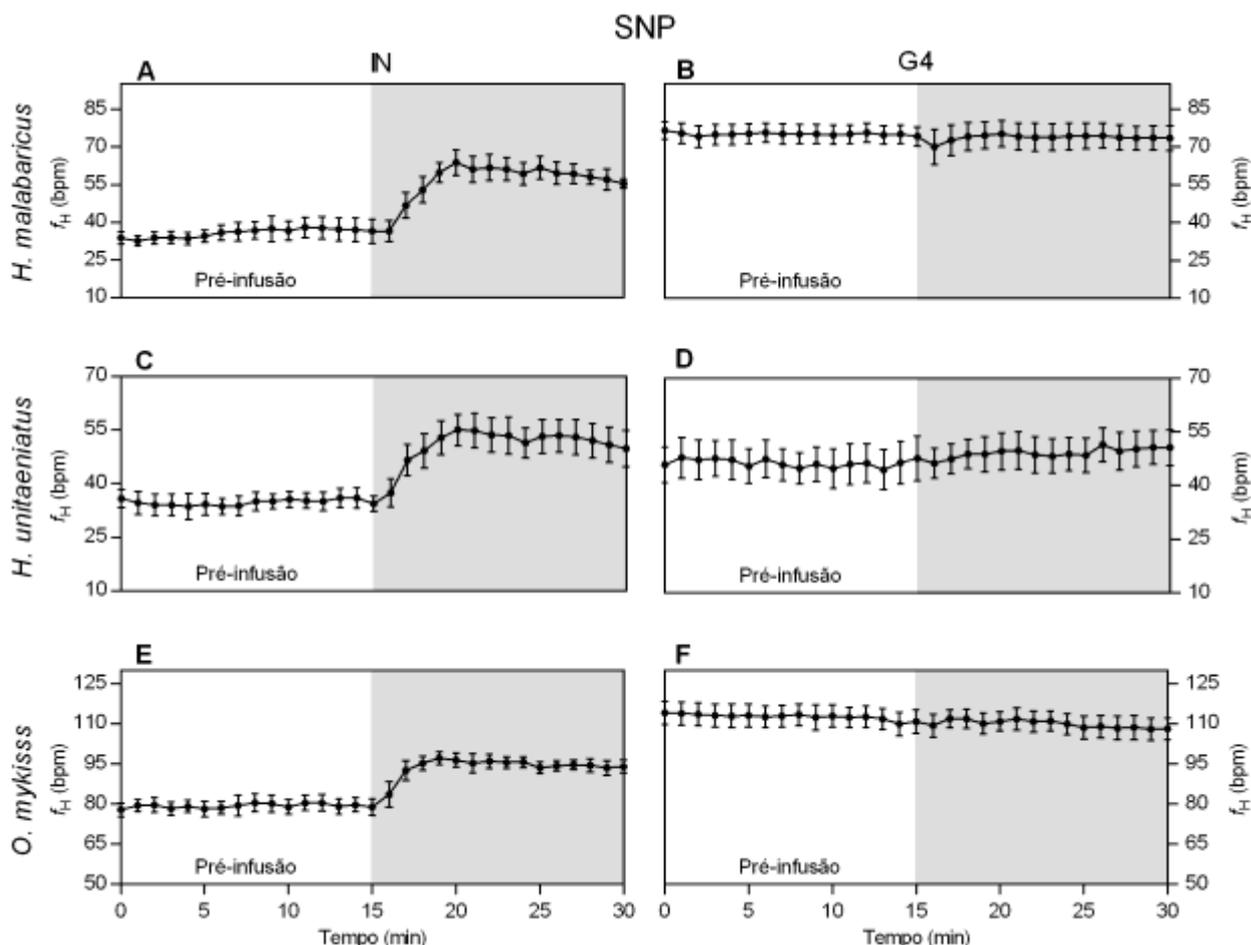
Figura 17. Gráficos descritivos mostrando a f_H de *H. malabaricus* (A, B), *H. unitaeniatus* (C, D) e *O. mykiss* (E, F) antes e depois da administração de fenilefrina em animais intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*).



Fonte: elaborada pela autora.



Figura 18. Gráficos descritivos mostrando a f_H de *H. malabaricus* (A, B), *H. unitaeniatus* (C, D) e *O. mykiss* (E, F) antes e depois da administração de SNP em animais intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*).



Fonte: elaborada pela autora.

Em *H. malabaricus*, no grupo IN a f_H basal foi $39,43 \pm 4,10$ bpm, a qual reduziu para $19,86 \pm 2,77$ bpm posteriormente a infusão de fenilefrina. Após 24 horas, a f_H basal foi $37,26 \pm 4,42$ bpm, e aumentou para $66,57 \pm 4,03$ bpm com a administração de SNP. Já os animais do grupo G4 mostraram uma f_H significativamente mais alta que aquela dos demais tratamentos ($79,60 \pm 4,22$ bpm), a qual se manteve constante independentemente da infusão de fenilefrina ($78,86 \pm 4,66$ bpm), do período de 24 horas entre experimentos ($74,89 \pm 3,69$ bpm) e da administração de SNP ($72,43 \pm 7,33$ bpm).

Enquanto em *H. unitaeniatus*, a f_H basal do grupo IN foi $35,52 \pm 2,31$ bpm, e reduziu para $18,60 \pm 3,98$ bpm após a administração de fenilefrina. Depois de 12 horas a f_H basal foi $35,44 \pm 2,34$ bpm, e subiu para $56,00 \pm 4,88$ bpm com a infusão de SNP. No grupo G4 a f_H foi



ligeiramente mais elevada que aquela dos demais tratamentos ($46,52 \pm 3,86$ bpm), a qual se manteve constante independentemente da infusão de fenilefrina ($41,00 \pm 5,85$ bpm), do período de 12 horas entre experimentos ($46,12 \pm 5,76$ bpm) e da infusão de SNP ($52,00 \pm 4,85$ bpm).

Finalmente, em *O. mykiss* o grupo IN apresentou uma f_H de $86,13 \pm 2,68$ bpm, a qual reduziu para $63,71 \pm 1,53$ bpm após a infusão de fenilefrina. Depois de 12 horas, a f_H foi $79,71 \pm 2,81$ bpm, e aumentou para $98,57 \pm 2,33$ bpm com a administração de SNP. Os animais do grupo G4 apresentaram uma f_H significativamente mais elevada que a apresentada pelos dos demais tratamentos ($115,10 \pm 5,56$ bpm), que se manteve constante mesmo após a infusão de fenilefrina ($114,70 \pm 6,25$ bpm), do período de 12 horas entre experimentos ($111,50 \pm 4,04$ bpm) e da administração de SNP ($108,00 \pm 4,15$ bpm).

A figura 20 expressa os resultados referentes a análise das mudanças na f_H frente às manipulações farmacológicas em porcentagem. Nas 3 espécies estudadas, observou-se que as infusões de fenilefrina e SNP reduziram e aumentaram a f_H , respectivamente, nos animais intactos (IN). Porém, essas respostas não foram observadas nos animais dos grupos G4, em que a f_H posterior às administrações farmacológicas foi semelhante à linha de base de 100% (referente a f_H anterior as administrações).

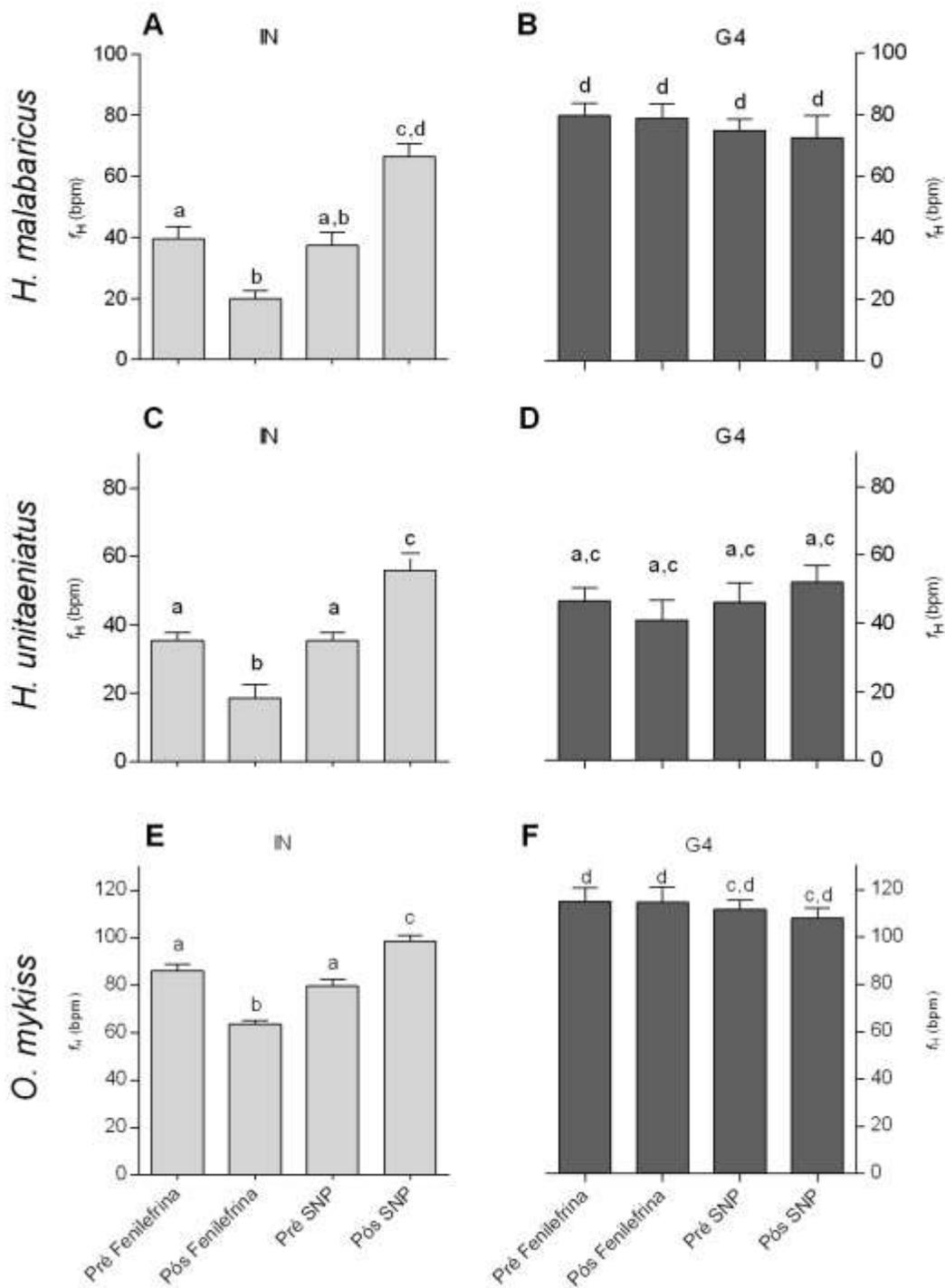
Na traíra, a infusão de fenilefrina reduziu a f_H do grupo IN para $50,70 \pm 5,44\%$ do valor observado anteriormente à administração do fármaco. Por outro lado, a infusão de SNP aumentou essa variável para $187,19 \pm 13,13\%$ do valor observado antes dessa infusão. Já no grupo G4 a f_H permaneceu inalterada frente às infusões dos fármacos ($99,02 \pm 2,40\%$ pós-fenilefrina e $95,46 \pm 6,27\%$ pós-SNP).

No jeju, a administração de fenilefrina diminuiu a f_H do grupo IN para $50,85 \pm 8,00\%$ do valor observado antes da administração da mesma. Enquanto a infusão de SNP elevou essa variável para $157,50 \pm 7,54\%$ em relação ao observado previamente a essa administração. Novamente, a f_H dos animais do grupo G4 permaneceu sem modificações significativas perante as administrações dos fármacos ($86,42 \pm 5,70\%$ pós fenilefrina e $115,00 \pm 6,86\%$ pós SNP).

Por fim, na truta arco-íris a administração de fenilefrina diminuiu a f_H dos animais do grupo IN para $74,36 \pm 2,72\%$ do valor observado previamente à infusão do fármaco. Já a infusão de SNP elevou a f_H para $124,20 \pm 3,58\%$ do valor observado anteriormente à infusão. Assim como nas demais espécies, a f_H dos animais do grupo G4 permaneceu inalterada perante as infusões dos fármacos ($99,00 \pm 2,18\%$ pós fenilefrina e $96,46 \pm 2,26\%$ pós SNP).



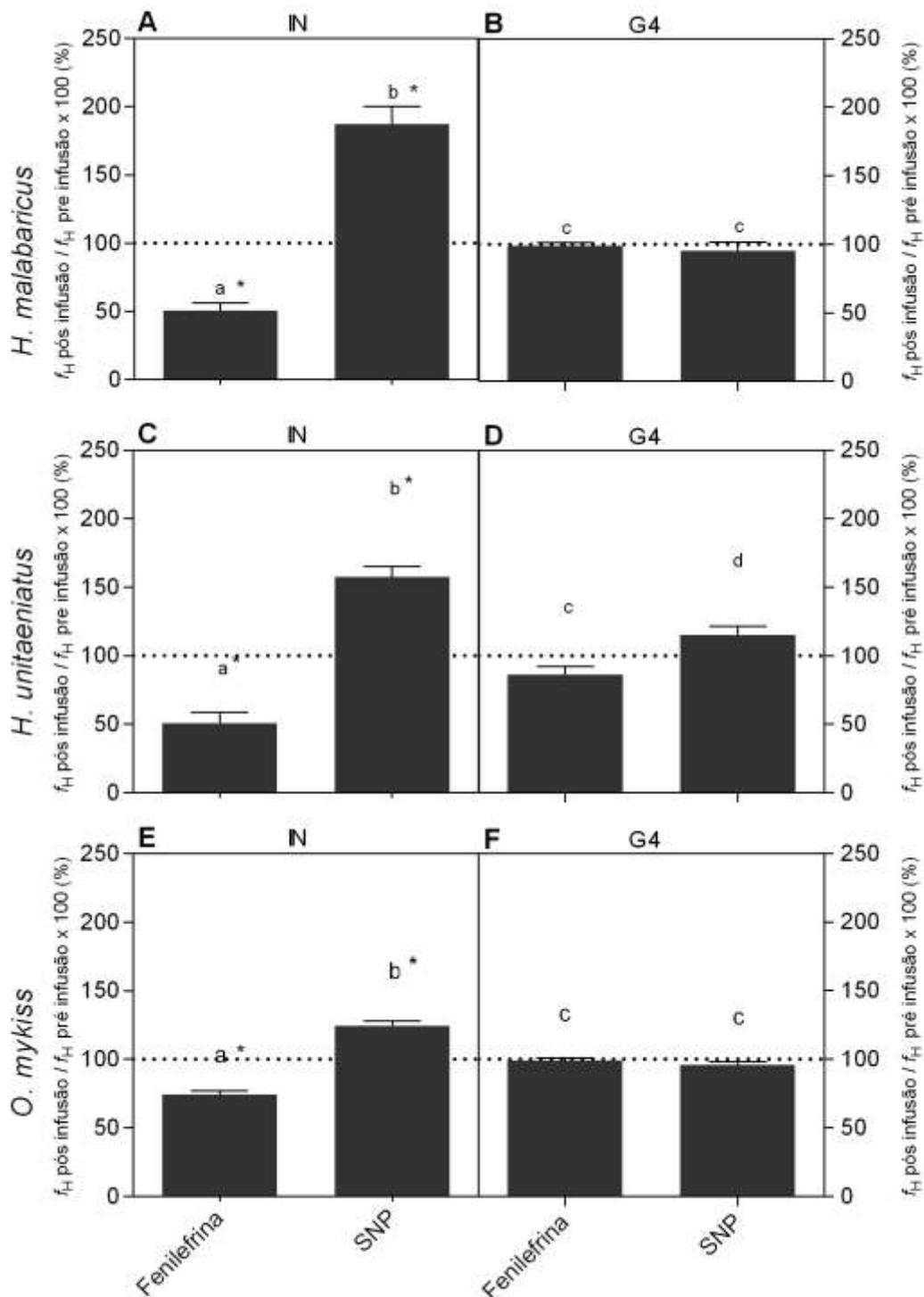
Figura 19. f_H antes e depois das administrações farmacológicas de animais intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) em *H. malabaricus* (A, B) *H. unitaeniatus* (C, D) e *O. mykiss* (E, F). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*).



Fonte: elaborada pela autora.



Figura 20. f_H pós-infusão farmacológica em porcentagem relativa à f_H -pré infusão farmacológica (f_H pós / f_H pré X 100) em animais intactos (IN), e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) de *H. malabaricus* (A,B), *H. unitaeniatus* (C,D) e *O. mykiss* (E,F) Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0,05$); Um asterisco indica diferença significativa em relação a uma linha de base de 100%. Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*).



Fonte: elaborada pela autora.



Por fim, os dados acerca da variabilidade total do intervalo R-R (RMSSD) estão organizados na figura 21. A magnitude da variabilidade total em animais intactos (IN) diferiu bastante entre as 3 espécies, porém em todas elas pode-se observar uma redução muito acentuada na variabilidade total nos animais desnervados (G4), a qual não se alterou frente a nenhuma manipulação farmacológica.

Em *H. malabaricus*, os indivíduos do grupo IN demonstraram uma variabilidade total basal de $499,2 \pm 73,31$ ms, e esse valor aumentou para $561,7 \pm 46,75$ ms após a infusão de fenilefrina. Depois das 24 horas de recuperação entre experimentos, esses animais apresentaram uma variabilidade total basal de $603,7 \pm 66,51$ ms, que decresceu para $403,1 \pm 79,3$ ms após a infusão de SNP. Previamente às manipulações farmacológicas, os animais com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4) demonstraram uma variabilidade total basal extremamente baixa ($17,39 \pm 3,86$ ms), a qual não se alterou significativamente sob nenhuma circunstância. Os valores apresentados foram de $21,74 \pm 7,01$ ms após infusão de fenilefrina, de $24,99 \pm 28,2$ ms após 24 horas e anteriormente a infusão de SNP e de $39,46 \pm 19,57$ ms posteriormente a infusão de SNP.

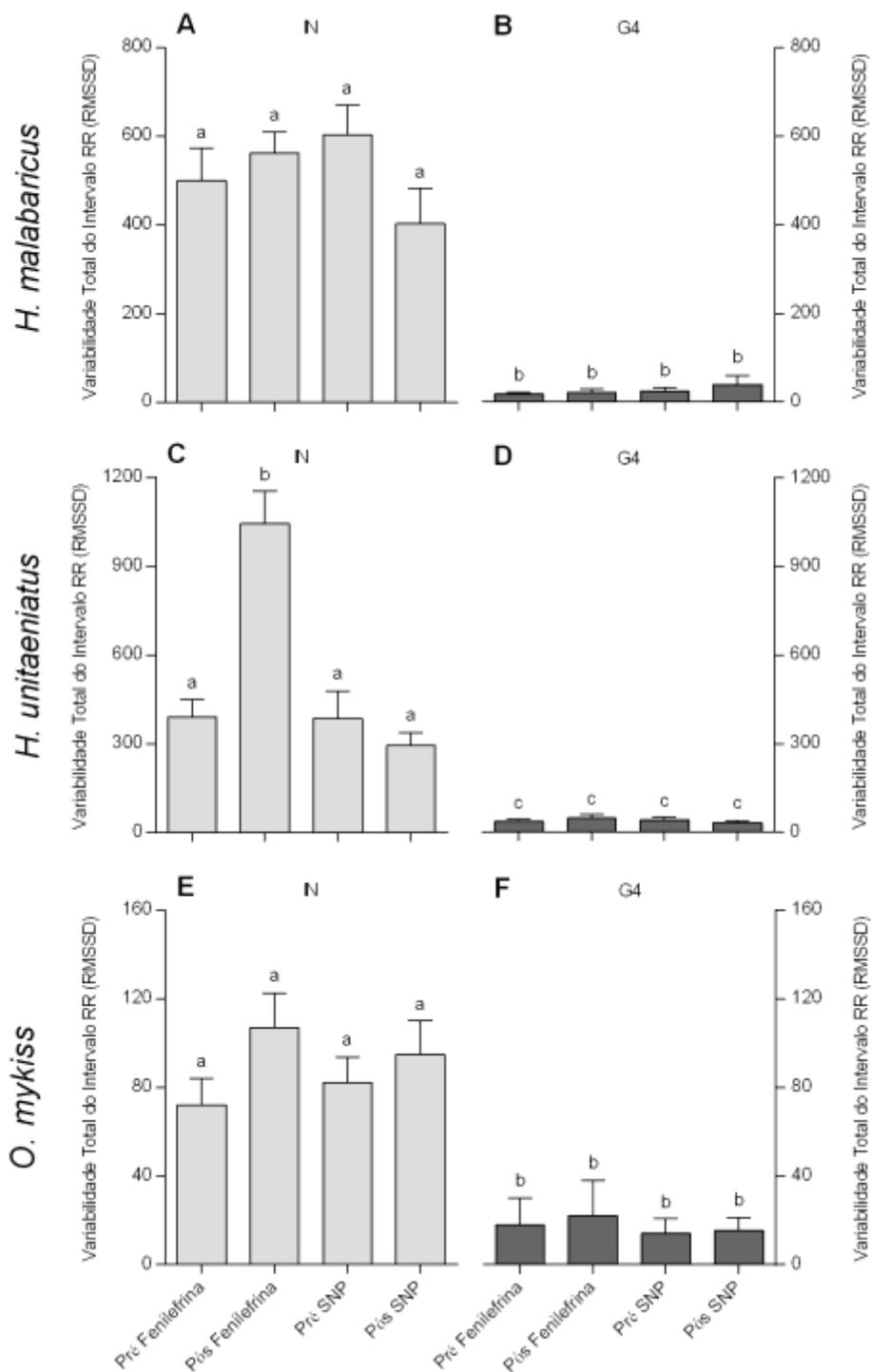
Em *H. unitaeniatus*, a variabilidade total basal do grupo IN foi $390,2 \pm 59,39$ ms e esse valor aumentou para $1044 \pm 110,5$ ms posteriormente a administração de fenilefrina. Após 12 horas de recuperação entre experimentos, os animais apresentaram uma variabilidade total basal de $386,0 \pm 92,33$ ms, que decresceu para $294,0 \pm 42,46$ ms após a infusão de SNP. Os animais do grupo G4 apresentaram uma variabilidade total basal muito reduzida ($35,84 \pm 7,944$ ms) anteriormente as manipulações farmacológicas, a qual permaneceu praticamente inalterada durante todo o protocolo. Os valores demonstrados foram de $47,46 \pm 12,27$ ms após infusão de fenilefrina, $41,78 \pm 9,27$ ms após 12 horas e anteriormente a infusão de SNP e de $31,93 \pm 7,929$ ms posteriormente a infusão de SNP.

Em *O. mykiss*, no grupo IN os animais apresentaram uma variabilidade total basal de $72,09 \pm 11,99$ ms, e esse valor aumentou para $107,0 \pm 15,34$ ms posteriormente a infusão de fenilefrina. Após as 12 horas de recuperação entre experimentos, esses animais demonstraram uma variabilidade total basal de $82,24 \pm 11,15$ ms, que permaneceu praticamente inalterada após a infusão de SNP ($94,74 \pm 15,29$ ms). Anteriormente às manipulações farmacológicas, os animais do grupo G4 demonstraram uma variabilidade total basal bastante reduzida ($17,96 \pm 12,02$ ms), que se alterou significativamente sob nenhuma circunstância. Os valores observados foram de $21,97 \pm 15,92$ ms após infusão de fenilefrina, de $14,23 \pm 6,46$ ms após



12 horas e anteriormente a infusão de SNP e de $15,54 \pm 5,68$ ms posteriormente a infusão de SNP.

Figura 21. Variabilidade total do intervalo R-R (RMSSD) de *H. malabaricus* (A, B), *H. unitaeniatus* (C, D) e *O. mykiss* (E, F) intactos (IN) e com os quatro pares de arcos branquiais desnervados (G4). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*).



Fonte: elaborada pela autora



4.2 Grupo SH e Teste Salina

Na tabela 2 encontram-se os dados referentes a f_H de animais intactos (IN), *sham-operated* (SH) e teste salina (SA). É possível observar que nas 3 espécies analisadas os resultados referentes ao grupo SH são muito semelhantes aos do grupo IN, em ambos ocorre uma bradicardia posterior à infusão de fenilefrina e uma taquicardia posterior ao SNP. Também é possível notar que no teste salina (SA) a substituição dos fármacos pelo veículo que os dissolviam (solução salina) não causou mudanças significativas na f_H em nenhuma das espécies estudadas.

Tabela 2. Frequência cardíaca de *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss* intactos (IN), falso-operados (SH) e tratados com solução salina isotônica (SA). Valores expressos em média \pm EPM. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos IN, SH e SA nas três espécies estudadas, assim como anteriormente e posteriormente o tratamento com solução salina isotônica (ANOVA de via única complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; $P \leq 0,05$).

| | Grupo | Pré-Fenilefrina ou Salina | Pós-Fenilefrina ou Salina | Pré-SNP | Pós-SNP |
|------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|----------------|-----------------|
| <i>H. malabaricus</i> | IN ($N = 7$) | 39,4 \pm 4,1 | 19,8 \pm 2,7 | 37,2 \pm 4,4 | 66,5 \pm 4,0 |
| | SH ($N = 4$) | 50,3 \pm 5,6 | 30,2 \pm 4,6 | 46,0 \pm 3,7 | 71,5 \pm 9,8 |
| | SA ($N = 4$) | 43,2 \pm 4,8 | 38,0 \pm 1,4 | | |
| <i>H. unitaeniatus</i> | IN ($N = 5$) | 35,5 \pm 2,3 | 18,6 \pm 3,9 | 35,4 \pm 2,3 | 56,0 \pm 4,8 |
| | SH ($N = 4$) | 36,4 \pm 6,6 | 21,5 \pm 6,5 | 39,1 \pm 5,2 | 62,7 \pm 5,7 |
| | SA ($N = 4$) | 35,1 \pm 4,0 | 25,7 \pm 1,3 | | |
| <i>O. mykiss</i> | IN ($N = 7$) | 86,1 \pm 2,6 | 63,7 \pm 1,5 | 79,7 \pm 2,8 | 98,5 \pm 2,3 |
| | SH ($N = 4$) | 87,3 \pm 4,5 | 67,2 \pm 5,9 | 87,8 \pm 2,7 | 111,3 \pm 3,1 |
| | SA ($N = 4$) | 72,5 \pm 4,3 | 78,5 \pm 6,1 | | |

Fonte: elaborada pela autora.

Ademais, nas tabelas 3 e 4 podemos observar que os métodos estatísticos inferenciais também mostraram que os dados referentes ao grupo SH são muito similares aos do grupo IN nas análises da f_H em porcentagem e da variabilidade total do intervalo R-R (RMSSD). Em relação ao teste salina, mais uma vez ficou demonstrado que a substituição dos fármacos pelo veículo que os dissolviam (solução salina) não causou mudanças significativas na f_H nas 3 espécies do estudo.



Tabela 3. f_H pós-administração farmacológica em porcentagem relativa à f_H pré-administração farmacológica (f_H pós-administração / f_H pré-administração \times 100) *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss* em animais intactos (IN), *sham-operated* (SH) e teste salina (SA). Valores expressos em média \pm EPM. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos IN, SH e SA nas três espécies estudadas, um asterisco indica diferença estatisticamente significativa para com uma linha de base de 100% ($p \leq 0,05$).

| | Grupo | Fenilefrina ou Salina | SNP |
|------------------------|----------------|-----------------------|---------------------|
| <i>H. malabaricus</i> | IN ($N = 7$) | 50,70 \pm 5,44 * | 187,2 \pm 13,13 * |
| | SH ($N = 4$) | 61,06 \pm 7,58 | 155,1 \pm 16,66 * |
| | SA ($N = 4$) | 91,35 \pm 11,34 | - |
| <i>H. unitaeniatus</i> | IN ($N = 5$) | 50,85 \pm 8,00 * | 157,5 \pm 7,54 * |
| | SH ($N = 4$) | 54,85 \pm 8,96 * | 166,3 \pm 12,17 * |
| | SA ($N = 4$) | 74,71 \pm 4,66 | - |
| <i>O. mykiss</i> | IN ($N = 7$) | 74,36 \pm 2,72 * | 124,20 \pm 3,58 * |
| | SH ($N = 4$) | 76,80 \pm 3,72 * | 126,70 \pm 1,67 * |
| | SA ($N = 4$) | 108,00 \pm 2,29 | - |

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 4. Variabilidade total do intervalo RR (RMSSD) de *H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss* intactos (IN), falso-operados (SH) e tratados com solução salina isotônica (SA). Valores expressos em média \pm EPM. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos IN, SH e SA nas três espécies estudadas, assim como anteriormente e posteriormente o tratamento com solução salina isotônica (ANOVA de via única complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; $P \leq 0,05$).

| | Grupo | Pré-Fenilefrina ou Salina | Pós-Fenilefrina ou Salina | Pré-SNP | Pós-SNP |
|------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| <i>H. malabaricus</i> | IN ($N = 7$) | 499,2 \pm 73,3 | 561,7 \pm 46,7 | 603,7 \pm 66,5 | 403,1 \pm 79,3 |
| | SH ($N = 4$) | 366,8 \pm 138,7 | 451,7 \pm 164,9 | 438,8 \pm 135,6 | 204,8 \pm 43,1 |
| | SA ($N = 4$) | 394,9 \pm 30,4 | 382,0 \pm 47,6 | | |
| <i>H. unitaeniatus</i> | IN ($N = 5$) | 390,2 \pm 59,3 | 1044,0 \pm 110,5 | 386,0 \pm 92,3 | 294,0 \pm 42,4 |
| | SH ($N = 4$) | 422,0 \pm 107,4 | 614,4 \pm 161,6 | 523,5 \pm 219,5 | 225,7 \pm 99,4 |
| | SA ($N = 4$) | 531,2 \pm 57,1 | 665,5 \pm 97,5 | | |
| <i>O. mykiss</i> | IN ($N = 7$) | 72,0 \pm 11,9 | 107,0 \pm 15,34 | 82,2 \pm 11,1 | 94,7 \pm 15,2 |
| | SH ($N = 4$) | 76,2 \pm 30,8 | 83,0 \pm 15,7 | 79,7 \pm 27,7 | 92,1 \pm 22,4 |
| | SA ($N = 4$) | 103,4 \pm 25,3 | 103,6 \pm 11,3 | | |

Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados relativos ao tempo decorrido até a resposta cronotrópica barorreflexa máxima estão plotados em minutos (min) no gráfico abaixo (figura 22). Novamente, podemos observar uma resposta similar entre os grupos IN e SH frente às infusões farmacológicas.

Em traíra, após à administração de fenilefrina, os indivíduos do grupo IN levaram $6,57 \pm 1,08$ min para atingir o vale da mudança na f_H , enquanto que os indivíduos do grupo SH levaram $10,50 \pm 1,84$ min. Em relação à administração de SNP, o grupo IN atingiu o pico da resposta em $7,14 \pm 1,62$ min e o grupo SH em $6,50 \pm 1,65$ min.

No jeju, posteriormente a administração de fenilefrina, os indivíduos do grupo IN levaram $1,80 \pm 0,58$ min para atingir o vale da resposta na f_H , enquanto que os indivíduos do

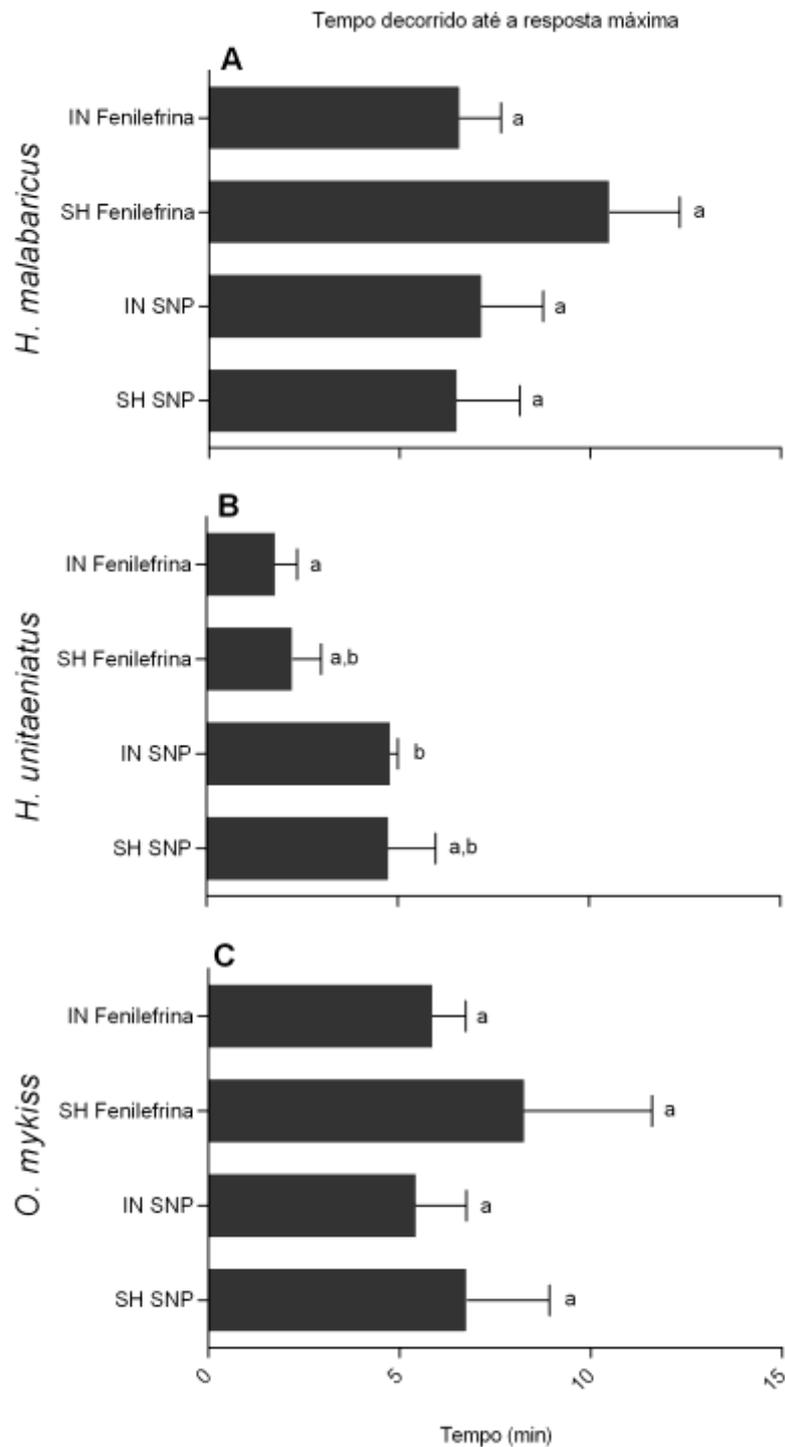


grupo SH levaram $2,25 \pm 0,75$ min. No que concerne à infusão de SNP, o grupo IN atingiu o pico da resposta em $4,80 \pm 0,20$ min e o grupo SH em $4,75 \pm 1,25$ min.

Finalmente, em truta arco-íris, os indivíduos do grupo IN frente à infusão de fenilefrina levaram $5,85,1 \pm 0,88$ min para atingir o vale da resposta na f_H , enquanto que os indivíduos do grupo SH levaram $8,25 \pm 3,35$ min. Já após a infusão de SNP, o grupo IN atingiu o pico da resposta em $5,42 \pm 1,32$ min e o grupo SH em $6,75 \pm 2,17$ min.



Figura 22. Tempo decorrido até a resposta cronotrópica barorreflexa máxima de *H. malabaricus* (A), *H. unitaeniatus* (B) e *O. mykiss* (C), em animais intactos (IN) e sham-operated (SH). Valores que não compartilham uma letra superscrita são significativamente diferentes considerando uma mesma espécie ($p \leq 0.05$). Não há dados acerca dos indivíduos submetidos à desnervação dos quatro pares de arcos branquiais (G4) e ao teste salina (SA) porque esses não apresentaram reflexo barostático. Dados expressos em média \pm EPM ($N=7$ em *H. malabaricus* e *O. mykiss*; $N=5$ em *H. unitaeniatus*).



Fonte: elaborada pela autora



5. DISCUSSÃO

5.1 – Crítica ao método

Nesse trabalho é evidente a ausência de dados sobre a pressão arterial dos animais, porém essa ausência é justificável por diversos fatores. Em geral, a metodologia usada para se aferir pressão arterial em peixes consiste em um transdutor de pressão conectado a uma cânula de polietileno inserida em uma artéria, em um sentido contrário ao do fluxo sanguíneo. Para tal, é necessária uma artéria de acesso relativamente fácil, e na qual os valores de pressão retratem os valores encontrados em vasos da circulação central, pois a circulação central é a responsável por estabelecer o gradiente pressórico que mantém a circulação do sangue pelo corpo. Existem 2 principais artérias utilizadas na maioria dos estudos envolvendo análise de pressão arterial em peixes, a artéria caudal e a artéria branquial aferente (Figura 21) (AXELSSON e FRITSCHÉ, 1994).

O procedimento de canulação da artéria branquial aferente trata-se de um procedimento bastante rápido e eficaz, que já foi executado anteriormente em *H. malabaricus* e *O. mykiss* utilizadas no presente estudo (SUNDIN et al., 1999; AXELSSON e FRITSCHÉ, 1994). Porém, não existe nenhum trabalho que tenha realizado essa técnica em *H. unitaeniatus*, e devido a quantidade muito reduzida de exemplares disponíveis para esse estudo, não seria viável, pois muitos animais seriam perdidos durante o estabelecimento da técnica e não seria adequado usar um tipo de técnica em uma espécie e outro tipo de técnica nas demais.

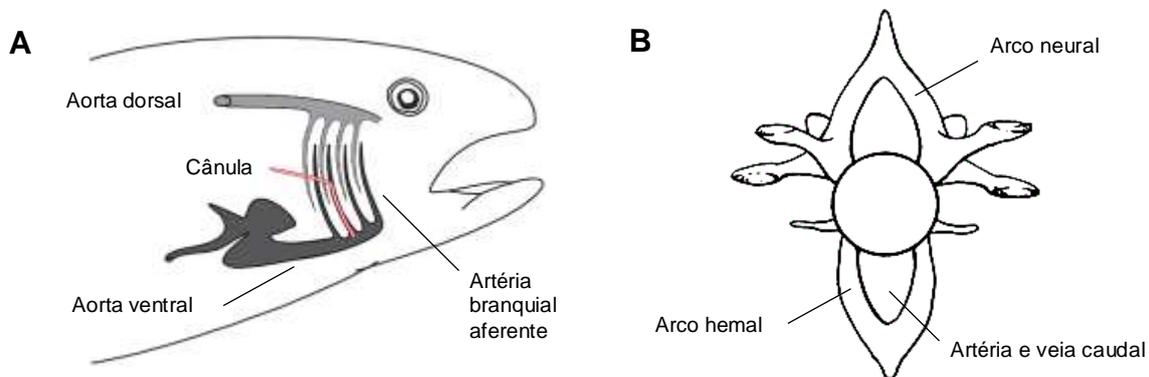
Para a canulação da artéria caudal é necessário a exposição lateral do arco hemal da cauda dos animais e a inserção da cânula praticamente às cegas, uma vez que a artéria caudal se localiza muito próxima de sua respectiva veia. (AXELSSON e FRITSCHÉ, 1994; GILMOUR et al., 2005). Tal técnica também se tornou pouco viável para esse estudo, visto que envolve grande risco de ocorrência de hemorragia, o que modifica rapidamente a volemia em indivíduos pequenos. Além disso, o tamanho corporal desses animais também dificulta e conseqüentemente estende drasticamente o tempo de duração dos procedimentos pré-experimentais.

Por conta da quantidade de espécimes de *H. unitaeniatus* disponíveis para o projeto, o ideal seria metodologias que envolvessem baixo risco de morte ou comprometimento da saúde. Além disso, nessa espécie o tempo de recuperação precisou ser reduzido para 12 horas, pois os animais do grupo G4 não sobreviviam mais do que 30 horas, o que tornou ainda mais



necessário uma cirurgia menos invasiva (que não envolvesse perda de sangue excessiva) e de recuperação mais rápida.

Figura 23. Localização da artéria branquial aferente (A) e do sistema arteriovenoso caudal (B) em teleósteos.



Fonte: (A) Imagem modificada de Armelin, 2015; Sandblom e Axelsson (2005); (B) Esquema adaptado de <<http://people.eku.edu/ritchison/g/342notes2.htm>> Acesso em maio de 2018.

Em razão dos fatores mencionados acima, optou-se pela não aquisição da pressão arterial nesse trabalho, como uma forma de garantir uma maior taxa de sucesso durante experimentos e, conseqüentemente, maior confiabilidade nos resultados obtidos. Porém, ainda é possível argumentar que sem a aquisição da pressão arterial, não é possível ter certeza se as respostas vasomotoras esperadas com a infusão da fenilefrina e do SNP ocorrem.

No entanto, todas as respostas observadas na f_H após as infusões farmacológicas condizem com as respostas padrões do barorreflexo, que são extremamente bem definidas: ocorrência de bradicardia após administração de um vasoconstritor (fenilefrina) e de taquicardia após infusão de um vasodilatador (SNP).

5.2 – Localização dos barorreceptores e respostas barorreflexas

Nos gráficos descritivos e inferenciais podemos observar que os animais intactos (IN) das 3 espécies estudadas apresentaram resposta cronotrópica significativa às manipulações farmacológicas (figuras 17,18,19, 20 e 21). Embora em *O. mykiss* e *H. unitaeniatus* o tempo de recuperação tenha sido reduzido para 12 horas, os indivíduos do grupo IN apresentaram uma f_H basal (previamente à infusão dos fármacos) semelhante à encontrada em outros estudos realizados com essas espécies com tempo de recuperação de 24 horas (VERA e PRIEDE, 1991; REID e PERRY, 2003; MCKENZIE et al. 2007).



Vera e Priede (1991) observaram uma f_H em torno de 70 bpm em trutas instrumentadas com eletrodos de ECG, com massa entre 200-350 g e a 15 °C. Como também, no estudo de Reid e Perry (2003), trutas com massa entre 200-250 g, instrumentadas com uma cânula na aorta dorsal e uma cânula na cavidade bucal e/ou uma cânula na veia caudal, exibiram uma f_H em torno 75 bpm a 12 °C. Levando em consideração a massa dos animais e a temperatura em que os protocolos experimentais foram conduzidos tais valores podem ser considerados semelhantes aos encontrados nessa espécie no presente estudo onde a f_H basal ficou em torno de 80 bpm ($86,13 \pm 2,68$ previamente à infusão de fenilefrina e $79,71 \pm 2,81$ previamente a infusão de SNP) a 19 °C.

Em relação a *H. unitaeniatus*, McKenzie e colaboradores (2007) observaram uma f_H de $32,10 \pm 1,80$ bpm em animais com massa em torno de 250 g, instrumentados da mesma forma que no presente estudo (com eletrodos de ECG e uma cânula intraperitoneal) e também aclimatados a 25 °C. Por outro lado, Lopes e colaboradores (2010) e Boijink e colaboradores (2010) verificaram uma f_H um pouco mais elevada ($43,00 \pm 4,50$ bpm e $54,6 \pm 3,4$, respectivamente) entretanto a instrumentação utilizada foi relativamente diferente, visto que além de introduzir cânula na artéria caudal para coletar a f_H e a pressão arterial, uma cânula foi inserida na veia caudal e outras duas cânulas foram colocadas na cavidade bucal.

Tais estudos envolveram procedimentos pré-experimentais mais longos, o que provavelmente justifica essa f_H levemente mais elevada, mesmo em indivíduos de massa maior que os do presente estudo (184 e 200-250 g respectivamente). Novamente, se levarmos em consideração as diferenças entre as massas corpóreas, a f_H basal em torno de 35 bpm observada no presente estudo está em consonância com alguns estudos encontrados na literatura.

Por fim, em relação a f_H basal de *H. malabaricus*, Monteiro e colaboradores (2013) observaram essa variável entre 55-49 bpm, a 25°C em animais com massa semelhante à do presente trabalho. Contudo, como também foram avaliadas as variáveis respiratórias, os animais passaram por uma instrumentação envolvendo cânulas nos opérculos e na cavidade bucal, além dos eletrodos de ECG. Ademais, tempo de recuperação foi 12 h. Tais diferenças na metodologia possivelmente explicam o valor ligeiramente mais elevado que a f_H basal do presente estudo.

Sundin e colaboradores (1999) utilizaram o mesmo tempo de recuperação, a mesma temperatura e animais de massas similares, mas optaram pela canulação da artéria branquial aferente, obtendo uma f_H basal de $46,0 \pm 5,4$ bpm. Mais uma vez, a f_H basal encontrada no



presente estudo, para essa espécie, pode ser considerada de acordo com a literatura científica, visto que utilizou metodologias menos invasivas, o que explica as ligeiras mudanças encontradas para o padrão desta variável.

Nas 3 espécies, no grupo IN, a administração de fenilefrina promoveu rapidamente uma bradicardia, enquanto a administração de SNP promoveu taquicardia (figuras 17A, C, E e 18A, C, E). Tais respostas evidenciam a ocorrência de um aumento e de uma redução na pressão arterial, respectivamente. Já os indivíduos do grupo G4, por sua vez, não demonstraram resposta cronotrópica reflexa aos efeitos dos fármacos, o que denota ausência de reflexo barostático (figuras 17B, D, F, e 18B, D, F).

O fato da f_H do grupo G4 ter sido mais elevada que a do grupo IN nas 3 espécies indica que os barorreceptores, quimiorreceptores e mecanorreceptores branquiais provavelmente participam da manutenção de um tônus colinérgico basal nessas espécies, o qual foi retirado com a desnervação total das brânquias. Essa possível relação já foi observada em estudos envolvendo desnervações branquiais tanto em traíra, jeju e truta quanto em outras espécies (SUNDIN, et al., 1999; REID et al., 2000; LEITE et al., 2007; FLORINDO et al., 2006; BOIJINK et al., 2010; FLORINDO et al., 2018).

Em relação à análise de porcentagem de mudanças na f_H após as infusões farmacológicas, também foi possível observar que a administração de fenilefrina e SNP no grupo IN reduziu e aumentou a f_H , respectivamente (figura 20A, C, E). Novamente, nas 3 espécies não foram observadas respostas nos animais do grupo G4, onde a f_H posterior às administrações farmacológicas foi praticamente idêntica à linha de base de 100% (relativa a f_H anterior as administrações) (figura 20B, D, F). Sendo assim, conjuntamente com a análise da f_H bruta, esses dados confirmam a ocorrência de barorreflexo no grupo IN, mas não no grupo G4, tanto nas 2 espécies de respiração exclusivamente aquática quanto na espécie que apresenta respiração bimodal.

Ademais podemos observar nas duas espécies de eritrínídeos uma resposta mais pronunciada frente à administração de SNP (187,19 e 157,50 %, respectivamente) em relação à de fenilefrina (50,70 e 50,85%, respectivamente). Esse fato pode indicar uma maior sensibilidade a hipotensão do que a hipertensão nessas espécies. Sandblom e colaboradores (2016) também observaram uma resposta semelhante no teleósteo *Perca fluviatilis*. No estudo, comparou-se a resposta barorreflexa em 2 temperaturas de aclimação diferentes, e nos 2 grupos experimentais os animais apresentaram a taquicardia pós-SNP mais intensa que a bradicardia pós-fenilefrina. Os autores argumentam que essa resposta fortalece a hipótese do



papel do barorreflexo em peixes não ser apenas prevenir sobrecargas de pressão, como também evitar a ocorrência de episódios hipotensos e assim manter a pressão de perfusão tecidual adequada.

Essa taquicardia mais pronunciada não foi observada na truta arco-íris. Uma possível explicação seria a temperatura na qual o experimento foi realizado. A espécie apresenta uma faixa de tolerância térmica entre 0 a 25°C e o experimento foi executado dentro dessa faixa, porém próximo ao limite máximo, o que provavelmente aumentou a f_H basal dos animais, reduzindo sua capacidade regulatória para a taquicardia barorreflexa (FARREL et al., 1996). Uma maior sensibilidade a hipotensão também já foi observada em anfíbios anuros por Hedrick e colaboradores (2015) e Zena e colaboradores (2015).

Acerca da variabilidade da f_H , é possível observar nos gráficos da figura 21 que os animais do grupo G4 demonstraram uma variabilidade basal extremamente reduzida, que não se alterou sob nenhuma circunstância (infusão de fenilefrina e SNP), condição que aponta para a quase ausência de controle a curto prazo da f_H . Um resultado semelhante foi observado no tambaqui por Armelin e colaboradores (2016), onde os animais com os quatro pares de arcos branquiais desnervados apresentaram uma redução drástica na variabilidade da f_H em relação aos animais intactos. Enquanto os animais intactos apresentaram uma variabilidade basal de $531,2 \pm 61,7$ ms, os animais com os 4 arcos desnervados exibiram uma variabilidade basal de $64,6 \pm 14,4$ ms, que assim como no presente estudo, não se alterou frente às manipulações farmacológicas do protocolo utilizado por esses autores (fenilefrina e prazosina).

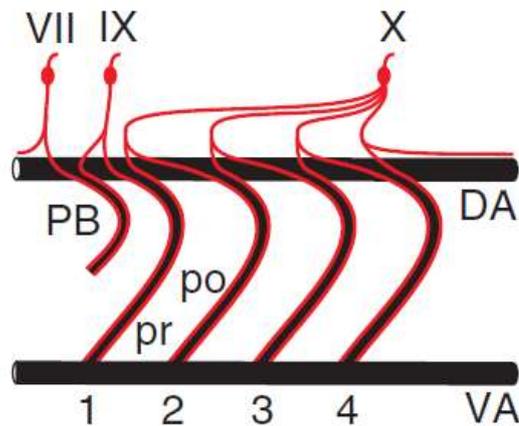
Tais resultados, juntamente àqueles da f_H bruta e em porcentagem, atestam a ausência de reflexo barostático nos indivíduos dos grupos G4 e, conseqüentemente, confirmam a localização estritamente branquial dos barorreceptores nas espécies do estudo. Esses dados indicam também que a regulação do barorreflexo cardíaco nessas espécies é mediada exclusivamente pelos nervos cranianos IX (glosssofaríngeo) e o X (vago).

Um outro ponto a evidenciar é que a truta arco-íris é a única espécie do presente estudo que apresenta pseudobrânquias, e tais estruturas são inervadas por um ramo do nervo craniano IX e, em alguns casos, também podem receber inervação extra de um ramo do nervo craniano VII (Figura 22) (LAURENT e DUNEL, 1966; DUNEL, 1968; LAURENT e ROUZEAU, 1972; LAURENT e DUNEL, 1984; NILSSON, 1984; JONZ e NURSE, 2008). Esses ramos não foram seccionados no grupo G4 e ainda assim não houve nenhuma resposta



barorreflexa. Isso demonstra que na truta arco-íris as pseudobrânquias não apresentam barorreceptores.

Figura 24. Representação esquemática dos arcos branquiais, pseudobrânquias e sua inervação. Visão lateral esquerda do suprimento nervoso para os arcos branquiais e pseudobrânquias dos nervos cranianos (VII, IX e X). PB = Pseudobrânquias em teleósteos; VA = aorta ventral; DA = aorta dorsal. Estruturas branquiais são inervadas por divisões pós-ganglionares (vermelhas) de ramos pré-tremáticos (pr) e pós-tremáticos (po).



Fonte: adaptado de JONZ e NURSE (2008).

Ademais, trabalhos mais recentes concluíram que é improvável que as pseudobrânquias desempenhem um papel significativo na detecção de O_2 em truta arco-íris e em algumas outras espécies estudadas (RANDALL e JONES, 1973; DAXBOECK e HOLETON, 1978; REID e PERRY, 2003; JONZ e NURSE, 2008; MILSOM, 2012). Outra evidência recente, em uma espécie do mesmo gênero que a truta arco-íris (*Oncorhynchus tshawytscha*) sugeriu que o papel desta estrutura na osmorregulação, se houver, é limitado (JONZ e NURSE, 2008; QUINN et al., 2003). No presente trabalho ficou demonstrado que esse órgão também não constitui um sítio barossensível, posto que não apresenta barorreceptores.

Quanto aos experimentos com os grupos *sham-operated* (SH), observa-se que as respostas nesses animais foram estatisticamente semelhantes às aquelas apresentadas pelos grupos IN das respectivas espécies, confirmando assim que a exposição das inervações branquiais ao meio externo não interferiu nos resultados do presente estudo (tabelas 2-4). Ademais, a análise do tempo decorrido até a resposta barorreflexa máxima mostrou que a reação do grupo IN à fenilefrina e ao SNP foi semelhante à reação do grupo SH. Com base



nesses resultados é possível inferir que a exposição dos nervos branquiais ao meio externo não prejudicou o reflexo barostático.

Ainda em relação ao tempo decorrido até a resposta baroreflexa, é possível observar que os animais do grupo IN de *H. unitaeniatus* responderam mais rápido às infusões de fenilefrina e SNP em comparação com o grupo IN das demais espécies. Possivelmente isso se deve ao fato dessa espécie apresentar locomoção terrestre, o que permite a esses animais sobreviverem em ambiente terrestre por longos períodos, podendo sair dos corpos d'água que ocupam para forragear e/ou evitar situações desfavoráveis (e.g. competição, predação, hipóxia aquática) (KRAMER et al., 1978; PACE E GIBB, 2014).

Em ambientes terrestres a dinâmica circulatória dos animais é mais sensível à ação gravitacional do que em ambientes aquáticos. Isso acontece porque no ambiente aquático as densidades da água e dos fluidos corporais são semelhantes entre si, e assim os gradientes de pressão hidrostática existentes em colunas verticais de sangue são contrabalanceados pela pressão imposta pela água que envolve o indivíduo. Já em terra, a densidade do ar é mais baixa que a dos fluidos corporais, não havendo tal contrabalanceamento (LILLYWHITE, 1996). Dessa forma, espécies que apresentam algum grau de terrestrialidade, como o jeju, estiveram expostos às influências da gravidade na hemodinâmica durante sua história evolutiva, a qual pode ter exercido importantes pressões seletivas na eficiência barorreflexa da mesma.

Uma observação semelhante sobre a influência da gravidade na hemodinâmica dos organismos terrestres foi realizada por Lillywhite (1996). No estudo, foram comparadas as adaptações morfológicas e fisiológicas de serpentes aquáticas e terrestres à ação gravitacional. O autor constatou que as serpentes terrestres são mais aptas a lidar com as interferências da gravidade na hemodinâmica, pois apresentam maior tônus muscular basal, pele mais aderida ao corpo e pressão arterial mais alta quando comparadas às serpentes aquáticas, diferenças essas que previnem a ocorrência de acúmulos sanguíneos e auxiliam na manutenção da circulação sanguínea. Sendo, portanto, mais uma forte evidência de que os obstáculos gerados pela ação gravitacional selecionaram os indivíduos mais aptos a lidar com tais exigências, refletindo nas adaptações presentes nas espécies atuais.

Em relação ao teste salina (grupo SA), nas 3 espécies ficou demonstrado que o veículo que dilui os fármacos (solução salina isotônica) não produz alterações em nenhuma das variáveis analisadas no estudo, sendo de fato inerte (tabelas 2-4).



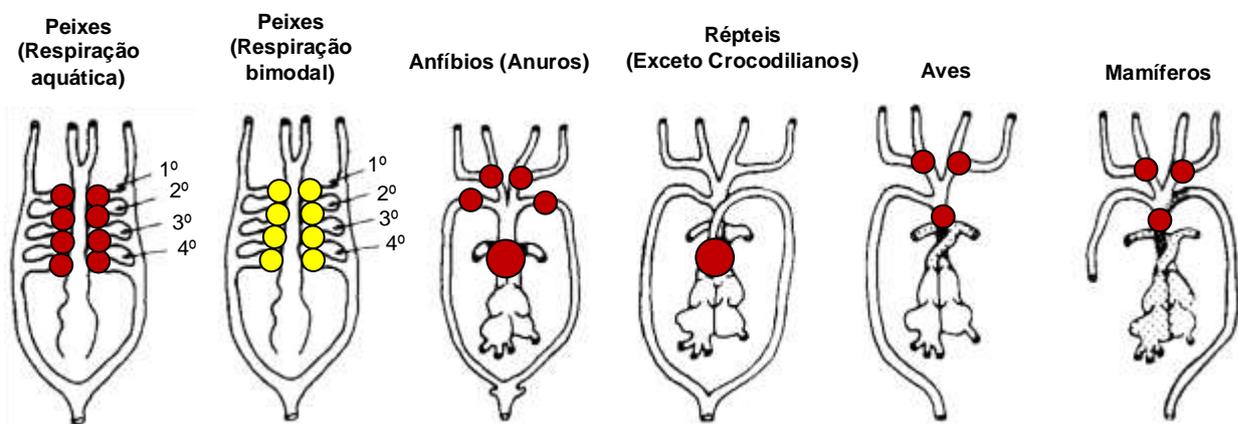
A vista do exposto, o presente estudo corrobora os resultados obtidos em estudos prévios que apontam para as brânquias como sítio barossensível em peixes, e também fornece fortes indícios de que seja de fato o único, independente da estratégia respiratória (bimodal ou exclusivamente aquática) (ARMELIN et al. 2016; SANDBLOM e AXELSSON, 2005).

5.3 – Evolução do barorreflexo em vertebrados

A figura 25 sintetiza os principais sítios barossensíveis nos grupos de vertebrados estudados até o momento. O presente estudo trouxe informações que corroboram a localização dos barorreceptores em peixes teleósteos de respiração exclusivamente aquática. Pois além do estudo prévio de Armelin e colaboradores (2016) demonstrando as brânquias como região barossensível no teleósteo *C. macropomum* (tambaqui), o presente estudo observou mais duas espécies (*H. malabaricus* e *O. mykiss*) com a mesma localização. É interessante ressaltar que mesmo se tratando de espécies com histórias de vida bastante distintas, ou seja, que provavelmente sofreram pressões evolutivas diferentes, a localização dos barorreceptores se manteve conservada.

O presente estudo também foi o primeiro a trazer informações acerca da localização dos barorreceptores em peixes que apresentam respiração bimodal, demonstrando a localização dos barorreceptores em *H. unitaeniatus*.

Figura 25. Esquema mostrando a localização dos barorreceptores nos grandes grupos de vertebrados estudados até o presente estudo, em fase adulta. Os círculos vermelhos representam os barorreceptores já mencionados na literatura, círculos amarelos representam os barorreceptores localizados no presente estudo.



Fonte: adaptada de BAGSHAW (1985) e ARMELIN (2015).



Um fator importante a se destacar é que, assim como foi observado no presente trabalho, as aferências de praticamente todas as regiões de barorrecepção supracitadas são constituídas pelos IX e X nervos cranianos (glosssofaríngeo e vago, respectivamente). Ressalta-se também que os sítios barossensíveis dos tetrápodes são todos homólogos aos arcos branquiais dos peixes, como pode ser constatado na tabela 5 (MILSOM e BURLESON e 2007; KARDONG, 2015).

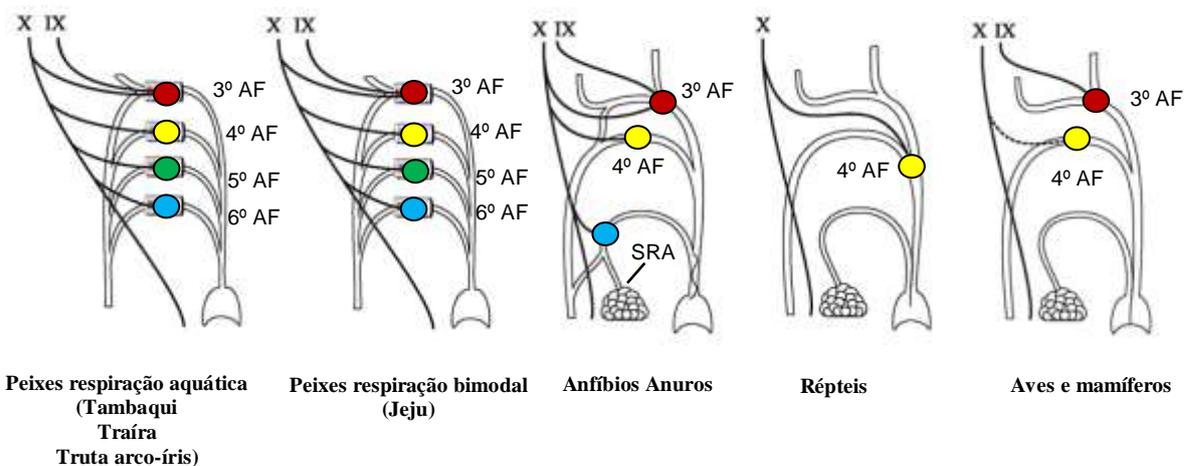
Tabela 5. Regiões barossensíveis em vertebrados, suas origens embrionárias e inervações. * Exceto nos anfíbios urodelos

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

Fonte: KARDONG, 2015.

A vista do exposto, é possível traçar um panorama sobre a evolução da barorrecepção nos vertebrados, como demonstrado na figura 26. Primeiramente, apenas peixes e anfíbios urodelos apresentam o sítio barorreceptor originado pelo 5º arco faríngeo do embrião-base de vertebrados, pois essa estrutura é suprimida durante o desenvolvimento embrionário dos demais grupos (KARDONG, 2015).

Figura 26. Esquema ilustrando a distribuição dos barorreceptores nos principais grupos de vertebrados, suas inervações e suas origens embrionárias, com base na literatura científica e o nos dados do presente estudo. Círculos vermelhos: derivação do 3º arco faríngeo embrionário; Círculos amarelos: derivação do 4º arco faríngeo embrionário; Círculos verdes: derivação do 5º arco faríngeo embrionário; Círculos azuis: derivação do 6º arco faríngeo embrionário; AF: arco faríngeo embrionário; SRA: superfície de respiração aérea.



Fonte: adaptada de MILSOM e BURLESON (2007).



Ainda é possível observar que os répteis, as aves e os mamíferos não apresentam a zona barossensível originada pelo 6º arco faríngeo no embrião-base, revelando uma provável perda desse caráter em um ancestral comum a esses grupos (MILSOM e BURLESON, 2007; KARDONG, 2015). Destaca-se ainda que os répteis são os únicos vertebrados que não exibem os sítios barossensíveis originários do 3º arco faríngeo embrionário, e que os demais táxons apresentam regiões barorreceptoras que derivam do 4º arco faríngeo (MILSOM e BURLESON, 2007; KARDONG, 2015).

Existem duas explicações diferentes que poderiam justificar a não existência de barorreceptores nas regiões derivadas do 3º arco faríngeo embrionário em répteis: (1) originalmente esses animais possuíam essa área barossensível, que foi então herdada pelas aves e mamíferos, e posteriormente foi perdida nos táxons mais recentes de répteis; (2) esses receptores foram perdidos durante o período de transição anfíbios-répteis, e depois surgiram novamente em aves e mamíferos, sendo no caso dessa última opção, uma homoplasia (ARMELIN, 2015).

Finalmente, vale ressaltar novamente a escassez de trabalhos sobre a localização dos barorreceptores em vertebrados não-mamíferos, o que dificulta bastante realizar inferências mais robustas sobre a história evolutiva da barorrecepção desse grupo, principalmente porque pouquíssimas espécies, em poucos táxons, foram estudadas até o presente momento.

Pesquisas em crocodilianos, por exemplo, contribuiriam muito para o avanço da reconstrução desse histórico evolutivo, auxiliando a verificar se de fato nenhuma espécie réptil apresenta barorreceptores nas regiões derivadas do 3º arco faríngeo embrionário e quais pressões seletivas poderiam induzir possíveis migrações ou desaparecimento dessas áreas barossensíveis.

Os peixes constituem um grupo muito antigo e diverso, sendo assim, além da bexiga natatória, existe uma vasta gama de órgãos utilizados como ORA, *e.g.* órgão arbóreo, estômago, esôfago, intestino, cavidade bucal, faringe (GRAHAM, 1997). Em vista disso, seria interessante mais estudos utilizando espécies que apresentem ORA's diferentes do jeju. Uma vez que, muitos desses animais além de possuir ORA's diferentes, podem pertencer a grupos filogeneticamente distantes. Sendo assim, apresentam histórias de vidas relativamente distintas e conseqüentemente podem ter sofrido pressões seletivas diferentes. Isso permitiria maiores comparações e uma análise mais robusta de como é a localização dos barorreceptores em peixes de respiração bimodal.

Particularmente, um grupo de peixes que seria fundamental investigar são os peixes pulmonados (Dipnoi), pertencentes a subclasse Sarcopterygii, que abrange os peixes de



6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- a. Nas 3 espécies (*H. malabaricus*, *H. unitaeniatus* e *O. mykiss*) a administração de um vasoconstritor e de um vasodilatador em animais com as brânquias intactas ocasionou uma bradicardia e uma taquicardia reflexas, respectivamente. Tais respostas foram abolidas em animais desnervados, portanto os barorreceptores são exclusivamente branquiais nessas 3 espécies.
- b. As pseudobrânquias de *O. mykiss* não apresentam barorreceptores.
- c. Similarmente à maioria dos vertebrados, as aferências barorreceptoras são constituídas pelos nervos glossofaríngeo e vago (cranianos IX e X) nas espécies em questão.
- d. Não existe diferença na localização dos barorreceptores e nas respostas barorreflexas entre as espécies de teleósteos estudadas.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGIED, E. M.; TAHA, A. A. M.; KING, A. S. An ultrastructural investigation of a baroreceptor zone in the common carotid artery of the domestic fowl. **Journal of Anatomy** v.135, p. 463-475, 1982.

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

AFFONSO, E. G.; POLEZ, V. L. P.; CORRÊA, C. F.; MAZON, A. F.; ARAÚJO, M. R. R.; MORAES, G.; RANTIN, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 3, p. 375-82, 2002.

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. 201, 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.

AMAZON WATERS. **Wildlife Conservation Wildlife Conservation Society**. Disponível em: <<http://amazonwaters.org/>>. Acesso em 05 mar. 2018.

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

ARMELIN, V. A. **Localização dos barorreceptores no tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei: Serrasalminae)**. 2015. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; TEIXEIRA, M. T.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A.L. Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Fish Physiology and Biochemistry**. v.42, p. 1213-1224, 2016.

AUMONIER, F. J. Histological observations on the distribution of baroreceptors in the carotid and aortic regions of the rabbit, cat and dog. **Acta anatomica**. v, 82, p. 1-16, 1972.

AXELSSON, M.; FRITSCHKE, R. Cannulation techniques. In: HOCHACHKA, P.W; MOMMSEN, T.P. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. v.3. Nova Iorque: Elsevier, 1994. p. 17-36.



- AZEVEDO, P. de; GOMES, A. L. 1943. Contribuição ao estudo da biologia da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Boletim de Indústria Animal**, v. 5, p.15-64, 1943.
- BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 121-162, 1985.
- BIANCHI-DA-SILVA, L. M.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. Baroreceptor control of heart rate in the awake toad: Peripheral autonomic effectors and arterial baroreceptor areas. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v. 80, p. 31–39, 2000.
- BOIJINK, C. L.; FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Hypercarbic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerhythrinus unitaeniatus*): the role of branchial CO₂ chemoreceptors. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 2797 – 2807, 2010.
- BRITSKI, H. A; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de Identificação de Peixes da região de Três Marias (Com chaves de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco)**. 3. ed. Brasília: CODEVASF, 1988.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (Ed.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; EGGINTON, S. The use of power spectral analysis to determine cardiorespiratory control in the short-horned sculpin *Myoxocephalus Scorpius*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 1969 – 1976, 2004.
- CARTER, G. S.; BEADLE, L. C. The fauna of the swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its environments: II Respiratory adaptation in the fishes. **Journal of the Linnean Society of London, Zoology**, v. 37, p. 327-366, 1931.
- CONKLIN, D.; CHAVAS, A.; DUFF, D.; WEAVER, L.; ZHANG, Y.; OLSON, K. R. Cardiovascular effects of arginine vasotocin in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 22, p. 2821-2832, 1997.
- 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.
- DAXBOECK, C.; HOLETON, G. F. Oxygen receptors in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 1254-1259, 1978.
- DUNEL, S. **Recherches sur l'innervation de la pseudobranchie des Téléostéens**. 1968. Thèse (Doctorat Histologie) – Université de Paris, Paris 1968.



FARRELL, A. P. Cardiovascular responses in the sea raven, *Hemitripterus americanus*, elicited by vascular compression. **Journal of Experimental Biology**, v. 122, n. 1, p. 65-80, 1986.

FARRELL, A. P.; GAMPERL, A. K.; HICKS, J. M. T.; SHIELS, H. A.; JAIN, K. E. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. **Journal of Experimental Biology**, v.199, p. 663–672, 1996.

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

FLORINDO, L. H.; REID, S. G.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Cardiorespiratory reflexes and aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): acute responses to hypercarbia. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, n. 4, p. 319-328, 2004.

FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; REID, S. G.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 9, p. 1709-1715, 2006.

FLORINDO, L. H.; ARMELIN, V. A.; MCKENZIE, D. J.; RANTIN, F. T. Control of air-breathing in fishes: Central and peripheral receptors. **Acta Histochemica**. v.120, p. 642–653, 2018.

FOWLER, H.W. **Os peixes de água doce do Brasil (2ª entrega)**. São Paulo: Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo, 1950.

GALL, G.A.E.; CRANDELL, P. A. The rainbow trout. **Aquaculture**, v. 10, p. 1- 10, 1992.

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

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do Alto Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007.

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

GREEN, J. H.: A new baroreceptor area in the cat. **The Journal of Physiology**. v.122, p.70, 1953.

GODOY, M. P. **Peixes do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1987.



- GOLD, D. K.; LOIRAT, T.; FARRELL, A. P. Cardiorespiratory responses to haemolytic anaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Fish Biology**, v. 87, p. 848–859, 2015.
- 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: _____. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 165-297.
- HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broadnosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 156, n. 4, p. 458–462, 2010.
- HAHN, N. S.; FUGI, R. ANDRIAN, I. F. Trophic ecology of the fish assemblages. In: THOMAS, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). **The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 247-269.
- 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.
- HELGASON, S. S.; NILSSON, S. Drug effects on pre- and post-branchial blood pressure and heart rate in a free-swimming marine teleost, *Gadus morhua*. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 88, n. 4, p. 533-540, 1973.
- HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. Circulação. In: _____. **Fisiologia Animal**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012. p. 611-642.
- HÖFLING, M. A.; CRUZ-LANDIM, C.; PATELLI, A. S. Comparações morfológicas e histoquímicas da bexiga natatória de peixes teleósteos de respiração aquática e respiração aérea. **Acta Amazonica**, v. 10, p. 147-155, 1980.
- JOHANSEN, K. Intravascular pressure in the intact, free-moving amphibian, *Amphiuma tridactylum*. **Acta Physiological Scandinavica**, v. 60, p. 18 – 29, 1963.
- JONES, D. R. Systemic arterial baroreceptors in ducks and the consequences of their denervation on some cardiovascular responses to diving. **The Journal of Physiology**. v. 34, p. 499-518, 1973.
- JONZ, M. G.; NURSE, C. A. New developments on gill innervation: insights from a model vertebrate. **Journal of Experimental Biology**. v. 211, p. 2371-237, 2008.
- KARDONG, K. V. Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution. Terceira Edição. New York: McGraw Hill, 2015. 1172 p.
- KENNEDY, C. J.; WALSH, P. J. Effects of temperature on xenobiotic metabolism. In: WOOD, C. M.; MCDONALD, D. G (Ed.). **Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 302-324.



- KIRCHHEIM, H. R. Systemic Arterial Baroreceptor **Reflexes**. **Physiological Reviews**, v. 56, n. 01, p. 100-176, 1976.
- KLABUNDE, R. E. Introduction to the Cardiovascular System. In: _____. **Cardiovascular Physiology Concepts**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 1-8.
- KOTTELAT, M.; FREYHOF, J. **Handbook of European freshwater fishes**. Berlin: Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, 2007.
- KRAMER, D. L. Ventilation of the respiratory gas bladder in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characoidei, Erythrinidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 931-938, 1978.
- LAUGHLIN, M. H. Cardiovascular response to exercise. **Advances in Physiology Education**, v. 277, p. S244 – S259, 1999.
- LAURENT, P.; DUNEL, S. Recherches sur l'innervation de la pseudobranchie des Téléostéens. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, v. 55, p. 633-656, 1966.
- LAURENT, P.; DUNEL, S. The pseudobranch: morphology and function: In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed). **Fish Physiology**. vol. 10, part A. San Diego: Academic Press, 1984 pp. 285-323.
- LAURENT, P.; ROUZEAU, J.D. Afferent neural activity from pseudobranch of teleosts. Effects of P_{O_2} , pH, osmotic pressure and Na^+ ions. **Respiration Physiology**, v. 14, p. 307-331, 1972.
- LEAL, M. E.; KLEIN, G.F.; SCHULZ, U.H.; LEHMANN, P. First record and ecological aspects of *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae) as introduced species in Rio dos Sinos basin, RS, Brazil. **Biota Neotropical**, v. 10, n.3, p. 34-37, 2010.
- LEITÃO, C. M. **Zoogeografia do Brasil**. 2 ed. São Paulo: Editora Nacional, 1947.
- LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Physiology Part A**, v. 193, p. 1001 – 1011, 2007.
- LILLYWHITE, H. B.; DONALD, J. A. Neural regulation of arterial blood pressure in snakes. **Physiological Zoology**, v. 67, p. 1260 – 1283, 1994.
- LILLYWHITE, H. B. Gravity, blood circulation, and the adaptation of form and function in lower vertebrates. **Journal of Experimental Zoology**, v. 275, p. 217 – 225, 1996.
- LOPES, J. M.; BOIJINK, C. L.; FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. A.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F.T. Hypoxic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): role of branchial O_2 chemoreceptors. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 180, p.797-811, 2010.



- LUTZ, B. R. Reflex cardiac and respiratory inhibition in the elasmobranch, *Scyllium canicula*. **Biological Bulletin**, v. 59, p. 170 – 178, 1930.
- LUTZ, B. R.; WYMAN, L. C. Reflex cardiac inhibition of branchio-vascular origin in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. **Biological Bulletin**, v. 62, p. 10 – 16, 1932a.
- LUTZ, B. R.; WYMAN, L. C. The evolution of a carotid sinus reflex and the origin of vagal tone. **Science**, v. 75, p. 590 – 591, 1932b.
- MCKENZIE, D. J.; CAMPBELL, H. A.; TAYLOR, E. W.; MICHELI, M.; RANTIN, F. T.; ABE, A. S. The autonomic control and functional significance of the changes in heart rate associated with air breathing in the jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 4224 – 4232, 2007.
- MCWILLIAM, J. A. On the structure and rhythm of the heart in fishes, with especial reference to the heart of the eel. **Journal of Physiology**, v. 6, p. 232 – 245, 1885.
- MILSOM, W. K.; REID, S. G.; RANTIN, F. T.; SUNDIN, L. Extrabranhial chemoreceptors involved in respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 12, p. 1765-1774, 2002.
- MILSOM, W. K; BURLESON, M. L. Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 157, p. 4–11, 2007.
- MILSOM, W. K. New insights into gill chemoreception: Receptor distribution and roles in water and air breathing fish. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v.184, p. 326– 339, 2012.
- MONTEIRO, D. A.; THOMAZ, J. M.; RANTIN, F.T.; KALININ, A. L. Cardiorespiratory responses to graded hypoxia in the neotropical fish matrinxa (*Brycon amazonicus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*) after waterborne or trophic exposure to inorganic mercury. **Aquatic Toxicology**, v. 140. p. 346– 355, 2013.
- MOTT, J. C. Some factors affecting the blood circulation in the common eel (*Anguilla anguilla*). **The Journal of Physiology**, v. 114, n. 3, p. 387-398, 1951.
- NELSON, J. S.; GRANDE, C. T.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. 15 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 707p.
- NILSSON, S. Innervation and pharmacology of the gills. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed). **Fish Physiology**. vol. 10, part A. San Diego: Academic Press, 1984, p. 185-227.
- NILSSON, S. Comparative anatomy of the autonomic nervous system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 165, p. 3 – 9, 2011.
- NOMURA, H. **Dicionário dos peixes do Brasil**. Brasília: Editora Editorial Ltda., 1984. 482p.



- OLSON, K. R.; CONKLIN, D. J.; FARRELL, A. P.; KEEN, J. E.; TAKEI, Y.; WEAVER JR, L.; SMITH, M. P.; ZHANG, Y. Effects of natriuretic peptides and nitroprusside on venous function in trout. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 273, n. 2, p. R527-R539, 1997.
- OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR C.J (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 238- 240.
- PACE, C. M; GIBB, A. C. Sustained periodic terrestrial locomotion in air-breathing fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 84, p. 639 – 660, 2014.
- PAGE, L. M.; BURR, B. M. **A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico**. Boston: Houghton Mifflin Company, 1991.
- PAIVA, M. P. **Crescimento, alimentação e reprodução da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch) no Nordeste brasileiro**. 1974. 32p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1974.
- PANG, C. C. Autonomic control of the venous system in health and disease: effects of drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 179-230, 2001.
- PERRY, S .F. et al. The control of blood pressure during external hypercapnia in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 2177–2190, 1999.
- PLANQUETTE, P.; KEITH, P.; LE BAIL, P.Y. **Atlas des poissons d'eau douce de Guyane. Tome 1**. Paris: MNHN, Paris & INRA, 1996 (Collection du Patrimoine Naturel Volume 22).
- PRADO, C.P.A.; GOMIERO, L. M.; FROEHLICH, O. Spawning and parental care in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) in the Southern Pantanal, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v, 66, p. 697-702, 2006
- QUINN, M. C. J.; VEILLETTE, P. A.; YOUNG, G. Pseudobranch and gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*: developmental changes and effects of growth hormone, cortisol and seawater transfer. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 135, p. 249-262, 2003.
- RANDALL, D. J.; STEVENS, E. D. The role of adrenergic receptors in cardiovascular changes associated with exercise in salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 21, n. 2, p. 415-424, 1967.
- RANDALL, D. J., JONES, D. R. The effects of deafferentation of the pseudobranch on the respiratory response to hypoxia and hyperoxia in the trout (*Salmo gairdneri*). **Respiration Physiology**, v. 17, p. 291–302, 1973.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Comportamento: Iniciação, Padrões e Controle. In: _____. **Eckert - Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. p. 374-430.



RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Mediadores Químicos e Sistema Nervoso Autônomo. In: _____. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 131-143.

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. D.; MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Interactive effects of temperature and pollutant stress. In: WOOD, C. M.; MCDONALD, D.G (Ed.). **Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 325-349.

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

REID, S.G; PERRY, S.F. Peripheral O₂ chemoreceptors mediate humoral catecholamine secretion from fish chromaffin cells. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, p. 990–999, 2003.

RISTORI, M. T. Réflexe de barosensibilité chez un poisson téléostéen (*Cyprinus carpio* L.). **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 164, n. 7, p. 1512-1516, 1970.

RISTORI, M. T.; DESSAUX, G. Sur l'existence d'un gradient de sensibilité dans les récepteurs branchiaux de *Cyprinus carpio* L. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 164, n. 7, p. 1517-1519, 1970.

SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 5, 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.

SANTOS, E. **Peixes da Água Doce – Zoologia Brasileira 2**. Belo Horizonte: Editora Itatiaia Ltda., 1981. 562p.

SANTOS, U.; VÖLCKER, C.M.; BELEI, F.A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; PAIVA, S.R.; DERGAM, J.A. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v.75, p. 2326-2343, 2009.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; NUÑER, A.P.O.; GODINHO, H.P.; VERANI, J.V. 2003. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H.P.;



GODINHO, A.L. (Org.) **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUCMinas, 2003, p. 229-274.

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

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

SMITH, D. G.; GANNON, B. J. Selective control of branchial arch perfusion in an air-breathing Amazonian fish *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 959–964, 1978.

SMITH, F.M.; JONES, D.R. Localization of receptors causing hypoxic bradycardia in trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 1260-1265, 1978

SPILLMAN, C. J. **Faune de France: Poissons d'eau douce. Fédération Française des Sociétés**. Paris: Naturelles, Tome 65, 1961.

STEAD, N. Salmon tolerance to heat and low oxygen. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 7, p. i-iii, 2013.

STEVENS, E. D.; BENNION, G. R.; RANDALL, D. J.; SHELTON, G. Factors affecting arterial pressures and blood flow from the heart in intact, unrestrained lingcod, *Ophiodon elongatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 43, n. 3, p. 681-695, 1972.

STEVENS, E.D.; HOLENTON, G.F. The partitioning of oxygen uptake from air and from water by erythrinids. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 965-969, 1978.

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.; NILSSON, S. Branchial innervation. **Journal of Experimental Biology**, v. 293, p. 232-248, 2002.

TAHA, A. A. M.; ABDEL-MAGIED, E. M.; KING, A.S. Ultrastructure of aortic and pulmonary baroreceptors in the domestic fowl. **Journal of Anatomy**, v.137, n. 1, p. 197-207, 1983.

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.

VERA, L.D.; PRIEDE, I.G. The heart rate variability signal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Experimental Biology**, v.156, p. 611-617, 1991.



WEIBEZAHN, F.H. Estudios sobre la respiración aérea en *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Spix) (Cypriniformes, Characidae). **Bol. Soc. Venez. Scien. Nat.**, v. 27, p. 178-188, 1967.

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

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

ZACCONE, G.; AINIS, L.; MAUCERI, A.; LO CASCIO, P.; LO GIUDICE, F.; FASULO, S. NANC nerves in the respiratory air sac and branchial vasculature of the indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Acta histochemica**, v. 105, n. 2, p. 151–163, 2003.

ZENA, L.A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H; ANDRADE, D.V.; ABE, A. S.; BICEGO, K. C. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. **Journal of Experimental Biology**. v. 219, p. 725-733, 2016a.

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. F.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Baroreflex regulation affects ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 3605–3615, 2016b.

ZHANG, Y.; WEAVER JR, L.; IBEAWUCHI, A.; OLSON, K. R. Catecholaminergic Regulation of venous function in the rainbow trout. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 4, p. R1195-R1202, 1998