



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

Avaliação da viabilidade de métodos de análise da sensibilidade barorreflexa e de um modelo de estudo com a cascavel sul americana (*Crotalus durissus*)

Gabriella Campos Rocha

UFSCar
Maio/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabriella Campos Rocha, realizada em 24/05/2019:

Prof. Dr. Cleo Alcântara Costa Leite
UFSCar

Prof. Dr. Lucas Aparecido Zena
USP

Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho
UNIFESP

GABRIELLA CAMPOS ROCHA

Avaliação da viabilidade de métodos de análise da sensibilidade barorreflexa e de um modelo de estudo com a cascavel sul americana (*Crotalus durissus*)

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UFSCar/UNESP), ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Cleo Alcantara Costa Leite

São Carlos-SP

2019

Para a pessoa que eu mais admiro no mundo, minha mãe e para Augusto, que mesmo a 9.000 km de distância sempre esteve perto.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a todos que foram luz nesse caminho trilhado durante o mestrado. Gratidão à minha querida família, meus pais e meu irmão pelo apoio e amor incondicional, sem vocês nada disso seria possível. Ao meu noivo, Augusto pelo amor, pelo apoio e por sempre acreditar em tudo que faço, sem você nada disso faria sentido. À Cecília, por aquecer meu coração todos os dias. Aos meus amigos queridos, minha segunda família, Karla, Tati, Tiago, Jeremias, Luiz e Jaime pelas risadas, cervejas, por sempre estarem presentes e tornar minha vida mais leve. Agradeço também minha amiga Diana, que trouxe alegria para rotina do mestrado e por ser uma profissional admirável, na qual me espelho. Às minhas professoras Gabi e Rafa, responsáveis pelas minhas dores e alongamentos, que sempre torcem por mim e me mostram que tudo é possível. Aos colegas do DCF e da minha sala, em especial ao Ramon por dividir as angústias da pós-graduação. Aos funcionários do DCF, Carmen, Seu Ângelo, Gustavo, dona onça e Jana. Aos professores do programa de pós-graduação pelas aulas e conhecimentos que enriqueceram a minha formação. Ao Alexandre da pós-graduação pela paciência e prontidão em ajudar. Ao grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Florindo, em especial ao Vinicius Armelin pela ajuda com as análises. Ao colega Renato Filogonio pelo auxílio com as análises e pelas discussões que enriqueceram o conhecimento sobre o tema. Agradeço meu orientador, Cleo A. C. Leite não só por ter aberto as portas de seu laboratório, mas por todo o conhecimento e paciência em ensinar durante o mestrado. À banca examinadora, os professores José Eduardo de Carvalho e Lucas Zena, pela grande contribuição com o presente trabalho

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo financiamento (1692101) no presente trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte ao projeto (2018/05035-0).

“Toda ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

RESUMO

A coordenação de processos e funcionamento de órgãos para manutenção da homeostase do sistema cardiovascular diante de alterações do meio interno é regulada em parte pelo sistema nervoso autônomo (SNA). Muitas vezes a compreensão dos mecanismos regulados pelo SNA, padrões de resposta, interação entre reflexos, dentre diversos outros fatores, requer estudos *in vivo*. O uso de anestésicos durante o curso dos protocolos experimentais e coleta de dados tem sido uma maneira de resolver os problemas éticos relacionados ao grau de instrumentação necessário para tais estudos. Os anestésicos, no entanto, deprimem o sistema nervoso e comprometem a conclusão de investigações que dependem do SNA funcional. Dessa maneira, nesse trabalho, buscamos validar uma preparação descerebrada com indivíduos da espécie *Crotalus durissus*. A descerebração consiste na inviabilização de áreas encefálicas superiores a fim de manter animais incapazes de processamento superior de informações e inviabilizando percepção e sensações de quaisquer tipos, incluindo estresse ou dor. Nestes animais, áreas do tronco encefálico e parte do hipotálamo, que participam da homeostase cardiovascular, são mantidas. No presente estudo, realizamos séries de testes fisiológicos para validação da presença de respostas autonômicas no modelo descerebrado. Além disso, realizamos o estudo do barorreflexo para compreensão de quão efetivo é o modelo em representar o animal intacto. Os animais descerebrados foram capazes de manter as variáveis hemodinâmicas constantes durante o protocolo de levantamento da cauda. Na manobra de levantamento da cabeça a pressão arterial média sistêmica (PAM sis) se elevou para garantir o suprimento adequado de sangue na cabeça. Além disso, durante aplicação de calor superficial, a frequência cardíaca (f_H) se elevou, uma resposta cardiovascular típica de membros do grupo Squamata durante o aquecimento. A estimulação farmacológica de quimiorreceptores de O_2 através de injeções de cianeto de sódio produziu elevações na (f_H) e alterações do *net shunt*. Estes testes atestam que diversas populações de barorreceptores, quimiorreceptores de O_2 e sensores de temperatura superficial possuem aferências funcionais gerando reflexos autonômicos esperados mesmo após o procedimento de descerebração. Isso indica que o SNA dos animais descerebrados se mantém funcional e capaz de executar compensações hemodinâmicas à diversas perturbações. O estudo do barorreflexo foi realizado em animais descerebrados e intactos. Através do método farmacológico, observamos que os animais descerebrados mantêm o ganho e os limites do barorreflexo similar à animais intactos. Com isso concluímos que a descerebração não elimina os reflexos gerados pelos centros de integração cardiovascular no sistema nervoso central (SNC) das cascavéis, mantendo-o com funcionamento equivalente ao animal intacto, mesmo sem as interações superiores. Além disso, a anestesia com isoflurano suprime as respostas barorreflexas dos animais descerebrados e altera as respostas aos protocolos de função autonômica, além de causar diminuição da Pa média dos animais. Assim, o uso da anestesia no curso de protocolos experimentais envolvendo reflexos autonômicos não é indicada.

Palavras chave: Aquecimento. Barorreflexo. Cascavel. Descerebração. Desvios intracardíacos. Hipóxia. Método da sequência.

ABSTRACT

The autonomic nervous system (ANS) regulate and coordinate processes and function of organs to maintain homeostasis of the cardiovascular system in response of changes in the internal environment. Frequently, the understanding of the response patterns, interaction reflexes and other factors regulated by ANS, required in vivo studies. The use of anesthetics during the course of experimental protocols and data collection has been a way of solving the problems related of such studies. However, anesthetics depress the nervous system and compromise the conclusions from investigations that rely on functional ANS. Thus, in this work, we sought to validate a decerebrated preparation with individuals of the species *Crotalus durissus*. Decerebration consists in the ablation of superior brain areas in order to maintain preparations that are incapable of superior processing, perception and sensations of any type, including stress or pain. In these preparations, areas of the brainstem and part of the hypothalamus are maintained. Thus, the cardiovascular homeostasis is maintained. In the present study, we performed series of physiological tests for validated the presence of autonomic responses in the model. In addition, we performed a baroreflex study to understand how effective is the model in representing the intact animal. Decerebrated animals were able to keep hemodynamic variables constant during the tail lift protocol. In the head lift maneuver, the systemic mean arterial pressure (MAP sys) increased to ensure adequate blood supply to the head. In addition, during surface heat application, the heart rate (f_H) increased, a cardiovascular response typical of Squamata group members during heating. Pharmacological stimulation of O_2 chemoreceptors induced elevations in f_H and changes in net shunt. These tests attest that diverse populations of baroreceptors, O_2 chemoreceptors and temperature sensors have functional afferences generating autonomic reflexes even after the decerebration procedure. This indicates that the ANS of the decerebrated animals remains functional and capable of performing hemodynamic compensations to various perturbations. The study of the baroreflex through the pharmacological method indicated that the decerebrated animals maintain the gain and baroreflex limits similar to intact animals. We conclude that the decerebration doesn't eliminate the reflexes generated by the centers of cardiovascular integration in the central nervous system (CNS) of rattlesnakes, keeping it functional like intact animals. In addition, isoflurane anesthesia suppresses the baroreflex of the decerebrated animals, modify the responses to autonomic function protocols, and causes a decrease of the mean arterial pressure. Thus, the use of anesthesia in the course of experimental protocols involving autonomic reflexes is not indicated.

Key words: Baroreflex. Decerebration. Rattlesnake. Heating. Hypoxia. Net shunt. Sequence method.

SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

BEI – Índice de efetividade barorreflexa

BPM – Contrações cardíacas por minuto

CVLM – Bulbo ventrolateral caudal

DC – Débito cardíaco

DMV – Núcleo dorsal motor do vago

DVR – Crista dorsoventricular

ECG – Eletrocardiograma

f_H – Frequência cardíaca

G₅₀ – Ganho máximo

HL – *Head Lift*

RR_{*i*} – intervalo RR

kPa – kilopascal

ms – Milissegundo

NA – Núcleo ambíguo

NaCN – Cianeto de sódio

Net shunt – desvio resultante

Net shunt D-E – Desvio resultante direita para esquerda

Net shunt E-D – Desvio resultante esquerda para direita

NTS – Núcleo do trato solitário

O₂ – Oxigênio

Pa – Pressão arterial

PE – Fenilefrina

PAM – Pressão arterial média

PAM sis – Pressão arterial média sistêmica

PAM pul – Pressão arterial média pulmonar

PAM₅₀ – Valor da PAM a 50% da amplitude da f_H

PAS – Pressão arterial sistólica

PA pul – Pressão arterial pulmonar

PA sis – Pressão arterial sistêmica

QLAo - fluxo do arco sistêmico direito

Qpul – Fluxo pulmonar

Qsis – Fluxo sistêmico

RP – Resistência periférica

Rpul – Resistência pulmonar

Rsis – Resistência sistêmica

RVLM – Bulbo ventrolateral rostral

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Nitroprussiato de sódio

TL – Tail lift

Tb – Temperatura corporal

Te – Temperatura do ambiente

Ts – Temperatura da pele

VSpul – Volume de ejeção sistólico pulmonar

VSsis – Volume de ejeção sistólico sistêmico

VStot – Volume de ejeção sistólico total

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. Sistema cardiovascular e pressão arterial	13
1.2. Barorreceptores em répteis	17
1.3. Mecanismo barorreflexo em répteis Squamata	18
1.4. Modelo de animal descerebrado como alternativa ao uso de anestésicos	19
CAPÍTULO I.....	24
Avaliação da capacidade de modulação autonômica em cascavéis descerebradas	24
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Descerebração.....	30
3.2. Instrumentação.....	30
3.3. Protocolos Experimentais	31
3.4. Aumento do retorno venoso - Levantamento da cauda (<i>Tail lift</i>)	31
3.5. Redução da perfusão da cabeça - Levantamento da cabeça (<i>Head lift</i>)	32
3.6. Aquecimento superficial.....	32
3.7. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos de O ₂	32
3.8. Efeito da anestesia na capacidade de resposta autonômica	33
3.9. Cálculos de parâmetros cardiovasculares	33
3.10. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	34
4.1. Aumento do retorno venoso - Levantamento da cauda (<i>Tail lift</i>)	34
4.2. Redução da perfusão da cabeça - Levantamento da cabeça (<i>Head lift</i>)	40
4.3. Aquecimento superficial.....	45
4.4. Quimiorreflexo	49
5. DISCUSSÃO	54
5.1. Considerações sobre o modelo	54

5.2. Aumento do retorno venoso - Levantamento da cauda (<i>Tail lift</i>)	55
5.3. Redução da perfusão da cabeça - Levantamento da cabeça (<i>Head lift</i>)	56
5.4. Aquecimento superficial.....	58
5.5. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos de O ₂	61
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO II.....	75
Avaliação da viabilidade de métodos de análise da sensibilidade barorreflexa e de um modelo de estudo com a cascavel sul americana (<i>Crotalus durissus</i>).....	75
1. INTRODUÇÃO.....	78
2. OBJETIVOS GERAIS	81
2.1. Objetivos específicos.....	81
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
3.1. Obtenção e manutenção dos animais.....	82
3.2. Anestesia e pós-operatório.....	82
3.3. Instrumentação.....	82
3.4. Descerebração.....	83
3.5. Barorreflexo em cascavéis intactas a 30°C.....	84
3.6. Barorreflexo em cascavéis descerebradas a 30°C.....	84
3.7. Análise barorreflexa pelo método da sequência	85
3.8. Análise barorreflexa pelo método farmacológico	85
3.9. Análise estatística	86
4. RESULTADOS	86
4.1. Método da sequência	86
4.2. Método farmacológico.....	90
4.3. Comparação métodos farmacológico e método da sequência	96
4.4. Método farmacológico em animais anestesiados	97

5. DISCUSSÃO	99
5.1. Caracterização da sensibilidade barorreflexa na cascavel sul americana <i>Crotalus durissus</i>	99
5.2. Avaliação do uso de um animal descerebrado como modelo.....	101
5.3. Efeito do uso da anestesia (isoflurano).....	102
6. CONCLUSÕES	103
7. Agradecimentos	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	104

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Sistema cardiovascular e pressão arterial

Os sistemas cardiovascular e respiratório atuam de maneira integrada a fim de manter o suprimento de oxigênio (O_2) adequado aos os órgãos e tecidos. A pressão arterial (Pa) é a importante força motriz do fluxo sanguíneo no sistema circulatório, e tem papel fundamental na manutenção da perfusão tecidual. O controle de longo prazo da Pa é realizado através de mecanismos de controle dos fluidos corpóreos, que atuam dentro da faixa de horas ou dias (KUMADA et al., 1990). Além dos ajustes de longo prazo, a manutenção imediata da estabilidade da Pa é importante para evitar que desvios momentâneos interfiram na hemodinâmica do sistema. Alterações de Pa provocadas por diferentes condições fisiológicas como, por exemplo, as alterações metabólicas desencadeadas pelo exercício, variações ocasionadas por alterações de postura, ou mesmo pequenas variações na pressão em sucessivos ciclos cardíacos ativam o mecanismo barorreflexo, que atua promovendo alterações rápidas na resistência periférica (RP) e frequência cardíaca (f_H). Tais fatores modificam a distribuição do sangue nas diversas sessões do sistema vascular, influenciam diretamente a Pa. Sendo assim, o reflexo barorreceptor atua corrigindo alterações da Pa (KUMADA et al., 1990).

A maior parte das informações sobre o barorreflexo vem de estudos realizados em mamíferos. Contudo, atualmente, há evidências experimentais suficientes para se estimar que os princípios e principais mecanismos de seu funcionamento estejam presentes e sejam similares em todo o grupo dos vertebrados (BAGSHAW, 1985). Os barorreceptores são terminações nervosas intramurais sensíveis ao estiramento vascular, presentes nas grandes artérias do sistema circulatório, homologas aos ramos arteriais dos primeiros ramos branquiais de peixes (MILSOM, 2010a, 2010b, 2018). Em mamíferos, tais receptores se concentram na região do arco aórtico e do seio carotídeo (BAGSHAW, 1985). As fibras aferentes primárias dos barorreceptores arteriais localizadas no seio carotídeo e arco aórtico terminam nas porções intermediárias a caudal do núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo (KUMADA et al. 1990). Do NTS, neurônios de segunda ordem se projetam diretamente para o núcleo ambíguo (NA) e, para interneurônios GABAérgicos no bulbo ventrolateral caudal (Figura 1) (CVLM - DAMPNEY, 2016). Da CVLM, os neurônios GABAérgicos se projetam para inibir neurônios pré-motores no bulbo ventrolateral rostral (RVLM), sendo o último tonicamente ativo. De maneira geral, o resultado das descargas aferentes barorreceptoras decorrente de aumento de Pa é a diminuição do débito cardíaco (DC), por bradicardia, e redução da resistência periférica (KUMADA et al., 1990).

respectivamente (GUYENET, 2006). Quedas de Pa por sua vez, resultam em menor taxa de disparo dos barorreceptores e aumento da influência simpática no sistema cardiovascular.

Assim como nos mamíferos, o coração dos répteis Squamata é innervado por ambas divisões do SNA, simpática e parassimpática. Estas exercem função excitatória adrenérgica e inibitória colinérgica, respectivamente (LILLYWHITE e DONALD, 1994). O vago, ramo parassimpático, chega ao coração em um nervo misto, denominado nervo vagosimpático e innerva o nó sinoatrial e/ou seio venoso, quando presente. Os ramos simpáticos por sua vez, através do ramo vagosimpático e ramos proveniente de gânglios paravertebrais, innervam os átrios, nó sinoatrial e regiões do miocárdio (HEDBERG e NILSSON, 1975). Dessa maneira, a estimulação do nervo vago causa efeito cronotrópico negativo (NILSON, 1983; TAYLOR et al., 2014). A resposta mediada por receptores beta-adrenérgicos, por sua vez tem efeito inotrópico e cronotrópico positivo no coração.

Além da innervação adrenérgica no coração, os répteis Squamata também possuem extensa innervação simpática nas artérias (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978; LILLYWHITE e GALLAGHER, 1985). Os receptores alfa-adrenérgicos vasculares mediam efeitos vasoconstritores. Assim, o efeito do estímulo simpático gera aumento da resistência periférica, causando menor saída de sangue do compartimento arterial; e aumento do retorno venoso e enchimento cardíaco, elevando V_{Ssis} e f_H (AIRES, 2012). Ambas alterações elevam a Pa. Sendo assim, alterações nas descargas das aferências barorreceptoras transmitidas ao SNC resultam em ajustes reflexos que causam compensações opostas à alteração da Pa

Em répteis Squamata, outro fator que possivelmente poderia afetar a Pa são os desvios sanguíneos intracardíacos. O coração de quelônios (tartarugas) e squamatas (serpentes e lagartos) é constituído de duas câmaras atriais totalmente separadas e um ventrículo único, compartimentalizado com um septo e crista muscular internos, que não dividem a cavidade ventricular em direita e esquerda, mas configuram três regiões anatômicas interconectadas: *cavum pulmonale* (câmara ventrolateral direita menor) e *cavum venosum* e *cavum arteriosum* (câmara dorsolateral esquerda maior) (Figura 2) (JENSEN et al., 2010; HICKS, 2002). Do ventrículo surgem duas aortas, o arco aórtico direito (RAo) e arco aórtico esquerdo (LAo) que emergem do *cavum venosum* e a artéria pulmonar que se origina do *cavum pulmonale* (HICKS, 2002). O DC é distribuído na circulação sistêmica e pulmonar, de acordo com a resistência de ambos os circuitos. Isso por sua vez, determina a ocorrência dos desvios intracardíacos em répteis Squamata. Os desvios intracardíacos são definidos como da direita-para-esquerda (D-E) e/ou esquerda-para-direita (E-D). O desvio de D-E constitui na recirculação de volume de sangue na circulação arterial sistêmica (HICKS, 2002; HICKS e KROSNUNAS, 1996). O desvio

E-D, por sua vez, consiste na recirculação de volume de sangue na circulação pulmonar. Em repouso, os répteis Squamata apresentam desvio E-D e ele pode ser alterado de acordo com a demanda metabólica e outros fatores (LEITE et al., 2013; 2014). O desvio resultante (*net shunt*), tratado acima, é diferente do desvio real imediato, que pode ocorrer nas duas direções dentro de um mesmo ciclo cardíaco, se considerados os desvios de lavagem e de pressão (HICKS e WANG, 1996; HICKS et al., 1996; HICKS, 2002).

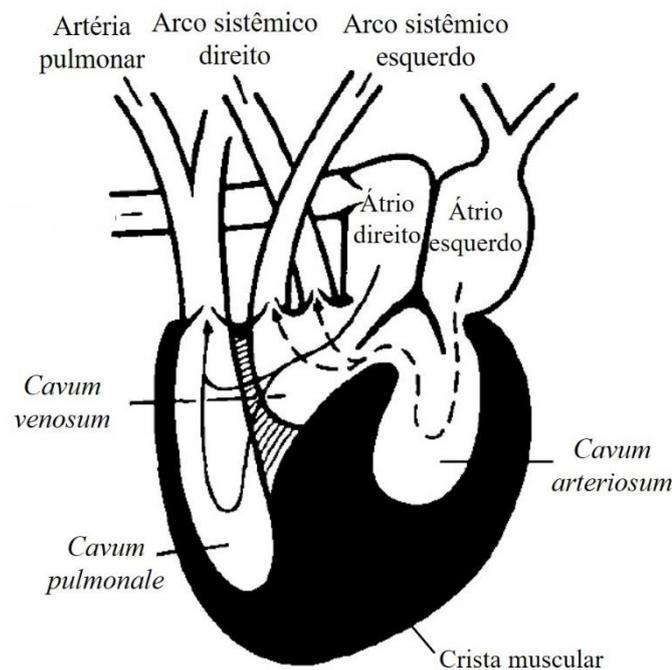


Figura 2: Ilustração esquemática do coração de um quelônio. As setas contínuas indicam períodos de ventilação (respiração aérea), no qual o sangue venoso entra pelo átrio direito durante a diástole e segue para as câmaras ventriculares, *cavum venosum* e em seguida para o *cavum pulmonale*, a partir do qual será ejetado pela artéria pulmonar durante a sístole ventricular para os pulmões. As setas pontilhadas representam o sangue oxigenado proveniente do circuito pulmonar, que é direcionado para o *cavum arteriosum* e ejetado a partir do *cavum venosum* através dos arcos sistêmicos direito e esquerdo durante a sístole ventricular (Adaptado de Burggren, 1987).

Os desvios sanguíneos são regulados pelo SNA. A artéria pulmonar recebe inervação vagal e sua estimulação causa aumento da resistência no circuito pulmonar que, por sua vez, causa diminuição do fluxo pulmonar (Q_{pul}) (JENSEN et al., 2014; MILSOM et al., 1977; BURGGREN, 1977). Assim, a atividade vagal resulta em redução do desvio E-D e aumento do D-E. Existem evidências de que o desvio D-E apresenta redução em momentos discretos ao longo de períodos de apnéia e hipóxia em quelônios (WANG et al., 2001; WANG et al., 1997). A direção e intensidade dos desvios afetam os níveis arteriais de O_2 (HICKS e WANG, 1996).

Quanto maior a magnitude do *net shunt* D-E menor a oxigenação do sangue arterial sistêmico. Enquanto que, quanto maior a intensidade do *net shunt* E-D, maior o conteúdo de O₂ arterial sistêmico (WANG et al., 1997). O papel fisiológico dos desvios intracardíacos, no entanto, bem como nas trocas gasosas pulmonares ainda permanece indeterminado e controverso (HICKS, 2002). Novos modelos experimentais que permitiram o estudo experimental do desvio sanguíneo intracardíaco em répteis crocodilianos e não crocodilianos não evidenciaram nenhum papel funcional dos desvios intracardíacos (EME et al., 2009; 2010; LEITE et al., 2013; 2014), sendo necessários mais estudos acerca desse tema.

1.2. Barorreceptores em répteis

Na maioria dos vertebrados, os arcos faríngeos são importantes sítios de localização de mecano e quimiorreceptores. De maneira geral, durante o desenvolvimento embrionário nos vertebrados, surgem seis pares de arcos aórticos (I- VI) a partir da aorta ventral (KARDONG, 2016). Em embriões de répteis e anfíbios, os arcos aórticos II e V se degeneram, enquanto que os III, IV e VI tornam-se a artéria carótida, arco aórtico e artéria pulmonar, chamada de artéria pulmocutânea em anfíbios. Em mamíferos e aves há apenas um arco aórtico remanescente, enquanto que nos répteis Squamata os arcos aórticos permanecem pareados (KARDONG, 2016).

Nos répteis Squamata, os sítios de barorreceptores das estruturas originadas dos arcos faríngeos são inervados pelos IX e/ou X nervos cranianos (BAGSHAW, 1985). A localização de barorreceptores não é bem estabelecida, embora diversas áreas do sistema cardiovascular tenham sido sugeridas como principal sítio de barorreceptores nos répteis Squamata (BERGER, 1987). Em serpentes, os barorreceptores se localizam principalmente na região do *truncus arteriosus*, composto pela artéria pulmonar e os arcos sistêmicos (JENSEN et al., 2013; LILLYWHITE e DONALD, 1994). Em lagartos (*Trachysaurus rugosus*), não há contribuição direta do nervo glossofaríngeo na bifurcação carotídea, dessa maneira a bifurcação carotídea de lagartos não é considerada comparável ao seio carotídeo de mamíferos (ROGERS, 1967). Da mesma forma, não há evidências de terminações nervosas de barorreceptores no arco carotídeo (ROGERS, 1967). Em lagartos, o *truncus arteriosus* ainda tem sido cogitado como local mais provável para barorreceptores (BERGER et al., 1982).

A despeito de alguma diversidade na distribuição dos sítios de barorreceptores no sistema cardiovascular dos diferentes grupos de vertebrados, o mecanismo barorreflexo é conservado em todos os grupos. A maior parte das informações sobre distribuição, anatomia, morfologia e fisiologia ainda é proveniente de estudos com mamíferos (VLIET e WEST, 1994).

1.3. Mecanismo barorreflexo em répteis Squamata

Em répteis Squamata, evidências de respostas barorreflexas foram obtidas através de técnicas distintas (revisado por BAGSHAW, 1985). Hohnke (1975) observou que lagartos da espécie *Iguana iguana* submetidos a perda de volume sanguíneo (hemorragia) em uma taxa de até 35% não apresentaram grandes quedas de pressão, o que indica que esses animais possuem mecanismos compensatórios à queda de pressão, como o barorreflexo. Estudos similares foram realizados em serpentes (LILLYWHITE e SMITH, 1981; LILLYWHITE e POUGH, 1983) e indicam indiretamente a existência do barorreflexo nesses animais.

Em lagartos (*Iguana iguana*) (HOHNKE, 1975) e serpentes (*Notechis scutatus*) (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978) foram empregados testes posturais (*tilt* teste), nos quais os animais são inclinados verticalmente durante os protocolos experimentais. O resultado imediato dessa alteração postural é a diminuição do retorno venoso, do enchimento cardíaco, do fluxo sanguíneo nas regiões superiores do corpo e da Pa (LILLYWHITE e GALLAGHER, 1985). Diante disso, o sistema cardiovascular realiza diversos ajustes para manter o fluxo sanguíneo adequado nos órgãos das regiões superiores do corpo, principalmente na região cefálica. Em serpentes, o resultado imediato do *tilt* é uma leve queda na Pa, seguida de taquicardia e vasoconstrição periférica (LILLYWHITE e GALLAGHER, 1985).

A regulação da pressão arterial em resposta às alterações posturais nas serpentes é possível através da extensa inervação adrenérgica nas artérias e veias (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978; LILLYWHITE e GALLAGHER, 1985). A vasoconstrição periférica decorrente da ativação de receptores α -adrenérgicos, como adrenalina e fenilefrina, resultam em aumento da Pa sistêmica por aumento resistência vascular sistêmica (R_{sis}), e consequente aumento do retorno venoso (SKALS et al., 2005). Já em *Python molurus*, a taquicardia ortostática é mediada pelo SNA, sendo resultado principalmente de uma diminuição do tônus vagal (ARMELIN et al., 2014). Nesta espécie, os ajustes vasomotores pós-inclinatorios não são primordiais para recuperação da Pa sistêmica durante a ortostase, sendo assim a taquicardia parece ser o principal meio pelo qual eles compensariam a redução de retorno venoso (ARMELIN et al., 2014).

Na serpente terrestre *Notechis scutatus* por sua vez, o bloqueio farmacológico da taquicardia-ortostática indicou que alterações de f_H não são fundamentais para recuperação dos parâmetros cardiovasculares (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978). As diferenças entre o sistema cardiovascular de diferentes espécies, podem ser responsáveis pelos fatores que controlam as respostas às alterações posturais. Nestas espécies, a inclinação da cabeça para cima (*head up tilt*) causou uma breve queda de Pa, seguida de recuperação aos valores basais. A recuperação

da Pa é acompanhada de taquicardia em alguns animais, porém não ocorreu em todos os indivíduos (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978).

Na serpente arborícola *Elaphe obsoleta* (LILLYWHITE e GALLAGHER, 1985) os experimentos de *tilt* indicaram que os ajustes cardiovasculares da pressão central são essenciais para manter o fluxo de sangue adequado na região cefálica. Além disso, o fluxo arterial nas carótidas depende da pressão arterial adequada em conjunto com os desvios sanguíneos intracardíacos e vasculares que direcionam a saída ventricular sistêmica (LILLYWHITE e GALLAGHER, 1985; LILLYWHITE e DONALD, 1985). Apesar da necessidade de elucidação dos mecanismos neurais, os estudos com a espécie *E. obsoleta* levam a crer que reflexos neurais ativam ajustes para reestabelecimento da Pa, tais como elevação da f_H e da resistência vascular periférica. As serpentes aquáticas apresentariam, por sua vez, tendência contrária, pois a coluna de sangue entre a cabeça e o coração seria sempre mais longa, possivelmente por não terem sofrido as mesmas pressões evolutivas que as serpentes arborícolas (LILLYWHITE et al., 2012).

Também foi sugerido que serpentes arborícolas possuem a Pa caracteristicamente alta e respostas vasomotoras potentes em relação a animais aquáticos (SEYMOUR e ARNDT, 2004). O controle da Pa em diversa espécies, suas modulações e variações características são importantes, pois, o controle da Pa e a apropriada manutenção do fluxo sanguíneo, principalmente na região cefálica, pode ter reflexos comportamentais e ecofisiológicos interessantes. Apesar de diversos répteis Squamata e crocodilianos terem tido sua curva barorreflexa descrita, seu significado para capacidade de enfrentar desafios fisiológicos ainda tem sido pouco explorado.

Nesse fértil campo de estudos, dentre os demais vertebrados, as serpentes se mostram importantes organismos para estudo de adaptações cardiovasculares, pois são muito diversas em termos de morfologia, comprimento corporal e habitat, além de sofrerem grande influência do estresse gravitacional na evolução do sistema cardiovascular e hemodinâmica (LILLYWHITE e DONALD, 1994). O entendimento do mecanismo barorreflexo em répteis Squamata é importante para fundamentação de qualquer teoria evolutiva envolvendo esse mecanismo nos vertebrados.

1.4. Modelo de animal descerebrado como alternativa ao uso de anestésicos

Durante o desenvolvimento embrionário o sistema nervoso dos vertebrados é dividido em romboencéfalo, mesencéfalo e prosencéfalo (Fig 3). Estas regiões dão origem ao metencéfalo e mielencéfalo, mesencéfalo e telencéfalo e diencéfalo, respectivamente, nos indivíduos adultos. O telencéfalo dos répteis Squamata é composto pelo bulbo olfatório e os

hemisférios cerebrais. O córtex cerebral recebe projeções ascendentes do núcleo talâmico. Os répteis Squamata e as aves possuem uma estrutura única, a crista dorsoventricular (DVR), que é uma protrusão intraventricular telencefálica, cuja porção anterior (locu telencefálico) é destinada a integração sensorial (somatossensorial, gustatória, visual, acústica) e tem analogias com o néocórtex dos mamíferos (ULINSKI, 1978; PRITZ e NORTHCUTT, 1980). Na porção ventral do diencéfalo se localiza o hipotálamo, área envolvida em comportamentos homeostáticos (alimentação, termorregulação, reprodução) e com papel importante na secreção de hormônios (STRIEDTER, 1962) (Fig 3).

O entendimento do papel fisiológico de diferentes áreas encefálicas é importante para o elucidar processos da homeostase do organismo. Esse conhecimento pode ser construído com diversos tipos de estudos, incluindo em animais descerebrados. Ao longo da história, a remoção de partes do encéfalo foi amplamente empregada em uma diversidade de espécies animais. Os primeiros estudos utilizaram preparações crônicas de gatos e cachorros com remoções experimentais do prosencéfalo (revisado por BAZZET e PENFIELD, 1922). Esses animais eram mantidos vivos por meses, capazes de controlar a temperatura e exercer movimentos coordenados, andar e comer (BAZZET e PENFIELD, 1922). Atualmente, essas técnicas foram aprimoradas e os animais descerebrados são utilizados para diversas finalidades de estudo, mas com a preocupação comum de evitar que os animais sejam submetidos a processos dolorosos durante os experimentos. Em mamíferos, a remoção de áreas superiores do encéfalo elimina comportamentos relacionados a dor. Woolf (1984) utilizou ratos descerebrados como modelo para estudar a dor crônica. Animais descerebrados respondem ao estímulo nociceptivo, seja ele térmico ou mecânico, pois o componente discriminativo sensorial da percepção da lesão tecidual permanece intacto. Contudo, os componentes neurais para processamento, percepção e associação podem ser todos eliminados. Em seu estudo, Woolf observou que diferente de animais intactos, após receber o estímulo nociceptivo, animais descerebrados demonstravam certa indiferença, retornando prontamente à sua atividade de *grooming*. Portanto, os animais descerebrados apesar de manterem uma resposta organizada ao estímulo nocivo, não experimentam reações de estresse, angústia ou medo. Muito embora se saiba que as regiões superiores prosencefálicas e mesencefálicas são vitais para modulação comportamental e emocional da circulação e da respiração observa-se que as regiões encefálicas superiores não são essenciais para o controle da respiração e da homeostase do sistema cardiovascular (ABDALA et al., 2009; LEE et al., 2002), funções que permanecem relacionadas ao tronco encefálico.

A descerebração é comumente um procedimento cirúrgico pelo qual o telencéfalo e porção do diencéfalo são inviabilizados com o objetivo de manter funções fisiológicas autonômicas do animal, mas evitando respostas relacionadas a qualquer nível de processamento voluntário, o estresse e a dor (SILVERMAN et al., 2005). O tálamo, uma estrutura localizada entre o mesencéfalo e o diencéfalo, recebe projeções sensoriais (temperatura, dor, pressão, dentre outras) que são processadas e projetadas para áreas sensoriais especializadas no córtex cerebral. Sendo assim, a remoção destas áreas impede que estímulos tenham processamento superior e/ou qualquer ação cortical e do sistema límbico, bloqueando, portanto, qualquer possível processamento da dor. A remoção do córtex e do tálamo elimina todas as funções superiores dos animais. A descerebração é um procedimento que abole qualquer nível de consciência e irreversível e assim, sendo considerado o momento da eutanásia do animal. Isso confere a vantagem de permitir múltiplas instrumentações e grande monitoramento na preparação, sem a presença de fármacos anestésicos (WOOLF, 1984; SAPRU e KRIEGER, 1979).

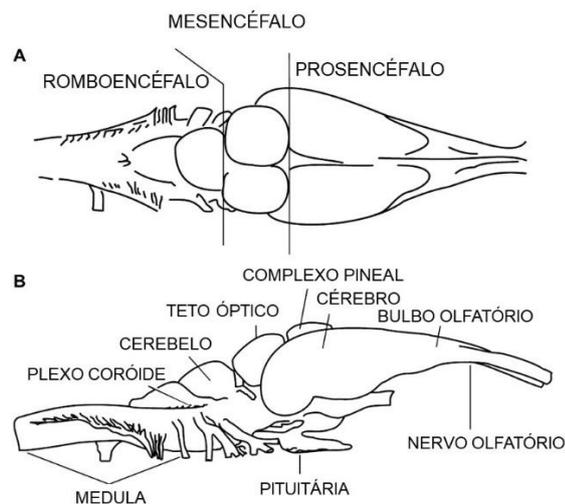


Figura 3. Diagrama da estrutura encefálica de tartarugas e lagartos. **A)** Vista dorsal das grandes regiões do encéfalo **B)** Vista lateral com os maiores componentes externos (Modificado de Wyneken, 2007)

Estudos que envolvem métodos de descerebração têm sido realizados e descritos em diversas espécies de mamíferos, como roedores (SAPRU e KRIEGER, 1979), gatos (KIRSTEN e JOHN, 1978) e cães (TANKOVIC-CAPIN et al., 1998). Além disso, modelos descerebrados também foram utilizados em aves (GENTLE, 1997) e ectotérmicos, como anfíbios (KOGO e REMMERS, 1994) e teleósteos (REID et al., 2003). Dentre os principais métodos de descerebração, existe aquela realizada por remoção mecânica, em que porções do encéfalo são removidas fisicamente em procedimentos cirúrgicos cuidadosos com o uso de espátulas e/ou

bisturis e/ou instrumentos modificados para tal fim ou ainda, por sucção do tecido remanescente (ALMEIDA et al., 2010). A descerebração isquêmica por sua vez, é realizada através da oclusão de vasos específicos que acarretam na inviabilização da estrutura neuronal irrigada por eles (KNIFFKI et al., 1981). Nos métodos de remoção mecânica, o nível da secção e porções das áreas encefálicas retiradas podem variar de acordo com o objetivo do estudo. Em mamíferos, alguns modelos realizam a descerebração a partir do nível pré, mediano, ou posterior aos colículos, de modo que as estruturas rostrais a estas são removidas (HAYASHI, 2003; PICKERING et al., 2001). Sendo assim, o telencéfalo e porção do diencefalo são removidos, devido a indispensabilidade na remoção das áreas correspondentes ao córtex e tálamo para eliminar o processamento superior e qualquer processamento relacionado à dor (STECINA, 2017; NAKANISHI e WHELAN, 2011).

Os anestésicos inaláveis são amplamente utilizados para procedimentos cirúrgicos em répteis Squamata, em grande parte devido ao fácil controle e regulação imediata dos níveis de anestesia, o que traz grande vantagem em relação a anestésicos injetáveis (BONATH, 1979; WANG et al., 1993). Estes são também utilizados para coleta de dados em situações que demandam animais imobilizados, como por exemplo durante a realização de estudos de estimulação nervosa (SUNDIN et al., 2001). Os anestésicos inaláveis afetam profundamente o SNA em diversos níveis de sua organização, incluindo, depressão da transmissão ganglionar (DOURSOUT e CHELLY, 1988) e transmissão nervosa. Relatos sobre o mecanismo de ação e os efeitos cardiovasculares de anestésicos em lagartos e serpentes são escassos. Anestésicos inaláveis parecem causar depressão cardiovascular considerável em lagartos da espécie *Iguana iguana*, levando a diminuições da Pa e da f_H (MOSLEY et al., 2004). Em gatos e cachorros, o isoflurano causa diminuição da resistência vascular periférica, e conseqüente queda da Pa e do DC (STEFFEY e HOWLAND, 1977). Além disso, anestésicos injetáveis também são amplamente utilizados para a coleta de dados durante experimentos em vertebrados não-mamíferos (GALLI et al., 2007; TAYLOR et al., 2009). Eles se tornaram uma alternativa importante, pois o alto grau de instrumentação, necessário em alguns estudos, não permitiria rápida recuperação após a cirurgia e repouso estável em animais acordados. Infelizmente os anestésicos também deprimem diversas funções fisiológicas. Os barbitúricos produzem taquicardia em serpentes da espécie *Crotalus durissus* (SKALS et al., 2005) possivelmente através da diminuição do tônus parassimpático nesses animais. Anestésicos como o pentobarbital, ketamina, cloralose e uretano causam redução expressiva da Pa e f_H e alteração de respostas cardiovasculares em ratos (SAPRU e KRIEGER, 1979). Pentobarbital, cloralose e ketamina também reduzem a frequência respiratória nesses animais (SAPRU e KRIEGER, 1979). Em ectotérmicos, o efeito dos

anestésicos depende do estado metabólico dos animais e também, como esperado, pode variar de espécie para espécie (BENNET, 1991). Dessa maneira, mais estudos são necessários para a compreensão dos efeitos de anestésicos em répteis e demais vertebrados ectotérmicos, para que possam ser utilizados com confiabilidade em protocolos para obtenção de dados fisiológicos, ou mesmo para procedimentos clínicos em pesquisas científicas.

Uma alternativa ao uso de anestésicos durante o monitoramento fisiológico, seria o uso de animais descerebrados, com o SNA funcional. A viabilização de um modelo animal descerebrado, permitiria a obtenção de diversos parâmetros cardiovasculares para estudos do SNA em répteis. Além disso, seria possível estudar o efeito da anestesia em animais descerebrados, já que a descerebração não remove todas as áreas encefálicas envolvidas no mecanismo de ação dos anestésicos. Isso pode ser importante para conhecer os efeitos do anestésico nos ajustes autonômicos e a confiabilidade dos dados obtidos em estudos que utilizam anestésicos para coleta de dados em vertebrados ectotérmicos. Tal estudo é inédito no grupo dos répteis e pode ser uma alternativa para análises que atualmente são realizadas em animais anestesiados.

CAPÍTULO I

Avaliação da capacidade de modulação autonômica em cascavéis descerebradas

RESUMO

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) é responsável por modulações que mantêm a homeostase do sistema cardiovascular, frente a alterações de pressão arterial (Pa), temperatura, conteúdo arterial de O₂, dentre outros. O entendimento dos processos fisiológicos regulados pelo SNA requer preparações *in vivo* funcionais. Devido ao alto grau de invasividade dessas preparações, a coleta de dados muitas vezes é realizada no plano anestésico. Estudos sobre a função autonômica realizados em animais sob o efeito de anestésicos podem levar a conclusões errôneas, pois estes atenuam a função autonômica e comprometem a função cardiovascular. Buscamos validar um modelo descerebrado com SNA funcional utilizando a cascavel sul americana *Crotalus durissus* (Squamata). Esse modelo permitiria investigações com elevado grau de instrumentação sem o uso de anestesia para a coleta de dados. Exemplares adultos de *C. durissus* (n = 12) foram descerebrados por meio da remoção do telencéfalo e porção do diencéfalo, e conseqüentemente do córtex e do tálamo. Estas regiões são responsáveis pelo processamento e percepção de estímulos dolorosos e estresse. Dessa maneira, a descerebração elimina a possibilidade de tais estímulos nocivos. Além disso, foram implantadas cânulas e sondas de fluxo nos circuitos sistêmico e pulmonar para monitoramento cardiovascular. Nossa hipótese é que as estruturas neurais remanescentes (tronco encefálico), podem manter modulação para padrões hemodinâmicos de repouso e a capacidade responder a distúrbios agudos no sistema cardiovascular. Assim, para testar a existência de reflexos autonômicos, realizamos testes com distúrbios químicos e físicos envolvendo de receptores e reflexos autonômicos diferentes. Os animais descerebrados mantiveram os parâmetros hemodinâmicos constantes durante o levantamento da cauda (*tail lift*). Durante o levantamento da cabeça (*head lift*) ocorreram alterações para compensação da diminuição do fluxo sanguíneo na região cefálica, sendo a principal delas a elevação na Pa, em decorrência de elevações no débito cardíaco (DC). O aquecimento superficial elevou a frequência cardíaca (f_H) e a Pa sistêmica e pulmonar, enquanto o *net shunt* (desvio resultante) direita-esquerda também aumentou. A estimulação de quimiorreceptores de O₂ com NaCN resultou em taquicardia e alteração do *net shunt* para esquerda-direita. Quando sob anestesia (isoflurano - 3%) a preparação teve os reflexos testados ausentes ou fortemente deprimidos. Assim, concluímos que a anestesia compromete ajustes autonômicos e os estudos que utilizam anestésicos para a coleta de parâmetros fisiológicos devem ser interpretados com cautela. Preparações de serpentes descerebradas são uma possível alternativa em procedimentos que requerem alto grau de instrumentação e SNA funcional.

Palavras-chave: Anestesia. Cardiovascular. Cascavel. Descerebração. Répteis. Sistema nervoso autônomo.

ABSTRACT

The Autonomic Nervous System (ANS) is responsible for modulations that maintain the homeostasis of the cardiovascular system, against changes in arterial pressure (Pa), temperature and arterial content of O₂. Understanding the physiological processes regulated by the ANS requires functional *in vivo* preparations. Studies of autonomic function performed on animals under the effect of anesthetics may lead to erroneous conclusions. Anesthetics attenuate autonomic function and compromise cardiovascular function. We sought to validate a decerebrated model with functional ANS using the species *Crotalus durissus* (Squamata). This model would allow investigations with a high degree of instrumentation without the use of anesthesia to collect data. Adult individuals of *C. durissus* (n = 12) were decerebrated by removal of the telencephalon and portion of the diencephalon. Thus, the cortex and thalamus are removed and the processing and perception of painful stimuli and stress are eliminated. In addition, cannulas and flow probes were implanted in the systemic and pulmonary circuits for cardiovascular monitoring. Our hypothesis is that the remaining neural structures can maintain modulation to resting hemodynamic patterns and the ability to respond to acute disturbances in the cardiovascular system. Thus, to test the existence of autonomic reflexes, we performed tests with chemical and physical disorders involving a range of receptors and different autonomic reflexes. The decerebrated preparations presented complex cardiovascular adjustments mediated by the ANS. The decerebrated animals kept the hemodynamic parameters constant during the tail lift. During the head lift, changes occurred to compensate for the decrease in blood flow in the cephalic region, the main one being the increase in Pa due to increases in cardiac output (CO). Surface heating increased heart rate (f_H) and systemic and pulmonary Pa, while right-left net shunt also increased. Stimulation of O₂ chemoreceptors with NaCN resulted in tachycardia and left-right net shunt. When under anesthesia (isoflurane - 3%) the preparation had the reflexes absent or strongly depressed. Thus, we conclude that anesthesia compromises autonomic adjustments and studies that use anesthetics to collect physiological parameters should be interpreted with caution. Decerebrated snake preparations are a possible alternative in procedures requiring high degree of functional ANS and instrumentation.

Key words: Anesthesia. Cardiovascular. Rattlesnake. Decerebration. Reptiles. Autonomic Nervous System.

1. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular dos vertebrados atua sob modulação constante do SNA. No coração, a inervação simpática exerce função excitatória adrenérgica, enquanto a parassimpática exerce função inibitória colinérgica (LILLYWHITE e DONALD, 1994). Em répteis, o sistema simpático tem ação na constrição vascular, principalmente no circuito sistêmico. O sistema parassimpático tem ação estimulatória mais restrita em vasos centrais do circuito pulmonar. Assim, a estimulação adrenérgica gera uma cascata de efeitos que culminam em elevações na resistência periférica e na f_H , que por sua vez geram aumento no retorno venoso, DC e Pa. Em contrapartida, a atividade vagal provoca alterações na direção contrária. Além disso, o SNA parassimpático também está envolvido nos ajustes dos desvios sanguíneos, tais como uma redução do desvio sanguíneo E-D e/ou aumento do desvio D-E (recirculação do sangue venoso na circulação sistêmica). Tais efeitos, provocados pelos ajustes autonômicos são complexos e a obtenção de dados para sua avaliação enfrenta vários problemas instrumentais. Os estudos *in vivo* são de grande relevância no entendimento de processos fisiológicos e requerem animais funcionalmente íntegros. Grande parte dos estudos na fisiologia comparada faz uso da implantação de cânulas, sondas de fluxo, eletrodos, sondas de temperatura e outros aparatos que permitam a coleta de múltiplos dados. A possibilidade de instrumentação múltipla facilitaria o entendimento de processos complexos como os ajustes hemodinâmicos autonômicos e permitiria diminuição do número de animais utilizado na pesquisa.

As importantes questões éticas que norteiam a experimentação científica acabam por limitar o grau de instrumentação ao qual os animais podem ser submetidos devido a possibilidade de lesões ou processos dolorosos. Dessa maneira experimentos que impõe múltiplos registros simultâneos aos modelos animais são evitados. Isso, por sua vez, impõe desafios para a compreensão de diversas questões mecânicas.

Uma alternativa de uso corrente é a utilização de anestesia durante a coleta de dados em estudos que requerem múltiplos registros fisiológicos simultâneos. Diversas investigações de ajustes cardiovasculares em répteis, como por exemplo estudos do controle autonômico dos desvios intracardíacos (TAYLOR et al., 2009) e a regulação adrenérgica do sistema cardiovascular (GALLI et al., 2007), foram realizados com auxílio de anestésicos e atualmente são as únicas fontes de informação para investigar hipóteses funcionais gerais, e padrões de respostas específicos que auxiliam na fundamentação de teorias evolutivas (SKOVGAARD et al., 2005). Infelizmente, apesar de utilizado com certa frequência, esse método também possui importantes limitações. Os anestésicos deprimem a função cardiovascular e respiratória (SAPRU e KRIEGER, 1979; STEFFEY e HOWLAND, 1977) e assim, evidenciam que a anestesia deprime

e/ou impede o correto funcionamento do SNA. Assim, aspectos funcionais e mecanismos regulatórios, bem como sua magnitude de ação podem ser prejudicados e descritos de maneira inadequada em animais anestesiados.

Algumas investigações em vertebrados endotérmicos e ectotérmicos utilizam preparações descerebradas. De maneira geral, nas preparações descerebradas o telencéfalo e porção do diencéfalo, incluindo o tálamo, são removidas (DOBSON e HARRIS, 2012; TANKOVIC-CAPIN et al., 1998). Tais estruturas estão envolvidas, dentre outras coisas, no processamento de estímulos dolorosos e em sua percepção (SILVERMAN et al., 2005). A procedimento mantém as estruturas relacionadas às respostas eferentes do SNA. A descerebração pode ser realizada através de métodos de remoção mecânica que consiste em transecção e remoção física de estruturas do SNC, em processo cirúrgicos cuidadosos com o uso de espátulas e/ou bisturis e/ou instrumentos modificados para tal fim; ou ainda, por sucção do tecido remanescente (eg. ALMEIDA et al., 2010). Embora, exista uma pequena variação nos níveis da descerebração entre os estudos, de maneira geral, o mais comum é que córtex cerebral e tálamo sejam inativados e separados do restante do sistema nervoso central. O propósito da descerebração é a obtenção de uma preparação que se recupere da anestesia e instrumentação e se mantenha sem processamento superior da nocicepção e qualquer estresse durante estudos com múltiplas medidas hemodinâmicas e cardiovasculares.

O uso de modelos experimentais com animais descerebrados é mais comum em estudos com mamíferos e vem auxiliando em avanços na compreensão do controle cardiovascular e outros aspectos autonômicos (CHAI e WANG, 1968; PICKERING et al., 2006). Tais preparações com mamíferos são muito conhecidas e a técnica aplicada é bem documentada. Além disso, o conhecimento da anatomia das espécies utilizadas é significativo e referenciado, facilitando protocolos e/ou procedimentos envolvendo o sistema nervoso central. Apesar disso, experimentos que utilizam preparações descerebradas também foram utilizados, de forma pontual, em espécies de vertebrados ectotérmicos, como por exemplo, em elasmobrânquios (BARRETT e TAYLOR, 1985), teleósteos (REID et al., 2003) e anfíbios (WANG et al., 2004). Há indícios de que animais descerebrados mantém respostas ortostáticas em protocolos de *head-up tilt* e reflexo para ajuste ventilatório em resposta a injeções de cianeto de sódio (NaCN) (SAPRU e KRIEGER, 1978; SAPRU e KRIEGER, 1979). Além disso, o controle cardiovascular e o barorreflexo são mantidos em preparações de roedores descerebrados (SAPRU e KRIEGER, 1978; LEE et al., 2002). A validação de um modelo descerebrado através da espécie *Crotalus durissus* permitiria a obtenção de grande número de parâmetros cardiovasculares (Pa_{sis} , Pa_{pul} , f_H , Q_{sis} , Q_{pul} , DC , *net shunt*) por meio de elevado grau de instrumentação. O estudo de

mecanismos regulatórios autonômicos como ajustes de desvio sanguíneo intracardíaco, ajustes barorreflexos, integrações autonômicas cardiorrespiratórias, dentre outros, podem trazer informações importantes. O objetivo deste estudo é descrever procedimento de descerebração em indivíduos da espécie *Crotalus durissus* e avaliar a eficácia de tal preparação para estudos envolvendo mecanismos fisiológicos modulados pelo SNA, com a possibilidade de coleta de múltiplas variáveis cardiovasculares. Acreditamos que a preparação proposta seja capaz de manter a modulação autonômica durante o repouso e efetivar ajustes autonômicos em resposta à estimulação física e química aguda de receptores no sistema cardiovascular, sendo eles barorreceptores e quimiorreceptores de O₂, respectivamente, além de receptores superficiais de temperatura.

2. OBJETIVOS

- a) Avaliar a viabilidade de cascavéis descerebradas para estudos cardiovasculares.
- b) Averiguar a resposta cardiovascular ao aumento de retorno venoso (*tail lift*).
- c) Averiguar a resposta cardiovascular à redução de perfusão na cabeça (*head lift*).
- d) Averiguar a resposta cardiovascular ao estímulo térmico superficial.
- e) Averiguar a resposta cardiovascular à estimulação de quimiorreceptores de oxigênio.
- f) Aferir o efeito do uso da anestesia na modulação das respostas cardiovasculares aos estímulos listados acima.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o procedimento e coleta de dados, foram utilizados 12 indivíduos adultos, ($774 \pm 50,73g$) da espécie *Crotalus durissus*. Os animais utilizados nos experimentos, foram obtidos em centros de recepção e manutenção de animais silvestres e transportados ao biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSCar, São Carlos). Os animais foram mantidos em compartimento individuais, em sala climatizada com temperatura controlada, 28-30°C, alimentados com roedores a cada duas semanas e tiveram acesso à água *ad libitum*. A alimentação foi interrompida duas semanas antes dos experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA/UFSCar) da UFSCar, SP, Brasil. Antes de qualquer procedimento de instrumentação, os animais foram primeiramente anestesiados com ar acrescido de CO₂ (FORSLID et al., 1986; WANG et al., 1993; LEITE et al., 2013; 2014) até perda do controle motor (~30 minutos) para que pudessem ser manipulados com segurança (Resolução Normativa CONCEA n. 29). Todos os animais

receberam anestésico local (lidocaína 2%) nos pontos de incisão; além de injeções de antibiótico (Chemitril 11 mg/kg) e anti-inflamatório (Flunixin 1,1 mg/kg) aplicados no mesmo plano anestésico (CUBAS et al., 2006; WAXMAN et al., 2015). Ao final dos protocolos propostos, as preparações receberam dose intravenosa do anestésico Pentobarbitol 100mg/kg. O momento de eutanásia, foi conferido ao momento de execução do procedimento de descerebração.

3.1. Descerebração

No procedimento de descerebração, primeiramente uma incisão medial na pele da cabeça permitiu a exposição do crânio. Em seguida, através de um aparelho de micro broca (AWT/WR-115) foi realizada uma pequena abertura medial (~2-3mm diâmetro) na caixa craniana, que deu acesso ao encéfalo. O nível da sexta escama caudal à escama superior da abertura ocular foi utilizado como referência aproximada para o procedimento de descerebração, que foi realizado com cauterizador a (~360°C). A incisão com cauterizador foi realizada perpendicularmente à base do crânio, sobre o teto óptico. Todo o sistema nervoso, rostral à incisão foi cauterizado e inviabilizado. Permaneceram intactas as estruturas referentes ao cerebelo, tronco encefálico e a porção posterior do hipotálamo. A incisão foi, posteriormente, suturada a fim de evitar ressecamento do tecido.

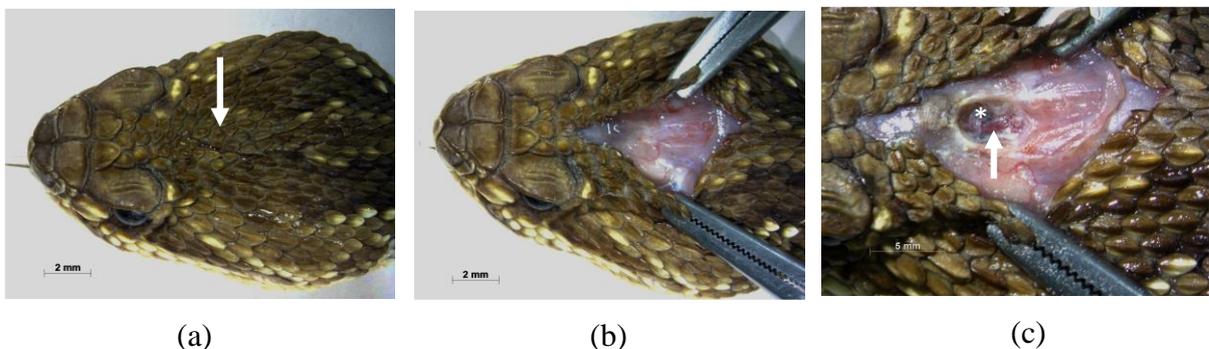


Figura 1. Imagens para referência do procedimento de descerebração, mostrando o local de incisão (seta branca) ao nível da sexta escama caudal à escama superior da abertura ocular (a); a incisão na pele do dorso da cabeça (b); abertura no craniano com micro broca (c) expondo meninge (asterisco) com grande vaso arterial (seta branca) a altura da incisão para descerebração.

3.2. Instrumentação

Sob anestesia de isoflurano 3%, uma incisão ventrolateral (~4,5cm) foi realizada no primeiro terço do corpo dos animais, imediatamente área rostral ao coração. Essa via proporcionou acesso aos vasos centrais para implantação do equipamento de monitoramento

cardiovascular. A canulação sistêmica foi realizada na artéria vertebral, pela qual foi cateter de polietileno (PE 50) foi inserido oclusivamente no arco sistêmico direito. Uma canulação oclusiva no circuito pulmonar foi realizada no primeiro ramo evidente da artéria pulmonar, rostral ao coração. O cateter (PE 10) foi avançado até sua extremidade ficar posicionada no interior da artéria pulmonar.

Sondas de fluxo foram aplicadas no arco sistêmico esquerdo, após sua curvatura na saída do coração; e na artéria pulmonar, antes do ramo vascular canulado. O espaço entre sonda e vaso foi preenchido com gel de ultrassom. Cânulas e sondas foram exteriorizadas e fixadas com pontos de sutura no dorso do animal para evitar deslocamento das mesmas. Os registros foram realizados com o animal em decúbito ventral. Além disso, foram implantados eletrodos subcutâneos para eletrocardiograma (ECG), dos quais dois foram dispostos em posição rostral e caudal, próximos ao coração; e um terceiro, de referência, no dorso no terço distal do animal. Para registro da térmico, foram utilizadas três sondas de temperatura de alta precisão (TC 2000 – *Thermocouple*) com registro contínuo. A sonda que monitorava a temperatura do ambiente (T_e) foi posicionada na área do experimento, no interior da gaiola de Faraday, a aproximadamente 30-40cm do corpo do animal. O monitoramento da temperatura superficial (T_s) foi realizado por sonda posicionada sob a pele, no dorso do animal. O monitoramento da temperatura central (T_b), foi realizado por sonda inserida na cloaca.

Dessa maneira, a instrumentação cirúrgica permitiu o registro contínuo (com sistema de transdução, amplificação, e registro *da Transonic Systems e ADInstruments*) de ECG, Pa sis, Pa pul, Qpul, QLAo (fluxo do arco sistêmico esquerdo) e das temperaturas T_b e T_s . Através dos registros foi possível calcular a PA, f_H , Qsis, DC, *net shunt*, Rsis e Rpul, que possibilitaram uma análise das condições fisiológicas dos circuitos pulmonar e sistêmico.

3.3. Protocolos Experimentais

Após os procedimentos de descerebração e instrumentação, a anestesia foi retirada e o animal ventilado artificialmente até estabelecimento de movimentos respiratórios espontâneos. Os protocolos de avaliação autonômica foram realizados 24h após o procedimento cirúrgico e recuperação da anestesia.

3.4. Aumento do retorno venoso - Levantamento da cauda (*Tail lift*)

Para análise das respostas hemodinâmicas e cardíacas decorrentes do aumento do retorno venoso, este fator foi proporcionado pela ação da gravidade no terço posterior do corpo.

Durante o protocolo de *tail lift (TL)*, o último terço do animal foi elevado ficando em posição vertical em um ângulo de 45°, durante aproximadamente cinco minutos. Os parâmetros cardiovasculares (f_H , Pa_{sis} , Pa_{pul} , Q_{sis} , Q_{pul} , DC , *net shunt*, VS_{sis} , VS_{pul} , $VStot$, R_{pul} e RS_{is}) foram registrados ao longo de todo o tempo do procedimento e recuperação após *TL*.

3.5. Redução da perfusão da cabeça - Levantamento da cabeça (*Head lift*)

Para análise das respostas hemodinâmicas e cardíacas decorrentes da redução da perfusão na cabeça, este fator foi proporcionado pela ação da gravidade no terço anterior do corpo. Durante o protocolo *head lift (HL)*, a porção anterior do animal (porção rostral ao coração) foi verticalizada em um ângulo de 45° durante cinco minutos. Os parâmetros cardiovasculares foram novamente registrados ao longo de todo o tempo do procedimento e recuperação após *TL*.

3.6. Aquecimento superficial

A presença de reflexos relacionados a ajustes hemodinâmicos ao calor superficial foi observada no teste de aquecimento da pele. Utilizamos uma lâmpada cerâmica infravermelha de aquecimento (150 Watts), posicionada dorsalmente à distância de 15cm do terço final corporal do animal durante aproximadamente 10 minutos. Os parâmetros cardiovasculares foram aferidos por todo o tempo de aquecimento e após desligamento da fonte de calor. O fator utilizado na análise foi o momento de maior aquecimento (pico do aquecimento).

3.7. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos de O₂

A capacidade de desenvolver ajustes hemodinâmicos e cardíacos compensatórios à redução da PO_2 arterial foi avaliada com injeções intravasculares de cianeto de sódio (NaCN), 400 μ g/kg e 600 μ g/kg. Os efeitos das doses foram analisados durante os primeiros cinco minutos de resposta (30, 60, 120, 180, 240, 300 segundos) em relação a valores basais (0 segundos). Para evitar a ativação de outros reflexos cardiovasculares, o volume das infusões de NaCN utilizados foram baixos (0,5ml) e cada injeção foi lenta, com aproximadamente 1 minuto de duração. Injeções de salina de mesmo volume foram previamente aplicadas como controle do procedimento.

3.8. Efeito da anestesia na capacidade de resposta autonômica

O mesmo protocolo de testes para avaliação de respostas autonômicas foi novamente aplicado sob o efeito da anestesia (isoflurano 3%). Assim, após o final do primeiro protocolo a preparação foi deixada em repouso por 24h para recuperação completa de qualquer desvio de balanço autonômico remanescente. Após esse período os animais foram entubados e ventilados artificialmente com 5% de isoflurano por 5 minutos. Em seguida ao procedimento de indução, a anestesia foi reduzida para o nível utilizado durante os procedimentos cirúrgicos padrão (3%). O protocolo de testes da presença de respostas autonômicas foi repetido durante o plano anestésico. Assim, *TL*, *HL*, aquecimento superficial e injeção de NaCN foram repetidas exatamente como a descrição anterior. Este procedimento nos permite determinar o efeito da anestesia sobre presença e magnitude de tais respostas.

3.9. Cálculos de parâmetros cardiovasculares

Os dados de Pdiastólica e Psistólica foram obtidos através do módulo de análise do LabChart (*ADInstruments*). A f_H foi derivada dos sinais pulsáteis de Pa ou do sinal de ECG. A Pa média (PAM sis e PAM pul) foi calculada com equação padrão:

$$Pa \text{ diastólica} + 1/3(Pa \text{ sistólica} - Pa \text{ diastólica}) \quad (\text{KLABUNDE, 2005}) \quad (1)$$

Os fluxos (Q_{sis} e Q_{pul}) foram obtidos através do módulo *peak analysis* do *LabChart* e corrigidos pelo peso dos animais. Q_{sis} foi calculado a partir dos dados de QLA_o , pelo uso do fator de correção para animais não anestesiados.

$$Q_{sis} = QLA_o \times 2,6 \quad (\text{FILOGONIO et al., 2014}) \quad (2)$$

Em animais anestesiados, por sua vez, utilizamos o fator apropriado

$$Q_{sis} = QLA_o \times 3,3 \quad (\text{GALLI et al., 2005}) \quad (3)$$

O débito cardíaco total foi obtido a partir da soma dos fluxos.

$$DC = Q_{sis} + Q_{pul} \quad (4)$$

Os índices de desvio intracardíaco foram obtidos pela relação entre os fluxos

$$Net \ shunt = Q_{pul}/Q_{sis} \quad (5)$$

Quando a relação foi menor que 1, o *net shunt* foi considerado D-E, enquanto que valores acima de 1 determinaram *net shunt* E-D (HICKS e KROSNIUNAS, 1996). As R_{sis} e R_{pul} por sua vez, foram obtidas pela razão entre pressão e fluxo.

$$R = P/Q \text{ (CROSSLEY et al., 1998)} \quad (6)$$

Os volumes de ejeção sistólico sistêmico (V_{Ssis}) e pulmonar (V_{Spul}) foram calculados pelas relações entre fluxo e frequência em cada circuito, pulmonar ou sistêmico.

$$VS = Q/f_H \quad (7)$$

3.10. Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Para testar o efeito dos protocolos de *TL*, *HL*, aquecimento, das injeções de cianeto e da anestesia foi utilizado o modelo linear generalizado misto. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software IBM SPSS versão 20. As diferenças nas médias foram analisadas através do pós-teste de Bonferroni e foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Aumento do retorno venoso - Levantamento da cauda (*Tail lift*)

Durante o *TL* foi observado aumento na PAM sis, enquanto o DC, V_{Stot} e f_H não se alteraram. Além disso, a R_{sis} e o Q_{sis} (Figura 2B e Figura 4), permanecem constantes durante o protocolo. A PAM pul não se alterou (Figura 2A; Tabela 1). O Q_{pul} se elevou 32,39% em animais não anestesiados, enquanto a R_{pul} não se alterou (Figura 2B e Figura 4). O *net shunt* basal ($0,36 \pm 0,1$) não se alterou durante o protocolo.

Ao final da manobra *TL* não foram observadas alterações nas R_{sis} e R_{pul} . O Q_{sis} não se alterou durante o protocolo, enquanto Q_{pul} diminuiu em relação ao momento da manobra. A f_H permaneceu próxima aos valores basais. O V_{Ssis} e V_{Spul} não se alteraram (Figura 3), bem como o DC. As PAM sis e PAM pul diminuíram, 23,9% e 13,9%, respectivamente. O *net shunt* permaneceu inalterável durante o protocolo.

Em animais anestesiados, a manobra de *TL* provocou elevação no DC, ao contrário do observado em animais não anestesiados (Figura 2B; Tabela 1). As PAM pul e PAM sis também se elevaram. O V_{Spul} aumentou 28% em animais anestesiados, enquanto V_{Ssis} não se alterou (Figura 3). A f_H não mudou durante o protocolo, semelhante aos não anestesiados. Não foram

observadas alterações nas R_{sis} e R_{pul} durante a manobra em animais anestesiados (Figura 4; Tabela 1), dessa maneira, o Q_{sis} e Q_{pul} também não se alteraram.

Ao final do protocolo de *TL*, a PAM_{sis} e a PAM_{pul} sofreram redução de 13 e 12,4%, respectivamente. O Q_{sis} não se alterou, enquanto Q_{pul} diminuiu 26,4% em relação ao momento da manobra. Os demais parâmetros não se alteraram. O *net shunt* permanece na direção D-E (valores basais de $0,50 \pm 0,1$) em animais anestesiados (Figura 4; Tabela 1).

Quanto ao efeito da anestesia em parâmetros cardiovasculares, foi observado que o isoflurano causa redução de 39,9% da PAM_{sis} basal (Figura 2A; Tabela 1). Durante a manobra, a alteração da PAM_{sis} foi 41,6% menor em animais anestesiados, enquanto a PAM_{sis} ao final da manobra também foi menor (35,1%) em animais anestesiados. Não houveram diferenças na magnitude das respostas entre animais anestesiados e não anestesiados nos demais parâmetros (Tabela 1).

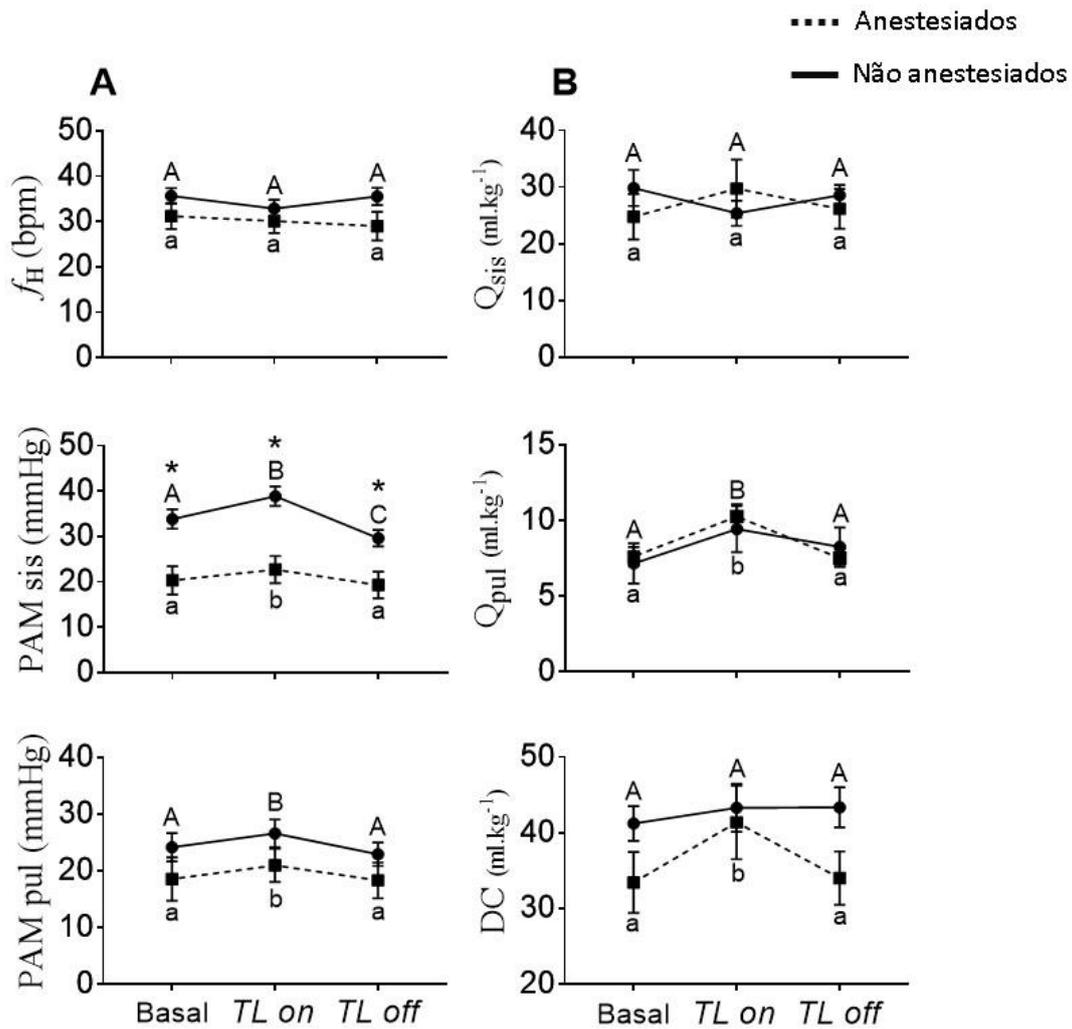


Figura 2: Alterações resultantes do protocolo de *tail lift* em parâmetros cardiovasculares de cascavéis descerebradas. Consequência de *TL on* (momento de maior resposta durante a manobra de *TL*) e *TL off* (momento após o término da manobra de *TL*) na f_H (n=12), PAM sis (n=12) e PAM pul (n=8) (A) e nos fluxos Q_{sis} (n=12), Q_{pul} (n=10) e DC (n=8) (B) em cascavéis descerebradas. Os círculos (linhas sólidas) representam animais sem anestesia, enquanto quadrados (linhas pontilhadas) representam animais anestesiados. Os valores evidenciados por letras maiúsculas (animais sem anestesia) e minúsculas (animais anestesiados) indicam diferença estatística. Asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre animais anestesiados e não anestesiados. Dados expressos como média±E.P.M.

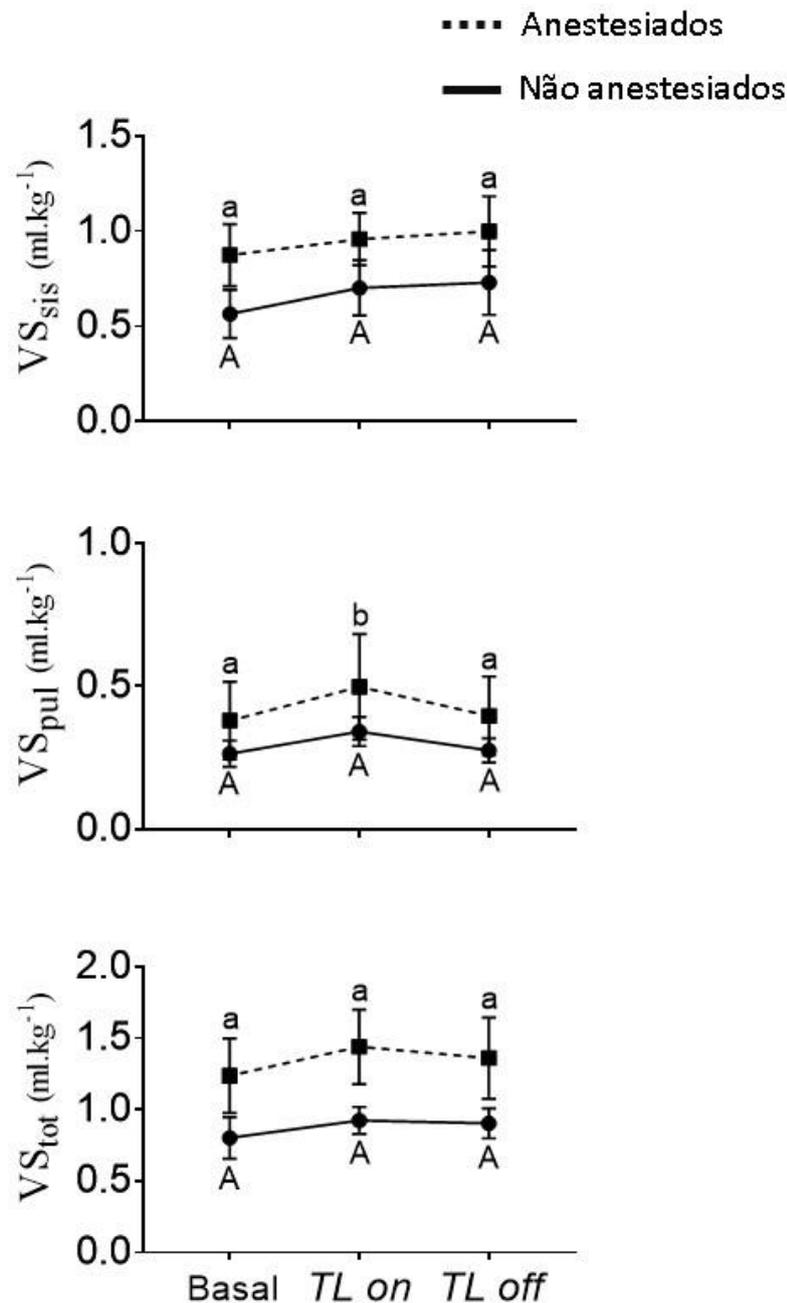


Figura 3: Efeito da manobra de *Tail lift* em parâmetros cardiovasculares de cascavéis descerebradas. Resultado de *TL on* (momento de maior resposta durante a manobra de *TL*) e *TL off* (momento após o término da manobra de *TL*). Alterações dos VS_{sis} (n=12), VS_{pul} (n=10) e VS_{tot} (n=7) em cascavéis descerebradas anestesiadas (círculos; linhas sólidas) e não anestesiadas (quadrados; linhas pontilhadas). As letras maiúsculas evidenciam valores estatisticamente diferentes em animais não anestesiados, enquanto letras minúsculas indicam a diferença entre animais anestesiados. Asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre animais anestesiados e não anestesiados. Os dados são apresentados como média±E.P.M.

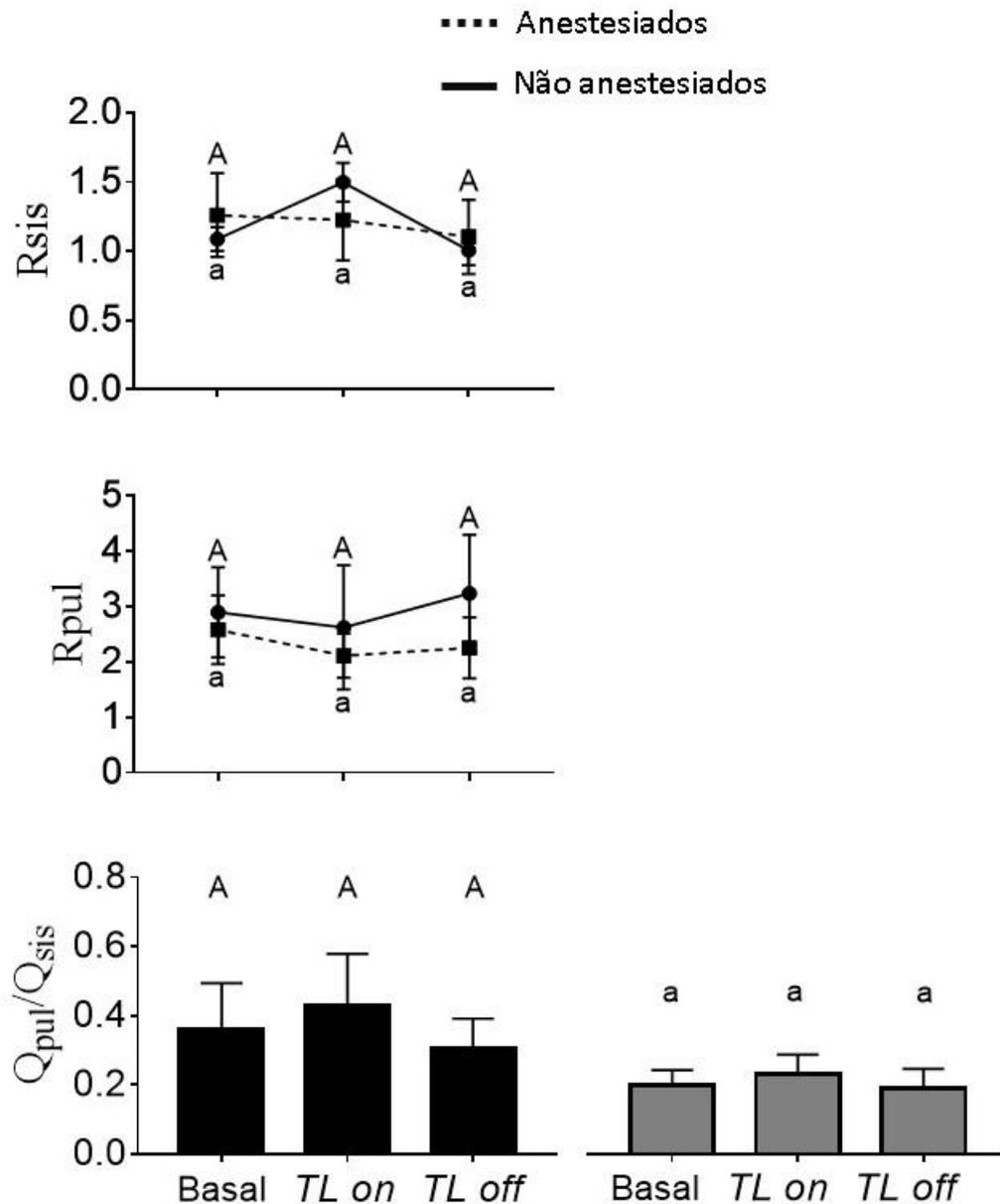


Figura 4: Resultado dos protocolos de TL on e TL off nas resistências pulmonares (R_{pul}), sistêmicas (R_{sis}) e net shunt de cascavéis descerebradas. Efeito de TL on (momento de maior resposta durante a manobra de TL) e TL off (momento após o término da manobra de TL) em animais descerebrados anestesiados (quadrado preto; linhas pontilhadas; barras cinzas) e não anestesiados (círculos; linhas contínuas; barras pretas) nas R_{sis} (n=10), R_{pul} (n=7) e net shunt (n=8). Diferentes letras maiúsculas apontam a diferença estatística dos protocolos em animais não anestesiados, enquanto diferentes letras minúsculas indicam a diferença em animais anestesiados. Os asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre os animais anestesiados e não anestesiados. Dados expressos como média±E.P.M.

Tabela 1. Efeito do protocolo de *tail lift* em todas as variáveis cardiovasculares estudadas em cascavéis descerebradas anestesiadas e não anestesiadas.

	Basal	TL ON	TL OFF	Basal anestesiados	TL ON anestesiados	TL OFF anestesiados
f_H (bpm)	35,6±1,7 ^A	32,8±1,9 ^A	35,5±1,9 ^A	29,0±2,5 ^a	30,9±3,3 ^a	28,49±2,9 ^a
PAM sis (mmHg)	33,8±2,1 ^A	38,9±2,1 ^B	29,6±1,8 ^C	20,3±3,1 ^{a*}	22,7±2,9 ^{b*}	19,33±2,9 ^{a*}
PAM pul (mmHg)	24,1±2,5 ^A	26,6±2,4 ^B	22,9±2,0 ^A	18,5±3,8 ^a	20,9±2,9 ^b	18,3±3,1 ^a
Qsis (ml.kg⁻¹)	29,8±3,1 ^A	25,4±2,2 ^A	28,5±1,8 ^A	24,8±4,0 ^a	29,7±5,0 ^a	26,1±3,5 ^a
Qpul (ml.kg⁻¹)	7,1±1,3 ^A	9,4±1,5 ^B	8,2±1,2 ^A	7,6±0,6 ^a	10,2±0,8 ^b	7,5±0,6 ^a
VSSis (ml.kg⁻¹)	0,56±0,1 ^A	0,70±0,1 ^A	0,73±0,1 ^A	0,87±0,1 ^a	0,95±0,1 ^a	0,99±0,2 ^a
VSpul (ml.kg⁻¹)	0,26±0,04 ^A	0,34±0,05 ^A	0,27±0,04 ^A	0,38±0,1 ^a	0,49±0,18 ^b	0,39±0,1 ^a
VStot (ml.kg⁻¹)	0,80±0,1 ^A	0,92±0,9 ^A	0,90±0,1 ^A	1,23±0,2 ^a	1,44±0,2 ^a	1,36±0,2 ^a
DC (ml.kg⁻¹)	41,24±2,2 ^A	43,32±3,1 ^A	43,3±2,6 ^A	33,4±4,0 ^a	41,4±4,8 ^b	34,0±3,5 ^a
Rsis (mmHg. ml. kg⁻¹)	1,0±0,1 ^A	1,49±0,1 ^A	1,0±0,1 ^A	1,26±0,3 ^a	1,22±0,3 ^a	1,1±0,2 ^a
Rpul (mmHg. ml. kg⁻¹)	2,8±0,3 ^A	2,62±0,4 ^A	3,2±0,4 ^A	2,58±0,6 ^a	2,16±0,3 ^a	2,25±0,5 ^a
Net shunt (ml.kg⁻¹)	0,36±0,1 ^A	0,43±0,1 ^A	0,3±0,1 ^A	0,50±0,1 ^a	0,58±0,1 ^a	0,48±0,1 ^a

Dados expressos como média±E.P.M. Valores indicados com letras subscritas distintas indicam a diferença estatística durante o protocolo em animais anestesiados (letras minúsculas) e não anestesiados (letras maiúsculas). Asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre os animais anestesiados e animais não anestesiados.

4.2. Redução da perfusão da cabeça - Levantamento da cabeça (*Head lift*)

Durante a manobra de *HL* o DC sofreu elevação de 25%. O VStot não se alterou durante *HL*, bem como os VSsis, no entanto, o VSpul aumentou durante a manobra (Figura 5B e Figura 6). Não foram observadas alterações na f_H durante o *HL* (Figura 5A). As alterações no DC causaram elevação (19%) na PAM sis, enquanto a PAM pul não se alterou (Figura 5A). As Rpul e Rsis não se alteraram durante *HL*, bem como os fluxos Qpul e Qsis (Figura 5B e Figura 7; Tabela 2).

Quando a cabeça do animal foi colocada de volta na posição horizontal ocorreu diminuição de 11% na PAM sis enquanto a PAM pul não se alterou (Figura 5A; Tabela 2). Acompanhado disso, houve aumento de 10% na f_H em relação aos valores basais. O DC não sofreu alterações, bem como ambos Qsis e Qpul. O VSpul diminuiu em relação ao momento da manobra e retornou próximo a valores basais. O VSsis por sua vez, não se alterou. Nesse momento, as resistências Rsis e Rpul também não se alteraram (Figura 7; Tabela 2).

De maneira semelhante ao que se observou em animais não anestesiados, animais anestesiados produziram elevações no DC durante *HL* (Figura 5B; Tabela 2). Não ocorreram alterações no VStot e VSpul em nenhum momento durante os protocolos, no entanto, VSsis aumentou durante a manobra de *HL* (Figura 6; Tabela 2). O Qpul também não se alterou durante *HL*, enquanto o Qsis aumentou 27,8% (Figura 5B; Tabela 2). Ao contrário dos animais não anestesiados, o protocolo não provocou alterações na PAM sis durante o *HL* em animais anestesiados. A PAM pul e a f_H permaneceram inalteradas durante *HL*. As Rsis e Rpul não se alteraram em nenhum momento durante os protocolos (Figura 7; Tabela 2). Assim como animais não anestesiados, a direção dos desvios intracardíacos não se alterou.

Além disso, as respostas em animais anestesiados e não anestesiados foram comparadas, para se observar o efeito da anestesia sobre os parâmetros cardiovasculares durante os protocolos. A PAM sis foi deprimida em animais anestesiados, sendo a PAM sis basal 72% maior em animais não anestesiados (Figura 5A; Tabela 2). Durante o *HL*, a PAM sis foi 78% e maior em animais não anestesiados. O VSpul em animais não anestesiados foi 489% maior que anestesiados durante o *HL* (Figura 6; Tabela 2).

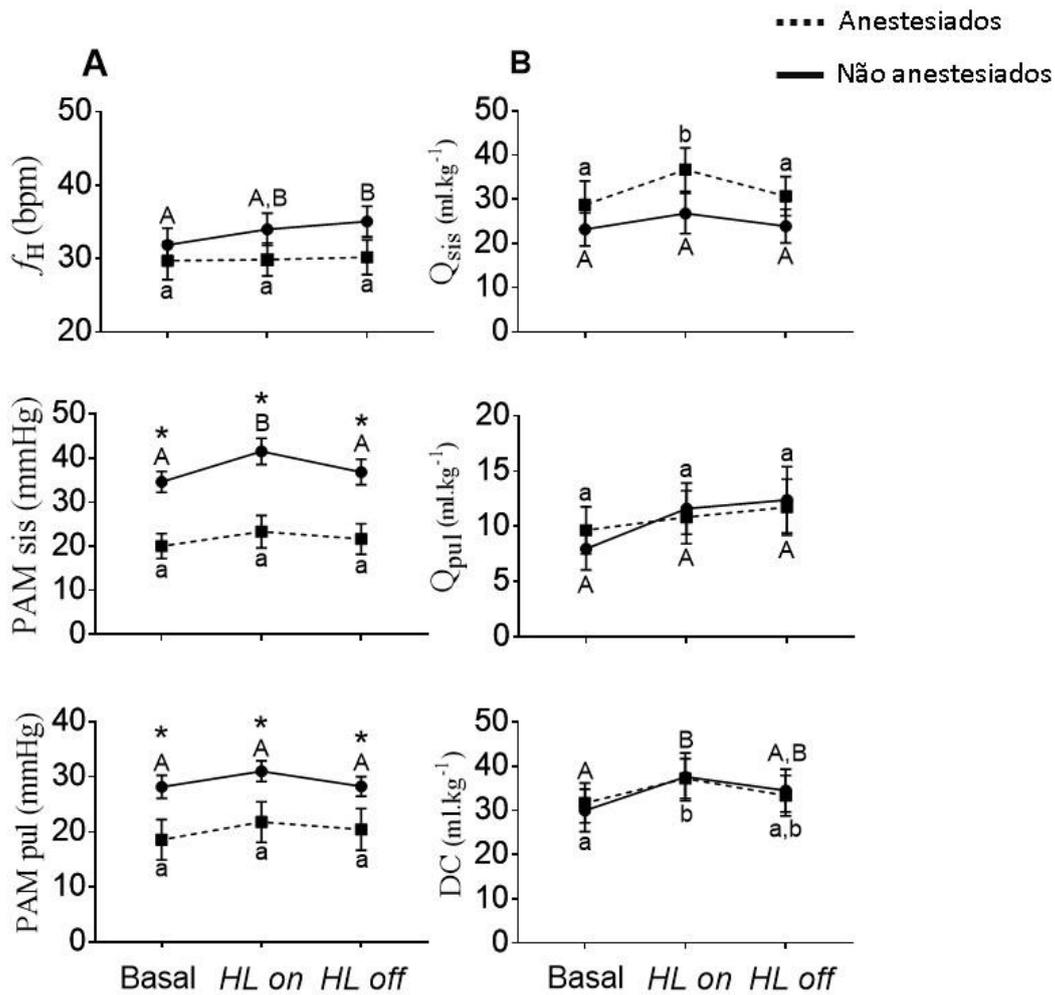


Figura 5: Alterações provocadas pela manobra de head lift (HL) em variáveis cardiovasculares de cascavéis descerebradas. Resultado de HL on (momento de maior resposta durante a manobra de HL) e HL off (momento após o término da manobra de HL) na f_H (n=11), PAM sis (n=11), PAM pul (n=8) (A), Q_{sis} (n=11), Q_{pul} (n=9), DC (n=8) (B) em cascavéis anestesiadas (quadrados; linhas pontilhadas) e não anestesiadas (círculos; linhas contínuas). Valores evidenciados por diferentes letras minúsculas (anestesiados) e minúsculas (não anestesiados) indicam a diferença estatística entre eles. Os asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre os animais anestesiados e animais não anestesiados. Dados expressos como média \pm E.P.M.

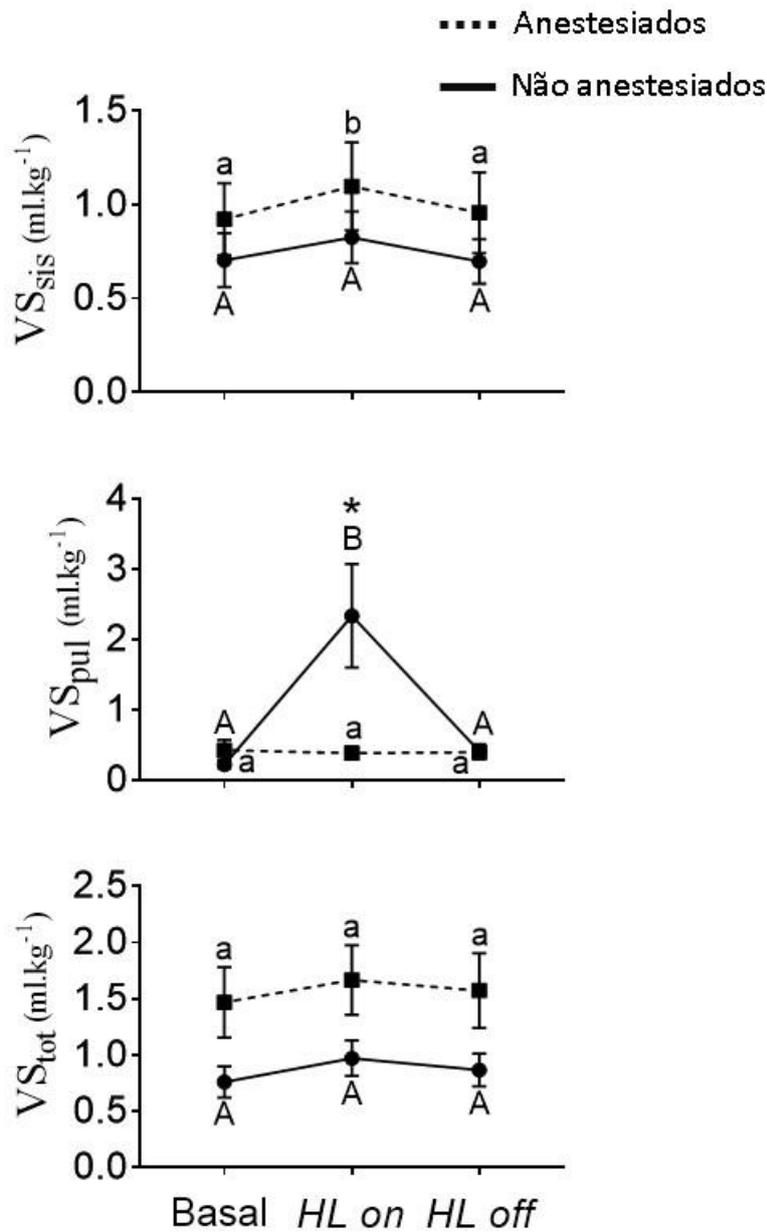


Figura 6: Efeito do protocolo de *head lift* nos volumes de ejeção sistólicos em cascavéis descerebradas. Alterações provocadas nos VS_{sis} ($n=11$), VS_{pul} ($n=9$) e VS_{tot} ($n=6$) durante *HL on* (momento de maior resposta durante a manobra de *HL*) e *HL off* (momento após o término da manobra de *HL*) em animais anestesiados (quadrados; linhas pontilhadas) e não anestesiados (círculos; linhas contínuas). Diferentes letras maiúsculas (não anestesiados) e minúsculas (anestesiados) indicam a diferença estatística. Os asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre animais anestesiados e animais não anestesiados. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M

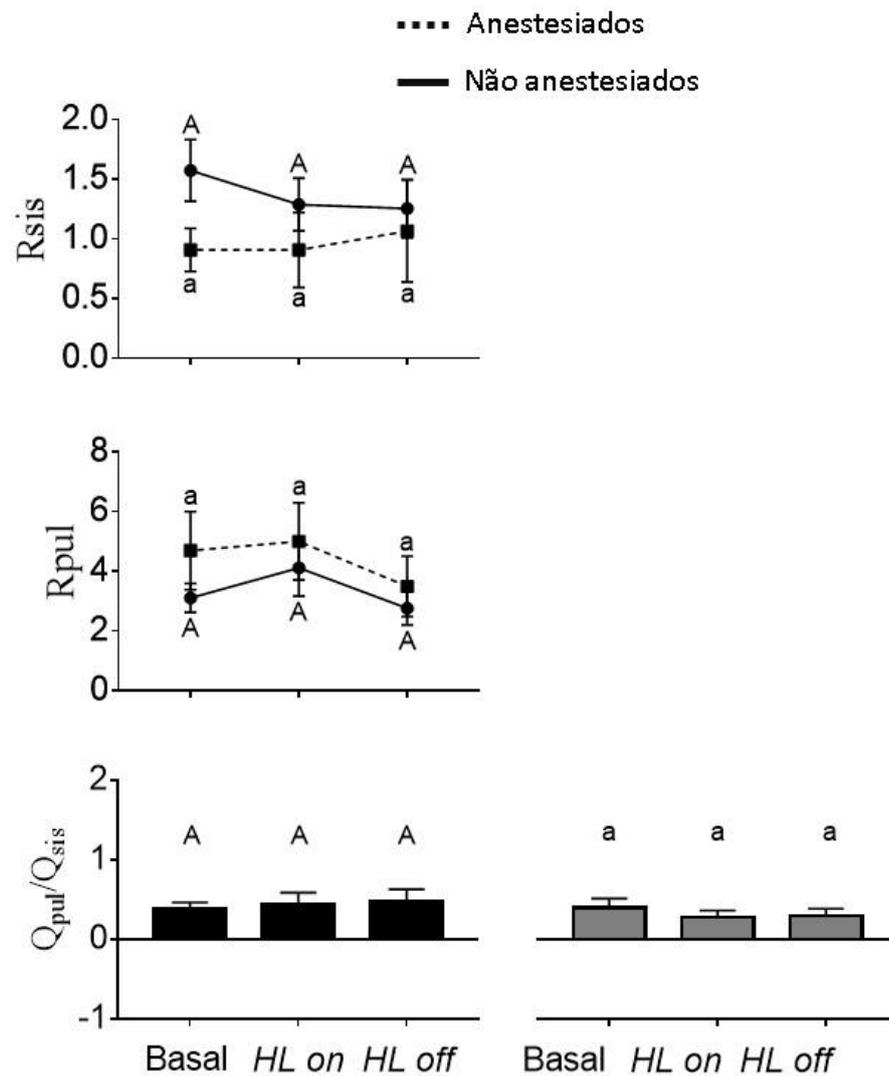


Figura 7: Resultado do protocolo de *head lift* nas resistências sistêmica, pulmonar e *net shunt* em animais descerebrados. Efeito de *HL on* (momento de maior resposta durante a manobra de *HL*) e *HL off* (momento após o término da manobra de *HL*) nas R_{sis} (n=11), R_{pul} (n=7) e *net shunt* (n=8) entre animais anestesiados (quadrados; linhas pontilhadas; barras cinzas) e não anestesiados (círculos; linhas contínuas; barras pretas). A diferença estatística foi indicada por diferentes letras minúsculas (animais anestesiados) e maiúsculas (animais não anestesiados). Asteriscos (*) apontam a diferença estatística entre as respostas de animais anestesiados e não anestesiados. Os valores são apresentados como média±E.P.M.

Tabela 2. Efeito do protocolo de *head lift* nas variáveis cardiovasculares de cascavéis descerebradas anestesiadas e não anestesiadas.

	Basal	HL ON	HL OFF	Basal anestesiados	HL ON anestesiados	HL OFF anestesiados
f_H (bpm)	31,8±2,2 ^A	33,9± 2,2 ^{A,B}	35,0±2,1 ^B	29,7±2,5 ^a	29,8±2,2 ^a	30,1±2,3 ^a
PAM sis (mmHg)	34,6±2,3 ^A	41,5±2,9 ^B	36,8±2,9 ^A	20,07±2,8 ^{a*}	23,3±3,7 ^{a*}	21,6±3,5 ^{a*}
PAM pul (mmHg)	28,2±2,01 ^A	31,0±1,8 ^A	28,2±1,7 ^A	18,5±3,6 ^{a*}	21,8±3,7 ^{a*}	20,4±3,1 ^{a*}
Qsis (ml.kg⁻¹)	23,2±3,7 ^A	26,8±2,2 ^A	23,9±3,8 ^A	28,7±5,3 ^a	36,7±4,9 ^b	30,7±4,4 ^a
Qpul (ml.kg⁻¹)	7,98±1,9 ^A	11,62±2,3 ^A	12,4±3,0 ^A	9,6±2,1 ^a	10,8±2,4 ^a	11,7±2,5 ^a
Vsis (ml.kg⁻¹)	0,70±0,1 ^A	0,82±0,1 ^A	0,69±0,1 ^A	0,92±0,2 ^a	1,09±0,2 ^b	0,96±0,2 ^a
VSpul (ml.kg⁻¹)	0,22±0,05 ^A	2,3±0,7 ^B	0,42±0,1 ^A	0,43±0,1 ^a	0,38±0,1 ^{a*}	0,40±0,1 ^a
VStot (ml.kg⁻¹)	0,76±0,1 ^A	0,9±0,1 ^A	0,87±0,1 ^A	1,47±0,3 ^a	1,66±0,3 ^a	1,57±0,3 ^a
DC (ml.kg⁻¹)	30,0±4,8 ^A	37,6±5,4 ^B	34,5±4,8 ^{A,B}	31,7±4,4 ^a	37,2±4,4 ^b	33,3±4,6 ^{a,b}
Rsis (mmHg. ml. kg⁻¹)	1,57±0,2 ^A	1,28±0,2 ^A	1,25±0,2 ^A	0,90±0,2 ^a	0,90±0,2 ^a	1,06±0,2 ^a
Rpul (mmHg. ml. kg⁻¹)	3,1±0,5 ^A	4,1±0,9 ^A	2,76±0,5 ^A	4,7±1,3 ^a	5,00±1,3 ^a	3,49±1,0 ^a
Net shunt (ml.kg⁻¹)	0,38±0,1 ^A	0,43±0,1 ^A	0,47±0,1 ^A	0,40±0,1 ^a	0,28±0,8 ^a	0,30±0,1 ^a

Valores apresentados como média±E.P.M. Valores evidenciados por diferentes letras subscritas minúsculas (anestesiados) e maiúsculas (não anestesiados) indicam a diferença estatística nas variáveis cardiovasculares durante o protocolo. Valores indicados com asteriscos (*) indicam diferença estatística entre animais anestesiados e animais não anestesiados.

4.3. Aquecimento superficial

A temperatura do ambiente (T_e), permaneceu em média $24,14 \pm 0,61$. A temperatura da pele dos animais (T_s) se elevou 53% durante o aquecimento, enquanto a temperatura corporal (T_b) aumentou 4% (Tabela 4). Em animais não anestesiados durante o aquecimento, ocorreu aumento de 36,2% na f_H valores (Figura 8A). O DC, os VSsis, VSpul e VStot não se alteraram durante o aquecimento (Figuras 8B; 9A). Os fluxos Qsis e Qpul não sofreram alterações durante o protocolo (Figura 8B). Acompanhado disso, a Rsis diminuiu 19%, enquanto Rpul não se alterou (Figura 9B). O aquecimento causou aumento de 15,7% na PAM sis e 18,6% na PAM pulmonar (Figura 8A; Tabela 3). Além disso, assim como no estado basal, a direção do *net shunt* nas cascavéis foi D-E ($Q_{pul}/Q_{sis} < 1$) durante o aquecimento (Figura 9B, Tabela 3). Esse valor sofreu diminuição de 20% durante o pico do aquecimento em relação aos valores basais e, portanto, o *net shunt* D-E aumentou durante o aquecimento.

Em animais anestesiados, não ocorreram elevações na f_H , como foi observado em animais não anestesiados (Figura 8A; Tabela 3). O DC e os fluxos Qsis e Qpul também não se elevaram (Figura 8B; Tabela 3), bem como os volumes de ejeção (Figura 9A; Tabela 3). A PAM sis aumentou enquanto PAM pul permaneceu inalterada (Figura 8A). As Rsis e Rpul não se modificaram (Figura 9B; Tabela 3). O *net shunt* D-E por sua vez, sofreu redução (12%) durante o pico do aquecimento (Figura 9B; Tabela 3).

A comparação dos parâmetros cardiovasculares basais entre animais anestesiados e não anestesiados mostrou que não há diferenças entre a f_H , Qsis, Rpul e VStot (Figuras 8A, 8B, 9A, 9B; Tabela 3). A PAM sis basal por sua vez, foi mais baixa em animais anestesiados (Figura 8A). O Qpul também foi menor durante o aquecimento em animais anestesiados (Figura 8B; Tabela 3). A Rsis basal foi 66% menor em animais anestesiados (Figura 9B). Durante o aquecimento a f_H (17,9%) e o DC (40,5%) foram maiores em animais não anestesiados (Figura 8A, 8B). A PAM sis foi 88,57% maior em animais não anestesiados (Figura 8A; Tabela 3). A Rpul foi por sua vez, foi 100% maior em animais anestesiados, o que explica o aumento do *net shunt* D-E durante o pico do aquecimento em relação a animais não anestesiados (Figura 9B; Tabela 3). Embora a anestesia tenha causado um aumento no *net shunt* D-E durante o aquecimento em animais anestesiados, a proporção do *net shunt* D-E foi menor (45%) em animais anestesiados. Dessa forma, de maneira geral a anestesia causou aumento no *net shunt* D-E.

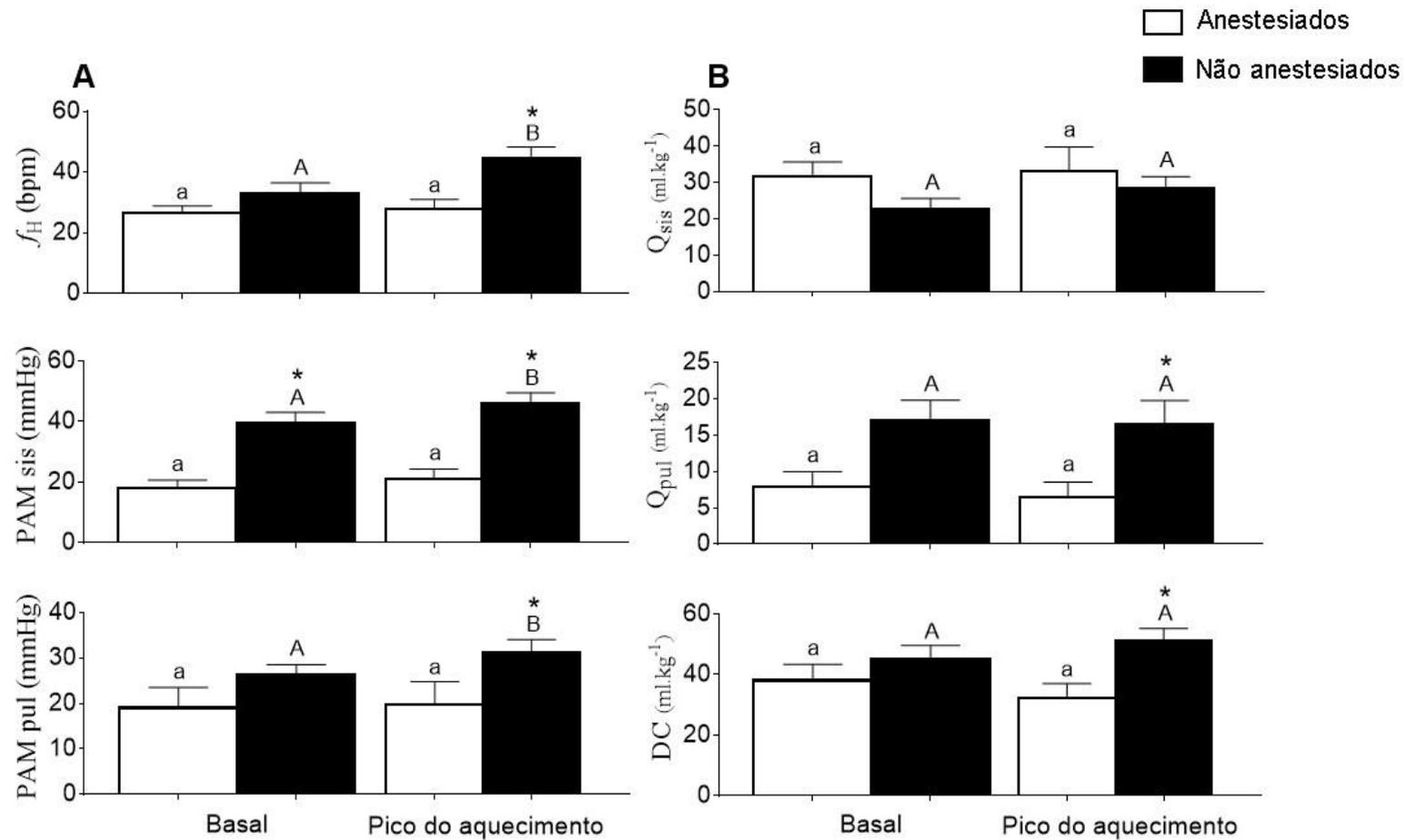


Figura 8: Efeito do aquecimento nos parâmetros cardiovasculares de cascavéis descerebradas. Os gráficos mostram o efeito do aquecimento na f_H (n=11), PAM sis (n=11), PAM pul (n=8) e nos fluxos Q_{sis} (n=11), Q_{pul} (n=9), DC (n=8) (B). Valores destacados com diferentes letras minúsculas (animais anestesiados; barras brancas) e maiúsculas (não anestesiados; barras pretas) denotam a diferença estatística entre basal e pico do aquecimento. Os asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre os valores basais e pico do aquecimento dos animais anestesiados e não anestesiados. Os dados são apresentados como média±E.P.M.

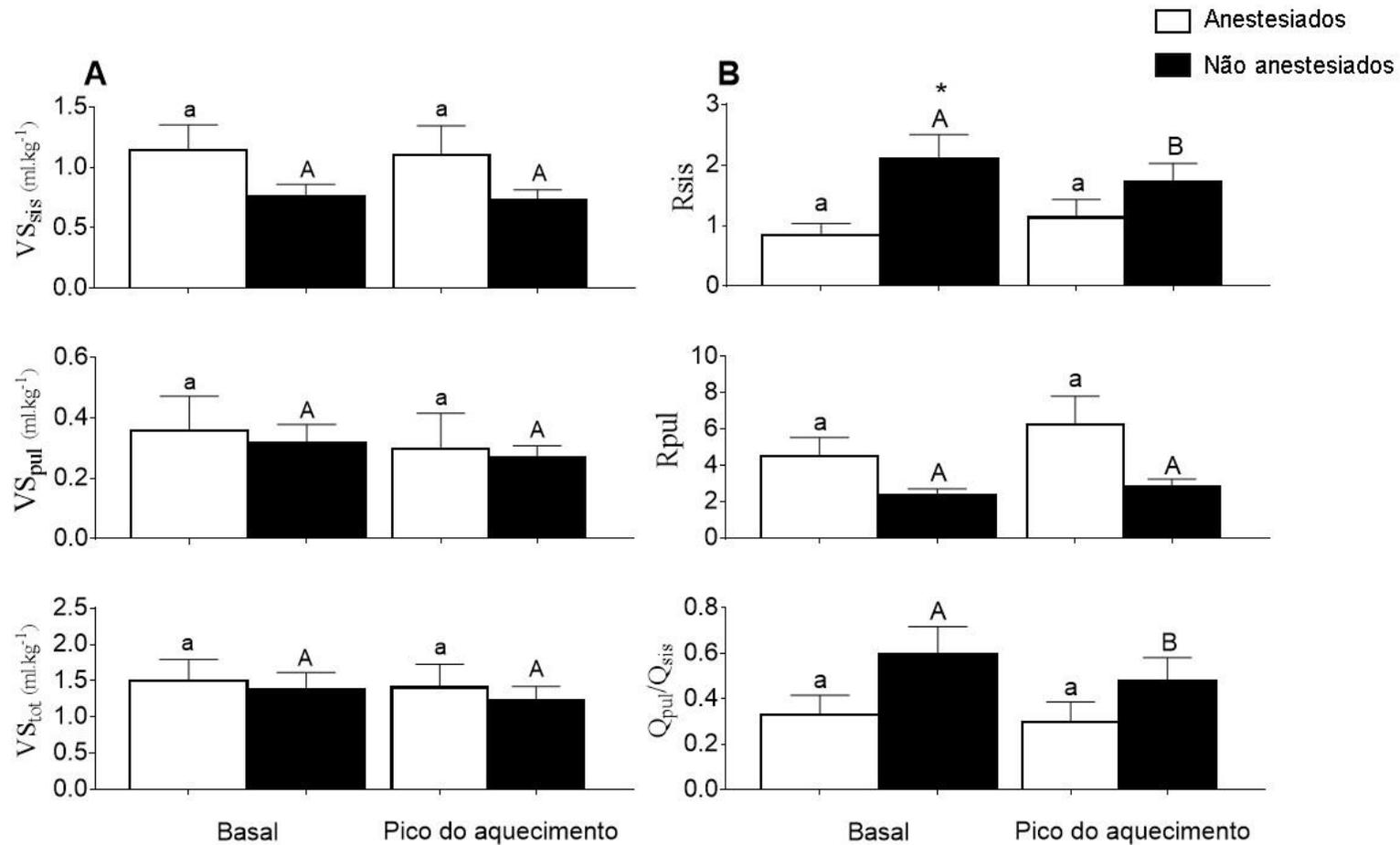


Figura 9: Efeito dos protocolos de aquecimento em variáveis cardiovasculares de cascavéis descerebradas. Os gráficos mostram o resultado do aquecimento nos VS_{sis} (n=11), VS_{pul} (n=9), VS_{tot} (n=6) (A) e nas resistências R_{sis} (n=11), R_{pul} (n=7) e *net shunt* (n=8) (B). Valores destacados com diferentes letras minúsculas (animais anestesiados; barras brancas) e maiúsculas (não anestesiados; barras pretas) indicam a diferença estatística entre basal e pico do aquecimento. Os asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre os valores basais (pico do aquecimento) dos animais anestesiados e não anestesiados. Os dados estão expressos como média±E.P.M.

Tabela 3. Efeito do aquecimento em nos parâmetros cardiovasculares de animais descerebrados anestesiados e não anestesiados.

	Basal	Pico do aquecimento	Basal anestesiados	Pico do aquecimento anestesiados
f_H (bpm)	32,9±3,6 ^A	44,8±3,5 ^B	26,4±2,3 ^a	27,9±3,1 ^{a*}
PAM sis (mmHg)	39,6±3,3 ^A	45,8±3,7 ^B	17,9±2,7 ^{a*}	21,0±3,4 ^{a*}
PAM pul (mmHg)	26,4±2,0 ^A	31,3±2,7 ^A	19,0±4,4 ^a	19,8±4,9 ^{a*}
Qsis (ml.kg⁻¹)	22,6±2,9 ^A	28,5±3,1 ^A	31,6±4,1 ^a	33,1±6,7 ^a
Qpul (ml.kg⁻¹)	16,93±2,8 ^A	16,54±3,2 ^A	7,96±2,0 ^a	6,38±2,1 ^{a*}
Vsis (ml.kg⁻¹)	0,76±0,1 ^A	0,73±0,08 ^A	1,1±0,2 ^a	1,1±0,2 ^a
Vspul (ml.kg⁻¹)	0,31±0,06 ^A	0,27±0,04 ^A	0,35±0,07 ^a	0,29±0,1 ^a
VStot (ml.kg⁻¹)	1,38±0,1 ^A	1,22±0,1 ^A	1,5±0,3 ^a	1,4±0,3 ^a
DC (ml.kg⁻¹)	45,1±4,6 ^A	51,0±4,1 ^A	38,1±5,2 ^a	32,1±4,8 ^{a*}
Rsis (mmHg. ml. kg⁻¹)	2,1±0,4 ^A	1,7±0,3 ^B	0,84±0,1 ^{a*}	1,13±0,2 ^a
Rpul (mmHg. ml. kg⁻¹)	2,33±0,3 ^A	2,8±0,4 ^A	4,5±1,0 ^a	6,2±1,5 ^a
Net shunt (ml.kg⁻¹)	0,59±0,1 ^A	0,47±0,1 ^B	0,33±0,1 ^a	0,29±0,1 ^a

Os dados são apresentados como média±E.P.M. Letras superescritas diferentes aos valores indicam a diferença estatística entre animais anestesiados (letras minúsculas) e não anestesiados (letras maiúsculas). Os asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre os animais anestesiados e não anestesiados.

Tabela 4. Temperaturas da pele (T_s), central (T_b) e do ambiente durante (T_e) durante repouso (basal) e pico do aquecimento.

Temperatura (°C)	T_s basal	T_s pico do aquecimento	T_b basal	T_b pico do aquecimento	T_e
Animais não anestesiados	23,2±0,4	35,7±0,3*	22,9±0,4	23,9±0,4*	24,14±0,6
Animais anestesiados	23,6±0,4	35,3±0,9*	23,03±0,4	23,7±0,4*	24,01±0,7

Os dados são expressos em média±E.P.M. Os asteriscos (*) indicam a diferença estatística das temperaturas entre os valores basais e durante o pico do aquecimento.

4.4. Quimiorreflexo

Neste teste foram observadas as respostas cardiovasculares ao cianeto de sódio (NaCN) durante cinco minutos (30, 60, 120, 180, 240, 300 segundos) após a aplicação de duas doses 400µg/kg e 600µg/kg na cânula sistêmica e o efeito foi comparado com valores basais. A hipóxia induzida pelas injeções de NaCN resultou em taquicardia e reduções na PAM sis e PAM pul, respostas secundárias ao estímulo dos quimiorreceptores.

As injeções de NaCN 400µg/kg causaram aumento da f_H (60, 240, 300 segundos) de resposta. A taquicardia minuto foi acompanhada de diminuição da PAM sis (240 e 300 segundos), enquanto a PAM pul não se alterou (Figura 10A; tabela 5). Não ocorreram alterações nos Qsis, Qpul e DC (Figura 10B; tabela 5). Os VSsis, VSpul e VStot não se modificaram (Figura 11A). O NaCN não provocou mudanças nas Rsis e Rpul (Figura 11B; tabela 5). O *net shunt* não sofreu modificações em sua magnitude ou direção após as injeções de NaCN 400µg/kg. A direção do *net shunt* predominante após as injeções é E-D (Figura 11B, tabela 5). Não houveram diferenças nos parâmetros cardiovasculares entre as duas doses de NaCN testadas.

A dose de 600µg/kg, causou aumento da f_H (180 e 240 segundos) após as injeções (Figura 10A; tabela 6). A PAM sis, por sua vez diminuiu (300 segundos), enquanto a PAM pul não se alterou (Figura 10A; tabela 6). O Qsis e o Qpul não se modificaram, enquanto o DC aumentou (300 segundos) (Figura 10B; tabela 6). Os VSsis, VSpul e VStot não se alteraram (Figura 11A; tabela 6). As Rpul e Rsis não se modificaram após as injeções de NaCN (Figura 11B; tabela 6). Ao contrário do observado na menor dose, o *net shunt* permaneceu na direção D-E em resposta às injeções de 600µg/kg (Figura 11B; tabela 6).

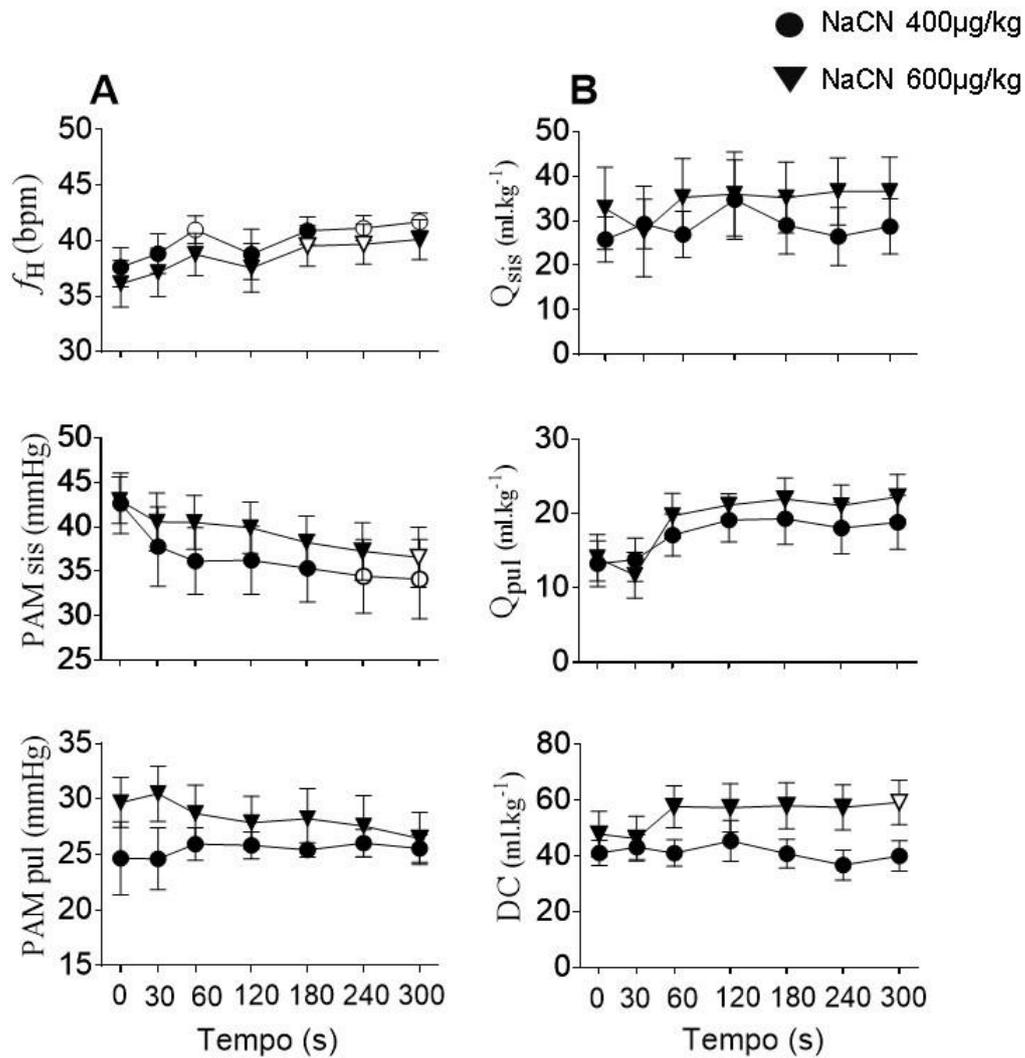


Figura 10: Efeito das doses de cianeto de sódio (NaCN) em parâmetros cardiovasculares de cascavéis descerebradas não anestesiadas. Os gráficos mostram os efeitos do NaCN 400µ/kg (círculos) e 600µ/kg (triângulos) na f_H (n=8), PAM sis (n=8), PAM pul (n=6) (A) e Q_{sis} (n=9), Q_{pul} (n=7) e DC (n=6) (B) ao longo de cinco minutos de resposta. Símbolos abertos (círculos e triângulos) indicam diferença estatística entre os parâmetros cardiovasculares em relação a valores basais. Não houve diferença entre as duas doses testadas.

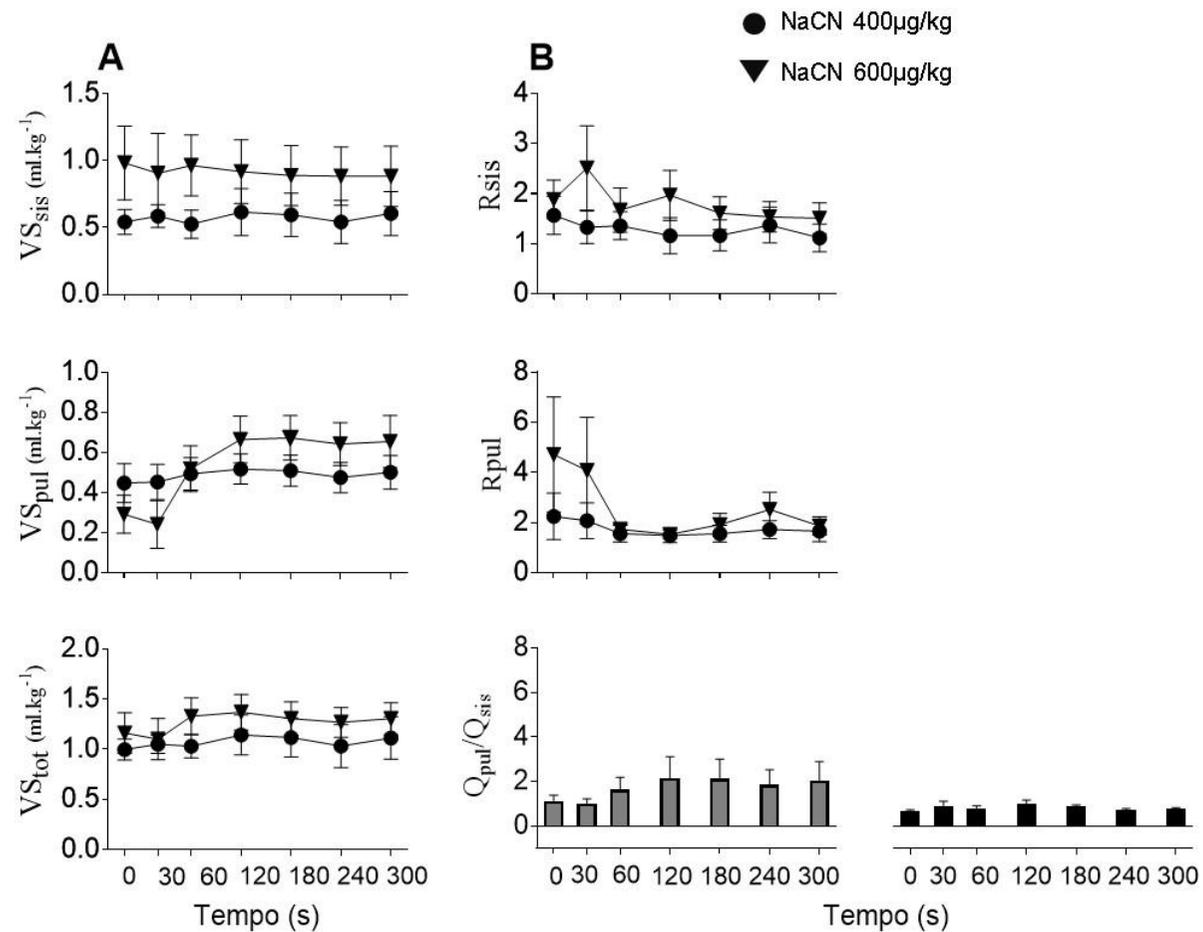


Figura 11: Efeito do NaCN nas variáveis cardiovasculares de animais decerebrados não anestesiados. Os gráficos mostram o resultado das injeções de NaCN 400µ/kg (círculos) e 600µ/kg (triângulos) no V_{Ssis} (n=9), V_{Spul} (n=7), V_{Stot} (n=6) (A) e R_{Ssis} (n=9), R_{Pul} (n=7) e *net shunt* (n=6) (B) ao longo de cinco minutos de resposta. Não houve diferença estatística entre os parâmetros cardiovasculares em relação a valores basais. Não houve diferença entre as duas doses testadas. Os dados são apresentados como média±E.P.M.

Tabela 5. Efeito das doses de NaCN 400µg/kg nos parâmetros cardiovasculares de cascavéis descerebradas

	NaCN 400µg/kg						
	0s	30s	60s	120s	180s	240s	300s
f_H (bpm)	37,6±1,8	38,8±1,7	41±1,2*	38,7±2,2	40,9±1,2	41,1±1,1*	41,7±0,8*
PAM sis (mmHg)	42,6±3,4	37,8±4,4	36,1±3,7	36,2±3,8	35,3±3,7	34,4±4,1	34,1±4,0*
PAM pul (mmHg)	24,6±3,3	24,6±2,7	25,9±1,4	25,8±1,2	25,4±0,6	26,0±1,2	25,5±1,2
Qsis (ml.kg⁻¹)	25,8±5,	29,3±5,5	26,9±5,1	34,7±8,9	29,0±6,5	26,5±6,5	28,7±6,2
Qpul (ml.kg⁻¹)	13,3±3,1	13,8±2,9	17,1±2,8	19,1±2,9	19,3±3,4	18,0±3,4	18,8±3,6
VSSis (ml.kg⁻¹)	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,6±0,2
VSpul (ml.kg⁻¹)	0,4±0,1	0,4±0,1	0,49±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,47±0,1	0,5±0,1
VStot (ml.kg⁻¹)	0,9±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,1±0,2	1,1±0,1	1,0±0,2	1,1±0,2
DC (ml.kg⁻¹)	41,1±4,5	43,2±4,4	41,0±4,7	45,4±7,3	40,8±5,1	36,8±5,4	40,0±5,4
Rsís (mmHg. ml. kg⁻¹)	1,6±0,4	1,3±0,3	1,3±0,2	1,1±0,3	1,1±0,3	1,3±0,3	1,1±0,2
Rpul (mmHg. ml. kg⁻¹)	2,2±0,9	2,1±0,7	1,5±0,3	1,4±0,2	1,5±0,3	1,7±0,3	1,6±0,4
Net shunt (ml.kg⁻¹)	1,0±0,3	0,9±0,2	1,5±0,6	2,0±1,0	2,0±0,9	1,7±0,7	2,0±0,9

Os dados estão apresentados como média±E.P.M. Os valores destacados com asteriscos (*) indicam diferença em relação a valores basais (0s).

Tabela 6: Efeito das doses de NaCN 600 μ /kg nos parâmetros cardiovasculares de cascavéis descerebradas

	NaCN 600 μ /kg						
	0s	30s	60s	120s	180s	240s	300s
f_H (bpm)	36,1 \pm 2,1	37,1 \pm 2,1	38,7 \pm 1,9	37,5 \pm 2,1	39,5 \pm 1,8*	39,7 \pm 1,8*	40,1 \pm 1,8
PAM sis (mmHg)	43,0 \pm 2,6	40,5 \pm 3,2	40,5 \pm 3,0	39,9 \pm 2,8	38,2 \pm 2,9	37,2 \pm 3,2*	36,5 \pm 3,3*
PAM pul (mmHg)	29,7 \pm 2,2	30,5 \pm 2,5	28,7 \pm 2,5	27,8 \pm 2,3	28,2 \pm 2,7	27,5 \pm 2,7	26,4 \pm 2,3*
Qsis (ml.kg⁻¹)	32,8 \pm 9,2	27,6 \pm 10	35,3 \pm 8,6	35,9 \pm 9,4	35,2 \pm 7,9	36,6 \pm 7,5	36,5 \pm 7,7
Qpul (ml.kg⁻¹)	14,0 \pm 3,1	11,7 \pm 3,0	19,7 \pm 3,0	21,1 \pm 1,5	22,0 \pm 2,8	21,0 \pm 2,7	22,2 \pm 3,0*
VSSis (ml.kg⁻¹)	0,98 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2
VSpul (ml.kg⁻¹)	0,29 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
VStot (ml.kg⁻¹)	1,1 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	1,3 \pm 0,18	1,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
DC (ml.kg⁻¹)	47,8 \pm 8,1	46,3 \pm 8,0	57,7 \pm 7	57,3 \pm 8,7	58,1 \pm 8,2	57,4 \pm 8,0	59,2 \pm 7,9*
Rsis (mmHg. ml. kg⁻¹)	1,9 \pm 0,3	2,5 \pm 0,8	1,6 \pm 0,4	1,9 \pm 0,5	1,6 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3
Rpul (mmHg. ml. kg⁻¹)	4,7 \pm 2,3	4,0 \pm 2,1	1,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,4	2,5 \pm 0,7	1,8 \pm 0,3
Net shunt (ml.kg⁻¹)	0,60 \pm 0,1	0,8 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3	0,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1

Os dados são expressos como média \pm E.P.M. Os astriscos (*) indicam diferença em relação a valores basais (0s).

5. DISCUSSÃO

5.1. Considerações sobre o modelo

Em animais descerebrados, a PAM sis, PAM pul e f_H foram similares a estudos anteriores com animais da mesma espécie intactos e recuperados da anestesia (FILOGONIO et al., 2016). O Qpul da cascavel descerebrada ($9,61 \pm 1,1$) foi menor que o encontrado por Taylor et al. (2009) em cascavéis intactas ($33,6 \pm 4,2$). Os VSsis e VSpul reportados aqui foram próximos aos de cascavéis intactas no estudo de Filogonio et al. (2016). A relação dos fluxos (*Net shunt*) das cascavéis descerebradas em repouso ($0,36 \pm 0,1$) foi também inferior ao encontrado em cascavéis intactas ($1,20 \pm 0,14$; TAYLOR et al., 2009). Uma crítica ao método consiste no fato de que alguns animais sofrem grande perda sanguínea na região cefálica durante o procedimento de descerebração, mesmo com a cauterização dos sangramentos. Embora os animais passem por um processo de recuperação de 24/48h após os procedimentos, não se sabe o quanto esses sangramentos afetam o funcionamento adequado do organismo.

As cascavéis descerebradas mantêm o SNA autônomo funcional. Durante a manobra de aumento do retorno venoso foi possível observar que os animais são capazes de manter as variáveis hemodinâmicas constantes. O protocolo de redução da perfusão na cabeça por sua vez, demonstrou que os animais são capazes de elevar a Pa e o DC para manter o fluxo sanguíneo adequado na região da cabeça. Ainda, durante o aquecimento, os animais descerebrados apresentaram elevações na f_H , reflexo possivelmente mediado pelo SNA e já demonstrado de maneira similar em outras espécies. A hipóxia causada pela injeção de NaCN resultou em respostas secundárias típicas encontradas em mamíferos após estimulação de quimiorreceptores periféricos.

Os reflexos causados pelos protocolos de TL, HL e aquecimento não foram observados em animais anestesiados, o que reitera a importância e funcionalidade do modelo de animal descerebrado e questiona os estudos que utilizam animais anestesiados durante a coleta de dados. Os animais descerebrados anestesiados apresentaram PAM sis basal mais baixa que animais descerebrados não anestesiados. A diminuição da PAM sis está de acordo com o observado em lagartos da espécie *Iguana iguana* em resposta ao anestésico isoflurano (MOSLEY et al., 2004). O isoflurano possui propriedades vasodilatadoras e afeta diretamente os leitos vasculares (DOURSOUT e CHELLY, 1988), causando como efeito direto a diminuição do DC e da f_H . A inobservância de alterações negativas na f_H e nos demais parâmetros fisiológicos basais pode indicar que o sistema cardiovascular esteja mantendo ajustes discretos para manutenção da homeostase cardíaca. O anestésico causa supressão significativa do mecanismo

barorreflexo na cascavel descerebrada, por isso a PAM sis permanece baixa durante o protocolo com anestesia. Além disso, o isoflurano pode causar efeitos adversos no nível de hormônios circulantes, afetar a sensibilidade de proteínas contráteis ao cálcio e também provocar efeitos no SNC (CONSTANTINIDES et al., 2011).

Anestésicos inaláveis são mais utilizados em camundongos em relação a anestésicos injetáveis (pentobarbital; combinação de ketamina/xilazina) pois possuem efeitos cardiodepressivos moderados (CONSTANTINIDES et al., 2011). Em répteis, os anestésicos inaláveis são também amplamente utilizados. Na fisiologia o uso de anestésicos muitas vezes se faz necessário em estudos que visam a obtenção de múltiplos parâmetros cardiovasculares (GALLI et al., 2007; TAYLOR et al., 2009). Como aqui observado, estes estudos também podem ter tido resultados alterados e as conclusões afetadas. Dessa maneira, diante da necessidade do uso de anestésicos para a coleta de variáveis hemodinâmicas, a preparação descerebrada representa uma alternativa. A utilização de animais descerebrados pode auxiliar o entendimento dos reflexos mediados pelo SNA e seu efeito no sistema cardiovascular na cascavel *Crotalus durissus* e possivelmente em outros representantes do grupo Squamata.

5.2. Aumento do retorno venoso - Levantamento da cauda (*Tail lift*)

Durante o protocolo de *TL*, a cauda do animal é verticalizada acima do restante do corpo, e pode causar aumento do retorno venoso e da resistência periférica. Uma consequência direta de um protocolo que aumenta drasticamente o retorno venoso seria o aumento do enchimento cardíaco e pré-carga, que geram elevação da força de contração através do mecanismo de Frank-Starling. Isso permite que o coração ejete o retorno venoso adicional e como consequência causaria aumento do V_Ssis, DC e a Pa (KLABUNDE, 2005). Tais alterações poderiam ser observadas durante o exercício físico, por exemplo. Os efeitos cardiovasculares do exercício em quelônios (KROSNIUNAS e HICKS, 2003), lagartos (FRAPPELL et al., 2002) e na cascavel *Crotalus durissus* (FILOGONIO et al., 2016) incluem aumento de Q_{pul} e f_H concomitantemente às elevações de DC, V_Ssis e PAM sis. Tais alterações são possivelmente resultado da diminuição do tônus vagal induzida pelo exercício físico (FILOGONIO et al., 2016). Diferentemente do que é observado durante o exercício físico, o protocolo *TL*, possivelmente, induziria a elevações do tônus vagal e redução do tônus simpático. Na cascavel descerebrada, a perturbação postural imposta durante *TL* não causou drásticas alterações no retorno venoso pois não foram observadas elevações no DC e no V_{Stot}. Além disso, os animais submetidos ao teste foram capazes de manter a f_H constante durante o protocolo.

O protocolo causou elevação das PAM sis e PAM pul. Apenas o fluxo para o circuito pulmonar aumentou durante o protocolo, mas não foram observadas alterações significativas na Rpul e Rsis. Quando os animais são recolocados na posição horizontal e a perturbação causada pelo TL chega ao fim, as PAM sis e PAM pul e o Qpul sofrem redução imediata. As cascavéis não enfrentam elevações drásticas de aumento de retorno venoso em seu habitat, como as serpentes arborícolas que se deslocam para baixo no substrato, no entanto, passam por desafios semelhantes quando precisam se inclinar em seu substrato, que não é retilíneo. Com isso, espera-se que elevações discretas no retorno venoso não causem alterações hemodinâmicas extremas no sistema cardiovascular desses animais, de modo que o deslocamento não seja dificultado. Não há testes semelhantes ao TL realizados em répteis na literatura, dessa maneira ainda não é possível estabelecer comparações. Isso demonstra a importância do estudo comparativo em um contexto ecofisiológico (integração entre fisiologia mecanicista e ecofisiologia) das espécies de serpentes brasileiras.

A magnitude e direção dos desvios intracardíacos em répteis são possivelmente, produto de alterações nas resistências dos circuitos sistêmico e pulmonar. Apesar da elevação no Qpul, não foram observadas alterações nas resistências. Além disso, esse aumento não foi suficiente para causar diminuição no *net shunt* D-E ou geração de *net shunt* E-D, indicando que a manutenção do *net shunt* é modulada e mantida frente a distúrbios hemodinâmicos. Na cascavel *Crotalus durissus* (FILOGONIO et al., 2016) e outras espécies de ectotermos (FRAPPELL et al. 2002; KROSNIUNAS e HICKS, 2003) o aumento do Qpul e o *net shunt* E-D estão relacionados ao aumento das taxas metabólicas durante o exercício. A manobra TL indica que os animais descerebrados mantêm compensações cardiovasculares ao aumento do retorno venoso, caso contrário as variáveis estudadas seriam profundamente afetadas pelo teste.

Ao contrário do observado em animais não anestesiados, a anestesia causou elevações no DC e Qpul. As PAM sis e PAM pul também se elevaram em animais anestesiados, no entanto, a PAM sis basal foi 39% menor em animais anestesiados. A PAM sis durante a manobra também foi menor (41%) em animais anestesiados. Dessa maneira, o isoflurano atenua a PAM sis. Além disso, em alguns animais não foi possível observar respostas claras aos protocolos, o que dificultou as análises.

5.3. Redução da perfusão da cabeça - Levantamento da cabeça (*Head lift*)

Quando um indivíduo bípede assume uma posição ortostática, a tendência é a ocorrência de acúmulo de sangue na porção inferior do corpo e conseqüente diminuição de retorno venoso, DC e por sua vez diminuição de Pa. Algo parecido deve ocorrer quando há elevação da parte

anterior do corpo em serpentes, como para a manutenção da posição de bote ou exploração do ambiente (e.g LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978). Durante a duração da manobra *HL*, não foi possível observar quedas significativas na PAM sis e aumento da f_H , como descrito em protocolos de *tilt* (ARMELIN et al., 2014; TROIANO et al., 2018). Ao invés disso, houve rápido aumento da PAM sis, enquanto a f_H se manteve sem alterações significativas. Poderia se argumentar que a falta de alterações na f_H seria decorrente do rompimento da alça barorreflexa durante o procedimento de descerebração, entretanto capítulo II dessa dissertação deixou indícios claros de que animais descerebrados mantém respostas barorreflexas similares a animais intactos.

No protocolo de *HL* utilizado no presente estudo, apenas a porção rostral ao coração é verticalizada, enquanto que a porção inferior do corpo permaneceu na posição horizontal. Isso pode causar efeitos cardiovasculares menos proeminentes do que os encontrados em protocolos de *full tilt*. Nestes, o acúmulo de sangue nas partes inferiores do corpo somados aos efeitos da verticalização da cabeça, podem potencializar os efeitos das alterações de postura (SEYMOUR e ARNDT, 2004).

Em duas espécies de répteis com hábitos arborícolas, a serpente *Phyton molurus* (ARMELIN et al., 2014) e o lagarto *Iguana iguana* (TROIANO et al., 2018) foi observado que a regulação da Pa durante o ortostatismo é mantida principalmente através de alterações da f_H , que por sua vez, são resultado da redução no tônus vagal. Em serpentes terrestres da espécie *Notechis scutatus*, a taquicardia ortostática não parece ser de grande importância para a recuperação da Pa (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978). Estes autores observaram que nem todos os indivíduos da espécie *Notechis scutatus* submetidos a *head up tilt* apresentaram taquicardia, mas apesar disso conseguiram recuperar a Pa a níveis basais. Sendo assim, alterações da RP parecem ser mais importantes para a manutenção da Pa mediante a eventos de estresse gravitacional nessa espécie (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978). De maneira semelhante, na cascavel *Crotalus durissus*, a f_H parece não ser tão importante para o controle da Pa durante o *HL*. Isso poderia indicar que a RP total é o fator mais importante para o reestabelecimento da Pa nessa espécie, no entanto, o tempo que os animais permaneceram em *HL* não foi suficiente para observarmos alterações significativas nas Rsis e Rpul. Isso pode indicar que alterações no tônus venoso são relevantes nesse ajuste.

Não foram observadas mudanças significativas na direção dos desvios intracardíacos. Durante a posição horizontal e maior parte dos protocolos, o *net shunt* permaneceu D-E, indicando que o fluxo sistêmico é maior que o fluxo pulmonar. Durante o *head up tilt*, a serpente arborícola *Elaphe obsoleta* direciona o fluxo sanguíneo para a circulação pulmonar, dessa

maneira o *net shunt* E-D aumenta, possivelmente para aumentar a oxigenação do sangue quando a circulação do encéfalo está em risco (LILLYWHITE e GALLAGHER, 1985). Dessa maneira, não foi possível observar semelhança nas alterações de fluxo e do *net shunt* durante o *head lift* realizado no presente estudo e o *head up tilt* em *Elaphe obsoleta*.

Quando os animais são recolocados na posição horizontal, os parâmetros retornam próximo a valores basais. Ocorre diminuição da PAM sis que aumentou durante *HL*. Além disso, o VSpul sofre diminuição significativa. O DC por sua vez, não diminuiu, possível reflexo do aumento da f_H após o retorno à posição horizontal. Não foram observadas alterações nas Rsis e Rpul ao término de *HL*. Independente dos mecanismos envolvidos na elevação da PAM sis, discutidos brevemente aqui, esta é uma importante compensação à manobra de *HL*. A descerebração portanto não impediu compensações para reestabelecer a perfusão na cabeça.

Animais anestesiados não apresentaram as mesmas compensações que animais não anestesiados à alteração postural. As PAM sis e PAM pul PAM sis não aumentaram durante a manobra. Ao contrário do observado em animais não anestesiados, o VSsis e o Qsis se elevaram durante o protocolo. Não observamos alterações no Qpul, enquanto o DC aumentou durante o protocolo. O VSpul de animais não anestesiados é de cerca de 489% maior que animais sob efeito da anestesia indicando que seu valor, no animal não anestesiado, é mantido com ação autonômica. Animais anestesiados não apresentaram alterações no *net shunt* D-E.

Os animais anestesiados falharam em gerar compensações para aumentar a PAM sis durante o tempo em que a cabeça do animal está verticalizada. De maneira similar ao observado no protocolo de *TL*, as alterações cardiovasculares não parecem ter uma direção clara em animais anestesiados, possivelmente refletindo a depressão causada pelo anestésico no sistema cardiovascular desses animais.

5.4. Aquecimento superficial

O protocolo de aquecimento superficial demonstra a presença de reflexos cardiovasculares para ajustes térmicos. Os vertebrados ectotérmicos, como a cascavel, dependem de fontes externas para regular sua temperatura e funções biológicas e dessa maneira, realizam a termorregulação comportamental. A eficácia da termorregulação comportamental é associada não somente a fontes externas de calor, mas também depende diretamente de alterações de diversos parâmetros cardiovasculares durante os processos de aquecimento e resfriamento (BARTHOLOMEW e TUCKER, 1963; BAKER et al., 1972).

Em répteis, a qualquer temperatura corporal a f_H é maior durante o aquecimento do que durante o resfriamento (e.g SEEBACHER e FRANKLIN, 2001). Esse fenômeno é conhecido como

histerese da f_H e permite que os animais se aqueçam de maneira mais rápida do que se resfriam. Tais características foram observadas em diversas espécies de répteis, incluindo tartarugas, lagartos e crocodilianos (e.g WEATHERS e WHITE, 1971; SEEBACHER e FRANKLIN, 2004; SMITH, 1976). Durante o aquecimento, ocorrem elevações no DC e da circulação periférica, através do aumento da f_H , o que por sua vez, facilita o aumento da transferência de calor entre o animal e o ambiente (SEEBACHER, 2000; SEEBACHER e FRANKLIN, 2005). Em contrapartida, durante o resfriamento, a f_H diminui, o que reduz a troca de calor entre o centro do corpo e a periferia e retarda o resfriamento (FRANKLIN e SEEBACHER, 2003). Dessa maneira, esses animais podem controlar o índice de troca de calor com o ambiente mantendo a temperatura corporal sempre próxima de valores ideais (SEEBACHER e FRANKLIN, 2004). As alterações fisiológicas causadas pelo aquecimento podem ser divididas em resposta rápida e lenta. A resposta rápida da f_H ocorre em segundos após a exposição a uma fonte de calor, e pode ser mediada por um arco reflexo neural (SEEBACHER e FRANKLIN, 2005). O aquecimento gerado pela lâmpada cerâmica causou aumento imediato da f_H na cascavel descerebrada, no entanto não observamos elevações no DC e do $VStot$ no momento do pico do aquecimento.

Existem poucos estudos da histerese da f_H que medem simultaneamente as PAM sis e/ou PAM pul. Em tartarugas da espécie *Trachemys scripta* submetidas a aquecimento com lâmpada cerâmica, Galli et al. (2004) observou que a Pa sistêmica não se alterou durante o aquecimento e dessa maneira sugeriu que o barorreflexo é um importante fator envolvido na histerese. Em animais intactos da espécie *Crotalus durissus*, por sua vez o aumento da temperatura corporal de 15°C para 30°C causa um aumento de 69,23% na PAM sis (FILOGONIO et al., 2016). Na cascavel descerebrada, embora a temperatura corporal tenha sofrido apenas um pequeno aumento (4%), ambas as PAM sis e PAM pul aumentaram. Dessa maneira a elevação do DC é o fator determinante para a elevação das pressões arteriais durante o aquecimento.

Os circuitos, sistêmico e pulmonar não sofreram aumento dos fluxos durante o aquecimento. Elevações nos Q_{pul} e Q_{sis} concomitante ao aumento da f_H foram observados em tartarugas durante o aquecimento (GALLI et al., 2004). Em cascavéis, Wang et al. (1998) observou aumento do Q_{pul} em proporção ao aumento da temperatura corporal a fim de elevar a captação de O_2 para o sistema cardiovascular, isso é acompanhado de diminuição do *net shunt* D-E. Nas cascavéis descerebradas, o aquecimento local não resultou em grandes alterações da temperatura corporal ($\sim 1^\circ C$) e conseqüentemente, os Q_{sis} e Q_{pul} não se elevaram. A R_{sis} diminuiu durante o aquecimento enquanto o *net shunt* se mantém D-E, mas sofre um pequeno aumento, o que significa maior recirculação de fração do DC no circuito sistêmico durante o aquecimento. Filogonio et al. (2016) por sua vez, não observou alterações significativas no *net*

shunt D-E em cascavéis intactas em repouso em resposta às alterações da temperatura (15, 20, 30°C), no entanto Leite et al. (2013) notou que a redução da temperatura em cascavéis intactas, causa diminuição de ambos os fluxos Q_{pul} e Q_{sis} , e aumento do *net shunt* D-E. Esse padrão observado por Leite et al. (2013) difere do que encontramos na cascavel descerebrada, que elevou o *net shunt* D-E em resposta ao aquecimento. Por outro lado, em quelônios o aquecimento gera *net shunt* D-E o que é atribuído a vasodilatação local dos vasos periféricos (HICKS e KROSNIUNAS, 1996). Dessa maneira, o presente estudo corrobora o achado de Hicks e Krosniunas (1996) de que o *net-shunt* D-E pode estar relacionado ao aquecimento, a fim de aumentar sua eficiência. Pouco se conhece sobre o papel funcional dos desvios intracardíacos durante o aquecimento e demais alterações fisiológicas. Experimentos a longo prazo em cascavéis, demonstraram que a incapacidade de realizar *net shunt* D-E não causa prejuízos significativos em ajustes metabólicos, eficiência na digestão ou na taxa de crescimento dos animais (LEITE et al., 2013). Dessa maneira, mais estudos são necessários para o entendimento do papel dos desvios intracardíacos no aquecimento nesses animais.

Em lagartos, as alterações rápidas da f_H e DC são controladas em parte pelo SNA (SEEBACHER e GRIGG, 2001) e principalmente por prostaglandinas (SEEBACHER e FRANKLIN, 2003). Em crocodilos (*Crocodylus porosus*) por sua vez, o SNA parece ter papel mais relevante para a histerese do que em relação a substâncias locais vasoativas como as prostaglandinas e o óxido nítrico (SEEBACHER e FRANKLIN, 2004). A vasodilatação/vasoconstrição causadas por essas substâncias podem ser importantes fatores no controle do fluxo sanguíneo e do DC (ALTIMIRAS et al., 1998). Independente da predominância do mecanismo envolvido no controle da f_H para o aquecimento, a descerebração não parece ter removido a habilidade de controle dos parâmetros cardiovasculares frente ao aumento da temperatura, sejam eles autonômicos ou humorais.

Há indícios de que as áreas encefálicas e vias (hipotálamo, área pré-óptica) envolvidas na termorregulação de mamíferos sejam as mesmas nos demais vertebrados ectotérmicos, existem poucas evidências experimentais para tanto (SEEBACHER, 2009). Experimentos envolvendo lesões no hipotálamo (área pré-óptica) levam a crer que essas áreas também são importantes para termorregulação em ectotérmicos (BICEGO et al., 2007). Contudo, os dados do presente experimento indicam que apesar da possível ocorrência de modulações em áreas superiores, tais áreas não inviabilizam os reflexos autonômicos para ajustes hemodinâmicos para termorregulação.

A anestesia suprimiu todas as respostas cardiovasculares ao aquecimento. Em animais anestesiados não houve aumento da f_H em resposta ao aquecimento, o que indica que o

anestésico tem efeito depressor no SNA dos animais descerebrados. A anestesia causou diminuição da PAM sis, PAM pul e Rsis basal. Além disso, nos animais anestesiados, o *net shunt* D-E não aumenta durante o aquecimento, como observado em animais não anestesiados.

5.5. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos de O₂

De maneira geral, durante episódios de hipóxia os vertebrados garantem o suprimento adequado de oxigênio aos tecidos por meio de ajustes ventilatórios. Esses ajustes são desencadeados por quimiorreceptores periféricos de O₂ e geram uma série de alterações cardiovasculares. O NaCN (cianeto de sódio) tem sido utilizado em estudos do reflexo quimiorreceptor e respostas ventilatórias em vertebrados ectotérmicos (eg. MCKENZIE e TAYLOR, 1996; WANG et al., 2004). Ele atua estimulando a atividade dos quimiorreceptores de O₂ bloqueando a fosforilação oxidativa e transporte de elétrons nas mitocôndrias (BURLESON et al., 1992).

Os mamíferos representam o grupo de vertebrados que mais se sabe a respeito dos efeitos da estimulação dos quimiorreceptores. Este estímulo é complexo e composto por respostas cardiovasculares primárias e secundárias que variam de acordo com a natureza e intensidade do estímulo. As respostas primárias evocadas por eventos de hipóxia são bradicardia e vasoconstrição, sendo a primeira resultante do aumento da atividade parassimpática e a última resultante do aumento da atividade simpática (PATON et al., 2005). A resposta secundária por sua vez é caracterizada por taquicardia e vasodilatação, resultante de um *feedback* dos receptores de estiramento pulmonar em resposta ao aumento do reflexo ventilatório, em mamíferos e anfíbios (PATON et al., 2005; TAYLOR et al., 2010). Estes receptores são também encontrados em répteis (TAYLOR et al., 2010). Em serpentes aquáticas e terrestres o aumento da atividade ventilatória resulta em taquicardia, possivelmente devido ao estímulo desses receptores pulmonares, através de diminuição na atividade vagal (JACOB, 1980). Na cascavel, observa-se taquicardia e diminuição das PAM sis e PAM pul em resposta ao NaCN. Isso está de acordo com a resposta secundária causada pelo aumento do reflexo ventilatório. Durante o protocolo de quimiorreflexo, os animais ventilaram livremente, sem auxílio do tubo endotraqueal, e, portanto, ficaram livres para aumentar os reflexos ventilatórios após as injeções. Observou-se que os animais aumentavam o esforço ventilatório após as injeções de NaCN, no entanto, não foram realizadas medidas ventilatórias. Dessa maneira, não há dados que confirmem a suposição de que a taquicardia seria um reflexo secundário devido ao estiramento de receptores pulmonares.

Os estímulos dos quimiorreceptores (hipóxia) e seus efeitos entre grupos próximos de vertebrados ectotérmicos são muito variáveis (SMATRESK, 1990). Além disso, a distinção entre as respostas primárias e secundárias, bem como a identificação de outros receptores (receptores de estiramento pulmonar, barorreceptores) envolvidos na resposta pode ser muito complexa (SMATRESK, 1990). Estudos sobre o quimiorreflexo são raros em répteis, o que dificultou a comparação dos dados obtidos com a literatura existente.

As injeções de NaCN (400 μ g/kg) causaram diminuição do *net shunt* D-E, que progrediu para o desenvolvimento do *net shunt* E-D a partir de 60s após as injeções. A hipóxia causou aumento de Qpul em quelônios (BURGGREN et al., 1977) e peixes (FRITSCHÉ et al., 1993). Tais alterações podem estar relacionadas à diminuição do *net shunt* D-E, que se caracteriza por reduzir a tolerância a hipóxia e capacidade de transporte de O₂ (WANG e HICKS, 1996). Dessa maneira, o desenvolvimento do *net shunt* E-D em resposta às injeções de NaCN pode ser um mecanismo compensatório para aumentar a oxigenação do sangue. O *net shunt* E-D (NaCN 400 μ g/kg) no entanto, não foi acompanhado de alterações significativas nas Rsis e Rpul. Além disso, embora o *net shunt* E-D ocorra, não foi possível observar aumento significativo de Qpul, bem como alterações de Qsis após as injeções (400 e 600 μ g/kg). O DC aumenta durante 60, 240 e 300s após a injeção de 600 μ g/kg. Tal alteração é resultado do aumento da f_H durante a estimulação simpática, pois o VStot não se altera.

As injeções de NaCN atestaram que a descerebração não removeu a capacidade na geração de reflexos cardiovasculares em resposta a estimulação dos quimiorreceptores em cascavéis. A descerebração também não prejudica respostas à estimulação de quimiorreceptores em ratos descerebrados (ABDALA et al., 2009) e anfíbios (WANG et al., 2004). De maneira semelhante, a metodologia utilizada no presente estudo é eficaz na manutenção de áreas de integração cardiovascular e respiratória na região do tronco encefálico, responsáveis pelo reflexo quimiorreceptor.

7. CONCLUSÕES

- a) Os animais descerebrados mantêm respostas autonômicas em resposta às alterações de retorno venoso, perfusão da cabeça, aquecimento e hipóxia;
- b) A preparação descerebrada é uma possível e promissora alternativa ao uso de anestésicos em estudos que visam trabalhar com hipóteses que dependam da integridade da função autonômica.
- c) A anestesia com isoflurano compromete reflexos autonômicos importantes e prejudicam a manutenção das condições hemodinâmicas no repouso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA, A. P. L.; RYBAK, I. A.; SMITH, J. C.; PATON, J. F. R. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem–spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **J Physiol.**, v. 587, n.14, p. 3539–3559, jun. 2009.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012.

ALMEIDA, T. R.; AL-IZKI, S.; DENTON, M. E.; KIRKWOOD, P. A. Patterns of expiratory and inspiratory activation for thoracic motoneurons in the anaesthetized and the decerebrate rat. **J Physiol.**, v. 588, p. 2707–2729, jun. 2010.

ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; ABE, A. S.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H. Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake *Python molurus*. **J. Comp. Physiol.**, v.184B, p. 903–912, jul. 2014.

BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews**, v. 60.2., p. 121-162, out. 1985.

BAKER, L. A.; WEATHERS, W. W.; WHITE, F. N. Temperature induced peripheral blood flow changes in lizards. **J. Comp. Physiol.**, v. 80, p. 313- 323, set. 1972.

BARRET, D. J.; TAYLOR, E. W. Spontaneous efferent activity in branches of the vagus nerve controlling heart rate and ventilation in the dogfish. **J Exp Biol.**, v. 117, p. 433–448, jan. 1985.

BARTHOLOMEW, G. A.; TUCKER, V. A. Control of changes in body temperature, metabolism, and circulation by the agamid lizard, *Amphibolurus barbatus*. **Physiol. Zool.**, 36, 199-218, jul. 1963.

BAZETT, H.; PENFIELD, W. A. A study of the Sherrington decerebrate animal in the chronic as well as the acute condition. **Brain.**, v. 45., p. 185-265. 1922.

BENNET, R. A. A Review of Anesthesia and Chemical Restraint in Reptiles. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine.**, v. 22, p. 282-303, set. 1991.

BERGER, P. J.; GIBBINS, I. L.; HARDS, D. K.; CROSBY, L. J. The distribution and ultrastructure of sensory elements in the baroreceptor region of the truncus arteriosus of the lizard *Trachydosaurus rugosus*. **Cell Tissue Res**, v. 226, p. 389-406, set. 1982.

BERGER, P. J.; EVANS, B. K.; SMITH, D. G. Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard *Trachydosaurus rugosus*. **J. Exp. Biol.**, v. 86, p. 197-209, ago. 1980.

BICEGO, K. C.; BARROS, R. C.H.; BRANCO, L. G. S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A v. 147, p 616–639, jun. 2007.

BLESSING, W. W. Depressor neurons in rabbit caudal medulla act via GABA receptors in rostral medulla. **Am J Physiol (Heart Circ Physiol 23)**, v. 254, n. 4, p. H686-92, abr. 1988.

BONATH, K. Halothane inhalation anaesthesia in reptiles and its clinical control. **Internacional Zoo Yearbook**, v. 19, p. 112-125, jan. 1979.

BURGGREN, W. W. The pulmonary circulation of the chelonian reptile: morphology, haemodynamics and pharmacology. **Journal of Comparative Physiology**, v. B 116, p. 303-323, jan. 1977.

BURGGREN, W. W. Form and Function in Reptilian Circulations. **Amer. Zool.**, v. 27, p. 5-19, 1987.

BURLESON, M. L.; SMATRESK, N. J.; MILSOM, W. K. Afferent inputs associated with cardioventilatory control in fish. **Fish physiology**, v. 12 (B), p. 389-426, 1992.

CHAI, C. Y.; WANG, S. C. Integration of sympathetic cardiovascular mechanisms in medulla oblongata of the cat. **American Journal of Physiology**, v. 215, p. 1310-5, dez. 1968.

CONSTANTINIDES, C.; MEAN, R.; JANSSEN B. J. Effects of Isoflurane Anesthesia on the Cardiovascular Function of the C57BL/6 Mouse. **ILAR J.**, v. 52, p. e21–e31, nov. 2011.

CUBAS, Z. S. SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo, Roca, 2006.

DAMPNEY, R. A. L. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Adv Physiol Educ.**, v. 20, p. 283-296, maio. 2016.

DOBSON, K. L.; HARRIS, J. A detailed surgical method for mechanical decerebration of the rat. **Exp Physiol.**, v. 97, p. 693–698, mar. 2012.

DONALD, J. A.; O'SHEA, J. E.; LILLYWHITE, H. B. Somatostatin and the innervation of the heart of the ratsnake, *Elaphe obsoleta*. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. R1001- R100, maio. 1990.

DOURSOUT, M. F.; CHELLY, J. E. Effects of basal anaesthesia on cardiac function. **Br. J. Anaesth.**, v. 60, p. 119S-122S, 1988.

EME, J.; GWALTHNEY, J.; BLANK, J. M.; OWERKOWICZ, T.; BARRON, G.; HICKS, J. W. Surgical removal of right-to-left cardiac shunt in the American alligator (*Alligator mississippiensis*) causes ventricular enlargement but does not alter apnoea or metabolism during diving. **J Exp Biol.**, v. 212, p. 3553–3563, jul. 2009.

EME, J.; GWALTHNEY, J.; OWERKOWICZ, T.; BLANK, J. M.; HICKS, J. W. Turning crocodylian hearts into bird hearts: growth rates are similar for alligators with and without right-to-left cardiac shunt. **J Exp Biol.**, v. 213, p. 2673–2680, maio. 2010.

FILOGONIO, R.; TAYLOR, E. W.; CAREIRA, L. B. T.; LEITE, G. S. P. C.; ABE, A. S.; LEITE, C. A. C. Systemic Blood Flow Relations in Conscious South American Rattlesnakes. **South American Journal of Herpetology.**, v. 9(3), p.171-176, dez. 2014.

FILOGONIO, R.; WANG, T.; TAYLOR, E. W.; ABE, A. S.; LEITE, C. A. C. Vagal tone regulates cardiac shunts during activity and at low temperatures in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. **J Comp Physiol B.**, v. 186 (8), p. 1059-1066, dez. 2016.

FORSLID, A.; INGVAR, M.; ROSEN, I.; INGVAR, D. H. Carbon dioxide narcosis: influence of short-term high concentration carbon dioxide inhalation on EEG and cortical evoked responses in the rat. **Acta Physiol Scand.**, v. 127 (3), p. 281-287, jul. 1986.

FRANKLIN, C. E.; SEEBACHER, F. The effect of heat transfer mode on heart rate responses and hysteresis during heating and cooling in the estuarine crocodile *Crocodylus porosus*. **J Exp Biol.**, v. 206, p. 1143-1151, jan. 2003.

FRAPPELL, P. B.; SCHULTZ, T.; CHRISTIAN, K. Oxygen transfer during aerobic exercise in a varanid lizard *Varanus mertensi* is limited by the circulation. **J Exp Biol.**, v. 205, p. 2725-2736, 2002.

FRITSCH, R.; AXELSSON, M.; FRANKLIN, C. E.; GRIGG, G. C.; HOLMGREN, S.; NILSSON, S. Respiratory and cardiovascular responses to hypoxia in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. **Respir. Physiol.**, v. 94, p. 173–187, jun. 1993.

GALLI, G. L. J.; SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; TAYLOR, E. W.; WANG, T. The adrenergic regulation of the cardiovascular system in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. **Comparative Biochemistry and Physiology.**, v. 148, p. 510-520, jun. 2007.

GALLI, G.; SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; TAYLOR, E. W.; WANG, T. The role of nitric oxide in the regulation of the systemic and pulmonary vasculature of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **J Comp Physiol B.**, v. 175(3), p.201-8, abr. 2005.

GENTLE, M. J. Pain-related behaviour following sodium urate arthritis is expressed in decerebrate chickens. **Physiol Behav.**, v. 62, n. 3, p. 581–584, set. 1997.

GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature reviews.** v.7, n.5, p 335-45, maio. 2016.

HAGENSEN, M. K., ABE, A. S. e WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 156., p. 458-462, ago. 2010.

HAYASHI, N. Exercise pressor reflex in decerebrate and anesthetized rats. **Am J Physiol-Heart C.**, v. 284, p. H2026–33, jul. 2003.

HEDBERG, A.; NILSSON, S. Vago-sympathetic innervation of the heart of the puff-adder, *Bitis arietans*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 53C, p. 3-8, 1975.

HICKS, J. W. The physiological and evolutionary significance of cardiovascular shunting patterns in reptiles. **News Physiol. Sci.**, v. 17, p. 241-245, dez. 2002.

HICKS, J. W.; KROSNIUNAS, E. Physiological states and intracardiac shunting in non-crocodilian reptiles. **Exp Biol Online.**, v. 1, p. 35–57, out. 1996.

HICKS, J. W.; WANG, T. Functional Role of Cardiac Shunts in Reptiles. **The Journal of Experimental Zoology.**, v. 275, p. 204-216, 1996.

HOHNKE, L. A. Regulation of arterial blood pressure in the common green iguana. **American Journal of physiology.**, v. 228, n. 2, fev. 1975.

JACOB, J. S. Heart Rate-Ventilatory Response of Seven Terrestrial Species of North American Snakes. **Herpetologica.**, v. 36 (4), p. 326-335, dez. 1980.

JENSEN, B.; ABE, A. S.; ANDRADE, D. V.; NYENGAARD, J. R.; WANG, T. The Heart of the South American Rattlesnake, *Crotalus durissus*. **Journal of morphology.**, v. 271, p.1066–1077, maio. 2010.

JENSEN, B.; MOORMAN, A. F. M.; WANG, T. Structure and function of the hearts of lizards and snakes. **Biological Reviews.**, v. 89, p. 302-336, maio. 2014.

JENSEN, B.; VAN DER BERG, G.; VAN DEN DOEL, R.; OOSTRA, R-J.; WANG, T.; MOORMAN, A. F. M. Development of the Hearts of Lizards and Snakes and Perspectives to Cardiac Evolution. **PLoS ONE.**, v. 8(6), p. e6365, jun. 2013.

KARDONG, K.V. **Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução**. Sétima edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

KIRSTEN, E. B.; JOHN, W. M. ST. A Feline Decerebration Technique with Low Mortality and Long-Term Homeostasis. **Elsevier North-Holland, Inc.**, v. 1, p. 263-268, 1978.

KLABUNDE, R. E. **Cardiovascular physiology concepts**. Lippincot Williams & Wilkins. ed. 2nd. p. 59-89, 2005.

KNIFFKI, K. D.; SCHOMBURG, E. D.; STEFFENS, H. Effects from fine muscle and cutaneous afferents on spinal locomotion in cats. **J Physiol.**, v. 319, p. 543–554, fev. 1981.

KOGO, N.; PERRY, S. F.; REMMERS, J. E. Neural organization of the ventilatory activity of the frog, *Rana catesbeiana*. Part II. **J. Neurobiol.**, v. 25, p.1080–94, set. 1994.

KROSNUNAS, E. H; HICKS, J. W. Cardiac output and shunt during voluntary activity at different temperatures in the turtle, *Trachemys scripta*. **Physiol Biochem Zool.**, v.76, p. 679-694, set/out. 2003.

KUMADA, M.; TERUIT, N.; KUWAKI, T. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. **Progress in neurobiology.**, v. 35, p. 331-361, mar. 1990.

LEE, J. S.; MORROW, D.; ANDRESEN, M. C.; CHANG, K. S. Isoflurane Depresses Baroreflex Control of Heart Rate in Decerebrate Rats. **Anesthesiology.**, v. 96, p. 1214–22, maio. 2002.

LEITE, C. A. C.; TAYLOR, E. W.; WANG, T.; ABE, A. S; ANDRADE, D. O. V. Ablation of the ability to control the right-to-left cardiac shunt does not affect oxygen uptake, specific dynamic action or growth in the rattlesnake *Crotalus durissus*. **J Exp Biol.**, v. 216, p.1881–1889, jan. 2013.

LEITE, C. A. C.; WANG, T.; TAYLOR, E. W.; ABE, A. S.; LEITE, G. S. P. C.; ANDRADE, D. O. V. Loss of the ability to control R–L shunt does not influence the metabolic responses to temperature change or long-term fasting in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. **Physiol Biochem Zool.**, v. 87, p.568–575, jul/ago. 2014.

LILLYWHITE, H. B.; ALBERT, J. S.; COLEMAN, M. S.; SEYMOUR, R. S. Gravity and the Evolution of Cardiopulmonary Morphology in Snakes. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v.161(2), p. 230–242, fev. 2012.

LILLYWHITE, H. B.; DONALD, J. A. Neural regulation of arterial blood pressure in snakes. **Physiol. Zool.**, v. 67, n. 6, p.1260–1283, nov/dez. 1994.

LILLYWHITE, H. B.; GALLAGHER, K. P. Hemodynamic adjustments to head up posture in the partly arboreal snake, *Elaphe obsoleta*. **J. Exp. Zool.**, v. 235., p. 325-334, set. 1985.

LILLYWHITE, H. B.; POUGH, F. H. Control of arterial pressure in aquatic sea snakes. **Am J Physiol.**, v. 244, p. R66–R73, 1983.

LILLYWHITE, H. B.; SEYMOUR, R. S. Regulation of arterial blood pressure in Australian tiger snakes. **J. Exp. Biol.**, v 75, p. 65-79, out. 1978.

LILLYWHITE, H. B.; SMITH, H. L. Haemodynamic responses to haemorrhage in the snake, *Elaphe obsoleta obsoleta*. **J. Exp. Biol.**, p. 275-283, jan. 1981.

LIU, J. C. Tonic inhibition of thermoregulation in the decerebrate monkey (*Saimiri sciureus*). **Experimental neurology.**, v. 64. p. 632-648, dez.1978.

MCKENZIE, D. J.; TAYLOR, E. W. Cardioventilatory responses to hypoxia and NaCN in the neotenus axolotl. **Respiration Physiology.**, v.106, p. 255-262, set. 1996.

MILSOM, W. K. Central control of air breathing in fishes. **Acta Histochem.**, v. 120, p. 691-700, out. 2018.

MILSOM, W. K. Adaptive trends in respiratory control: a comparative perspective. **Am J Physiol-Reg I.**, v. 299, p. R1–R10, jul. 2010a.

MILSOM, W. K. The phylogeny of central chemoreception. **Resp Physiol & Neurobiology.**, v. 173, p. 195–200, out. 2010b.

MOSLEY, C.A; DYSON, D.; SMITH, D. A. The cardiovascular dose-response effects of isoflurane alone and combined with butorphanol in the green iguana (*Iguana iguana*). **Vet Anaesth Analg.**, v. 31, n.1, p. 64-72, jan. 2004.

NAKANISHI, S. T.; WHELAN, P. J. A decerebrate adult mouse model for examining the sensorimotor control of locomotion. **J Neurophysiol.**, v. 107, p 500–515, out. 2011

NILSSON, S. **Autonomic nerve function in vertebrates**. Zoophysiology. Vol. 13. Springer, Berlin. p. 129-132, 1983.

PATON, J. F. R.; BOSCAN, P.; PICKERING, A. E.; NALIVAIKO, E. The yin and yang of cardiac autonomic control: Vago-sympathetic interactions revisited. **Brain Research Reviews.**, v. 49, p. 555– 565, abr. 2005.

PICKERING, A. E. e PATON, J. F. R. A decerebrate, artificially-perfused in situ preparation of rat: Utility for the study of autonomic and nociceptive processing. **Journal of Neuroscience Methods.**, v. 115., p. 260–271, jan. 2006.

POLLOCK, L. J.; DAVIS, L. The reflex activities of a decerebrate animal. **J Comp Neural.**, v. 50, p. 377-411, 1930.

POTERACK, K. A.; KAMPINE, J. P.; SCHEMLING W. T. Effects of isoflurane, midazolam, and etomidate on cardiovascular responses to stimulation of central nervous system pressor sites in chronically instrumented cats. **Anesth Analg.**, v.73, p.64–75, jul.1991.

PRITZ. M. B.; NORTHCUTT, R. G. Anatomical evidence for an Ascending Somatosensory Pathway to the Telencephalon in Crocodiles, *Caiman crocodilus*. **Ex. Brain Res.**, v. 40, p, 342-345, out. 1980.

REID, S. G.; SUNDIN, L. I.; FLORINDO, L. H.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Effects of afferent input on the breathing pattern continuum in the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Resp Physiol Neurobi.**, v. 136, p. 39–53, fev. 2003.

ROGERS, D.C. The Structure of the Carotid Bifurcation in the Lizards *Tiliqua occipitalis* and *Trachysaurus rugosus*. **J. Morph.**, v. 122, p. 115-130, jun. 1967.

SAPRU, H. N.; KRIEGER, A. J. Cardiovascular and respiratory effects of some anesthetics in the decerebrate rat. **European Journal of Pharmacology.**, v.53, p. 151-158, set.1979.

SAPRU, H. N.; KRIEGER, A. J. Procedure for the Decerebration of the Rat. **Brain Research Bulletin.**, v. 3, p. 675-679, nov. 1978.

SEEBACHER, F. Heat transfer in a microvascular network: the effect of heart rate on heating and cooling in reptiles (*Pogona barbata* and *Varanus varius*). **J Theor Biol.**, v. 203, p. 97–109, dez. 2000.

SEEBACHER, F. Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates. **J Exp Biol.**, v. 212, p. 2885-2891, jun. 2009.

SEEBACHER, F.; FRANKLIN, C. E. Cardiovascular mechanisms during thermoregulation in reptiles. **International Congress Series.**, v. 1275, p. 242-249. dez. 2004.

SEEBACHER, F.; GRIGG, G. C. Changes in heart rate are important for thermoregulation in the varanid lizard *Varanus varius*. **J Comp Physiol B.**, v, 171, p 395-400, abr. 2001.

SEEBACHER, F.; FRANKLIN, C. E. Control of heart rate during thermoregulation in the heliothermic lizard *Pogona barbata*: importance of cholinergic and adrenergic mechanisms. **J Exp Biol.**, v. 204, p. 4361-6, dez. 2001.

SEEBACHER, F.; FRANKLIN, C. E. Prostaglandins are important in thermoregulation of a lizard (*Pogona vitticeps*). **Proc Roy Soc Lond B (Suppl).**, v. 270, p. S50–S53, abr. 2003.

SEEBACHER, F.; FRANKLIN, C. E. Physiological mechanisms of thermoregulation in reptiles: a review. **J Comp Physiol B.**, v. 175, p. 533–541, jul. 2005.

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, jan. 2004.

SILVERMAN, J.; GARNETT, N. L.; GISZTER, S. F.; HECKMAN, C. J.; KULPA-EDDY, J. A.; LEMAY, M. A.; PERRY, C. K.; PINTER, M. Decerebrate Mammalian Preparations: Unalleviated or Fully Alleviated Pain? A Review and Opinion. **Contemporary topics. The American Association for Laboratory Animal Science.**, v. 44, n. 4, p. 34-36, jul. 2005.

SKALS, M.; SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; WANG, T. Venous tone and cardiac function in the South American rattlesnake *Crotalus durissus*: mean circulatory filling pressure during adrenergic stimulation in anaesthetised and fully recovered animals. **J. exp. Biol.**, v. 208, p. 3747-3759, out. 2005.

SKOVGAARD, N., ABE, A. S., ANDRADE, D. O. V.; WANG, T. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and pulmonary blood pressures. **Am J Physiol-Reg I.**, v. 289, p. R1280–R1288, jun. 2005.

SMATRESK, N. J. Chemoreceptor modulation of endogenous respiratory rhythms in vertebrates. **American Journal of Physiology.**, v. 28, p. R887-R897, 1990.

SMITH, E. N. Cutaneous heat flow during heating and cooling in Alligator mississippiensis. **Am J Physiol.**, v. 230, p. R160-7, mai. 1976.

STECINA, K. Midbrain stimulation-evoked lumbar spinal activity in the adult decerebrate mouse. **Journal of Neuroscience Methods.**, v. 288, p. 99-105, aug. 2017.

STEFFEY, E. P.; HOWLAND, D. Isoflurane potency in the dog and cat. **Am J Vet Res.**, v. 38, p. 1833-1836, 1977.

SUNDIN, L.; BURLESON, M.; WANG, T.; REID, S.; SALGADO, H.; ABE, A. S.; GLASS, M.; MILSOM, W. Pulmonary receptors in reptiles: discharge patterns of receptor populations in snakes versus turtles. **J. Comp. Physiol B.**, v. 171, p. 103-111, dez. 2001.

TAMBOURGI, D. V.; BIZERRA, A. F.; QUEIROZ, G. P.; IBÁÑEZ, O. C. M.; SANTORO, M. L.; **Manual Prático sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório**. Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, p. 45-61, 2010.

TAYLOR, E. W.; ANDRADE, D. V.; ABE, A.S.; LEITE, C.A.C.; WANG, T. The unequal influences of the left and right vagi on the control of the heart and pulmonary artery in the rattlesnake, *Crotalus durissus*. **J Exp Biol.**, v. 212, p. 145–151, ago. 2009.

TONKOVIC-CAPIN, M.; KROLO, M.; STUTH, E. A. E.; HOPP, F. A.; ZUPERKU, E. J. Improved method of canine decerebration. **Appl Physiol.**, v. 85, p. 747–750, 1998.

TROIANO, N. M.; ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; ABE, A. S.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H. The autonomic control of upright posture tachycardia in the arboreal lizard *Iguana iguana*. **J. Exp. Zool.**, p.1-10, jun. 2018.

ULINSKI, P.S. Structure of Anterior Dorsal Ventricular Ridge in Snakes. **J. Morph.**, v. 148, n.1, p. 1-22, jan. 1976.

VLIET, B. N. V.; WEST, N. H. Phylogenetic Trends in the Baroreceptor Control of Arterial Blood Pressure. **Physiological Zoology.**, v. 67, p. 1284-1304, nov/dez. 1994.

WANG, T.; ABE, A. S.; GLASS, M. L. Effects of temperature on lung and blood gases in the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part.**, v. 121, p. 7–11, jun. 1998.

WANG, T.; FERNANDES, W.; ABE, A. S. Blood pH and O₂ homeostasis upon CO₂ anesthesia in the rattlesnake (*Crotalus durissus*). **Snake.**, v. 25, p.777–784, 1993.

WANG, T.; HICKS, J. W. The interaction of pulmonary ventilation and the right-left shunt on arterial oxygen. **The Journal of Experimental Biology.**, v. 199, p. 2121–2129, ago. 1996.

WANG, T.; TAYLOR, E. W.; REID, S. G.; MILSOM, W. K. Interactive effects of mechano- and chemo-receptor inputs on cardiorespiratory outputs in the toad. **Respiratory Physiology & Neurobiology.**, v. 140, p. 63–76, jan. 2004.

WANG, T.; KROSNIUNAS, E. H.; HICKS, J. W. The Role of Cardiac Shunts in the Regulation of Arterial Blood Gases. **Amer. Zool.**, v. 37, p.12-22, 1997.

WANG, T.; WARBURTON, S. J.; ABE, A. S.; TAYLOR, E. W. Vagal control of heart rate and cardiac shunts in reptiles: relation to metabolic state. **Exp. Physiol.**, v. 86, p. 777-786, dez. 2001.

WHEATHERS, W.W.; WHITE, F. N. Physiological thermoregulation in turtles. **Am J Physiol.**, v. 221, p. 704-10, set. 1971.

WOOLF, C. L. Long Term Alterations in the Excitability of the Flexion Reflex Produced by Peripheral Tissue Injury in the Chronic Decerebrate Rat. **Pain.**, v. 18, p. 325-343, out, 1984.

WAXMAN, S.; PRADOS, A. N.; LUCAS, J. J.; ANDRES, M. I. S.; REGNER, P.; OLIVEIRA, V. C.; ROODT, A.; RODRÍGUEZ, C. Pharmacokinetics of Enrofloxacin and Its Metabolite Ciprofloxacin after Single Intramuscular Administration in South American Rattlesnake (*Crotalus Durissus Terrificus*). **Pak Vet J.**, v. 35(4), p. 494-498, jan. 2015.

WYNEKEN, J. Reptilian Neurology: Anatomy and Function. **Vet Clin Exot Anim.**, v. 10, p. 837-853, 2007.

ZENA, L. A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; BÍCEGO, 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, dez. 2016.

CAPÍTULO II

Avaliação da viabilidade de métodos de análise da sensibilidade barorreflexa e de um modelo de estudo com a cascavel sul americana (*Crotalus durissus*)

RESUMO

Parte dos estudos que envolvem o sistema nervoso autônomo (SNA) em vertebrados ectotérmicos utilizam anestésicos para a coleta de dados fisiológicos, ou períodos muito curtos de recuperação da anestesia e instrumentação. Essas condições têm efeitos negativos na função autonômica e, conseqüentemente, em toda a modulação dependente do SNA. A validação de um modelo descerebrado, com SNA funcional, permitiria a obtenção de múltiplos dados cardiovasculares, sem o efeito deletério dos anestésicos sobre os ajustes autonômicos. No presente estudo, avaliamos o uso de animais descerebrados para estudos que compreendem o SNA. Assim, quantificamos o efeito da anestesia com isoflurano sobre a modulação autonômica do sistema cardiovascular. Avaliamos se o animal descerebrado expressa ajustes barorreflexos de modo similar ao animal intacto. Também avaliamos o uso do método da seqüência como forma de análise barorreflexa em vertebrados ectotérmicos. Observamos que o uso de anestesia (isoflurano 3%) suprime o mecanismo barorreflexo e causa diminuição da PAM sis (pressão arterial média sistêmica) dos animais. A medida de sensibilidade barorreflexa (bpm/kPa) em cascavéis foi similar quando aferida pelos métodos da seqüência, ($26,4 \pm 6,5$) ou farmacológico, ($25,4 \pm 7,6$). Quando aferida pelo método farmacológico, a sensibilidade foi similar em animais descerebrados e animais intactos ($25,4 \pm 7,6$ e $40,9 \pm 11,7$, respectivamente). O método da seqüência, no entanto, superestimou a sensibilidade barorreflexa em animais descerebrados ($111,2 \pm 19,6$). O índice de efetividade barorreflexa (BEI) também foi maior em animais descerebrados, o que indica que modulações inibitórias, provenientes de centros encefálicos superiores, podem estar inibidas no modelo. Além disso, o isoflurano compromete os mecanismos autonômicos como o barorreflexo e tal fato deve ser observado em estudos funcionais ou na prática clínica. O método da seqüência, com o devido cuidado, pode ser utilizado como uma alternativa ao método farmacológico. Ainda, a preparação descerebrada pode ser uma alternativa aos registros *in vivo* em algumas abordagens experimentais que envolvam reflexos autonômicos e/ou com grande grau de instrumentação.

Palavras chave: Barorreflexo. Descerebração. Cascavel. Isoflurano. Método da seqüência.

ABSTRACT

Part of the studies involving the autonomic nervous system (ANS) in basal vertebrates use anesthetics for the collection of data or very short periods of anesthesia recovery and instrumentation. These conditions have negative effects on autonomic function and consequently on all SNA-dependent modulation. Validation of a decerebrated model, with functional ANS could allow the development of multiple cardiovascular data without the deleterious effects of anesthetics on the autonomic adjustments. In the present study, we evaluated the use of decerebrated animals for studies that comprise the ANS. Thus, we quantified the effect of isoflurane anesthesia on the autonomic modulation of the cardiovascular system. We evaluate if the decerebrated animal expresses baroreflex adjustments in a similar way to the intact animal. We also assess the use of the sequence method as a form of baroreflex analysis in basal vertebrates. The anesthesia (isoflurane 3%) suppresses the baroreflex and causes a decrease in the MAP (mean arterial pressure). The measure of baroreflex sensitivity (bpm / kPa) in rattlesnakes was similar when measured by the sequence (26.42 ± 6.56) or pharmacological (25.43 ± 7.65) method. The baroreflex sensitivity by the pharmacological method was similar in decerebrated and intact animals (25.43 ± 7.65 and 11.74 ± 40.9 , respectively). However, the sequence method overestimated baroreflex sensitivity in decerebrated animals (111.2 ± 19.62). The baroreflex effectiveness index (BEI) was also higher in decerebrated animals, indicating that inhibitory modulations from higher brain centers, may be inhibited in the model. In addition, isoflurane compromises autonomic mechanisms such as baroreflex and this fact should be observed in functional studies or clinical practice. The sequence method, can be used as an alternative to the pharmacological method. Moreover, the decerebrated preparation may be an alternative to *in vivo* recordings in some experimental approaches involving autonomic reflexes and/or with a high degree of instrumentation.

Key words: Baroreflex. Decerebration. Isoflurane. Rattlesnake. Sequence method.

1. INTRODUÇÃO

A Pa atua como força motriz do sistema circulatório e está sob monitoramento contínuo do SNA através do mecanismo barorreflexo. Grande parte do conhecimento sobre barorreceptores e sobre o mecanismo barorreflexo é proveniente de estudos com mamíferos, nos quais o seio carotídeo e o arco aórtico são os principais sítios de barorreceptores (BAGSHAW, 1985). Em lagartos e serpentes, o *truncus arteriosus* tem sido a região mais apontada como sítio de barorreceptores (BERGER et al. 1982; LILLYWHITE e DONALD, 1994). Alguns dos estudos com répteis buscam entender os limites do barorreflexo e suas similaridades entre espécies. Entre espécies de lagartos (ZENA et al., 2016; BERGER, 1980) a sensibilidade barorreflexa é muito similar. Além disso, répteis (ZENA et al., 2016; HAGENSEN et al., 2010) e outros vertebrados ectotérmicos (ZENA et al., 2015) demonstram a alta capacidade de resposta barorreflexa da f_H à hipotensão, de forma a proteger eficientemente os órgãos e tecidos de quedas significativas de Pa.

A sensibilidade barorreflexa pode ser estimada avaliando as respostas de frequência cardíaca às alterações na pressão arterial. O método farmacológico é o mais utilizado em vertebrados ectotérmicos para o estudo do mecanismo barorreflexo (ZENA et al., 2016; HAGENSEN et al., 2010). Neste método, injeções de fármacos vasoativos resultam em alterações de resistência periférica e tônus vascular. Isso altera a Pa e desencadeia respostas compensatórias da f_H . Esta alteração, por sua vez, é utilizada para indicar a presença do barorreflexo e sua eficácia em tamponar alterações de Pa (e.g MILLARD e MOALLI, 1980; ALTIMIRAS, 1998) (Figura 2). Nessa análise, a curva sigmoide fornece parâmetros importantes para a caracterização do barorreflexo, sendo eles: os valores máximos (A) e mínimos da (D) da f_H ; a amplitude da resposta da f_H (diferença entre a f_H máxima e a f_H mínima); o valor da PAM a 50% da amplitude da f_H (PAM50) e o ganho máximo (G50), que corresponde ao ponto de maior alteração da f_H pela menor alteração de Pa, sendo o indicador mais utilizado da sensibilidade barorreflexa (REID, 1996; ZENA et al., 2016).

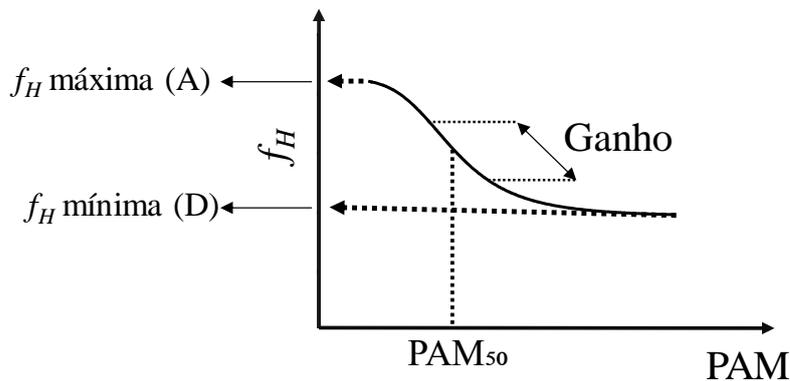


Figura 1. Curva barorreflexa, indicando parâmetros resultantes da aplicação do método farmacológico. Na ordenada, estão indicados a frequência cardíaca máxima (A), a frequência cardíaca mínima (D). No eixo x, a PAM_{50} corresponde ao valor da PAM a 50% da amplitude da f_H . O ganho é a medida utilizada para indicar a sensibilidade barorreflexa.

O método da sequência (Figura 2) permite a observação de sequências barorreflexas espontâneas, definidas como sequências de três ou mais contrações cardíacas nas quais a pressão arterial sistólica (PAS) aumenta progressivamente e o intervalo RR (RR_i) aumenta em sequência. Essa alteração ocorre geralmente com *delay* (atraso) de uma contração cardíaca, caracterizando assim, sequências positivas (*UP*). A alteração inversa, com redução de PAS e RR_i , seriam sequências barorreflexas negativas (*DOWN*) (DI RIENZO et al., 2001). A sensibilidade barorreflexa é obtida pela inclinação média de todas as sequências barorreflexas (BERTINIERI et al., 1985; RIENZO et al., 2001) e indicam o quanto as alterações de Pa afetam a f_H nas condições da medida.

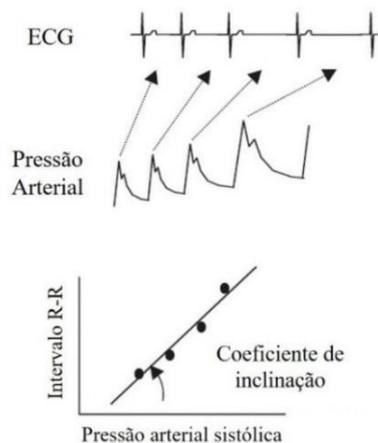


Figura 2. O método da sequência. A parte superior da figura ilustra uma sequência barorreflexa positiva, na qual a PAS e intervalo RR aumentam. Abaixo, a representação gráfica através da qual é obtida a regressão linear da sequência barorreflexa. A sensibilidade barorreflexa é obtida através da média do coeficiente de inclinação de todas as sequências barorreflexas positivas e negativas (adaptado de Di Rienzo et al. 2001).

Em indivíduos saudáveis, as rampas de pressão não são sempre acompanhadas de rampas reflexas de RR_i . Di Rienzo et al (2001) sugeriu que isso pode indicar que sob condições fisiológicas o barorreflexo nem sempre se sobrepõe a outros reflexos para ganhar o controle do no sinusal. Para quantificar essa taxa de recrutamento cardíaco pelo barorreflexo, foi desenvolvido o Índice de Efetividade Barorreflexa (BEI) (DI RIENZO et al., 2001). O BEI é obtido pela relação entre o número de rampas de PAS seguidas pelas correspondentes rampas de PI e o número total de rampas de PAS, como proposto por Di Rienzo (2001):

$$BEI = \frac{\text{número de sequências } iRR / PAS}{\text{número de rampas PAS}}$$

O método da sequência tem sido utilizado em alguns estudos com mamíferos, mas ainda não foi validado para vertebrados basais. A validação desse método pode ser bastante útil para ectotérmicos por possibilitar a aferição do barorreflexo em condições dinâmicas, frente a desafios fisiológicos, ou mesmo em repouso, em condições ambientais diversas; além de não necessitar da aplicação de múltiplas injeções de fármacos vasoativos.

Atualmente, na fisiologia comparada, muitos estudos *in vivo* e avanços vêm sendo realizados para o entendimento de mecanismos regulatórios mediados pelo SNA (ZENA et al., 2016; ARMELIN et al., 2014; LEITE et al., 2013). A quantificação da sensibilidade barorreflexa e dos limites do barorreflexo demandam animais funcionalmente íntegros. Alterações na modulação autonômica relacionados aos métodos de instrumentação e possíveis estresse de manuseio são fatores importantes nesses estudos. Como alternativa, alguns grupos de pesquisa utilizam preparações em plano anestésico para a coleta de dados (GALLI et al., 2007; TAYLOR et al., 2009). Infelizmente, apesar de utilizado com frequência, esse método também possui limitações. Foi observado que anestésicos inaláveis causam redução da P_a e da f_H em lagartos da espécie *Iguana iguana* (MOSLEY et al., 2004), e podem interferir em diversas outras funções cardiovasculares. Ainda, em roedores anestésicos inaláveis deprimem a função barorreflexa, através da diminuição da sensibilidade barorreflexa e da amplitude da FC em análises com métodos farmacológicos (LEE et al., 2002).

Muitos estudos em vertebrados mamíferos (PICKERING et al., 2006) e alguns vertebrados basais (WANG et al., 2004) utilizam preparações descerebradas. Nestes, geralmente é realizada a remoção do telencéfalo e porção do diencefalo (DOBSON e HARRIS, 2012; LEE et al., 2002), o que por sua vez, inativa o funcionamento do tálamo, estrutura relacionada ao processamento de diversos estímulos, incluindo os provenientes de nociceptores (SILVERMAN et al., 2005), mas

mantém as estruturas do SNA. Experimentos com roedores evidenciam que as respostas barorreflexas são mantidas, mesmo após descerebração (BOSCAN et al., 2001; LEE et al., 2002). O procedimento de descerebração provê uma preparação experimental que pode ser recuperada da anestesia/instrumentação cirúrgica e que se mantém sem qualquer processamento superior, incluindo nocicepção e estresse durante os protocolos. Preparações descerebradas foram apontadas como uma alternativa ao uso de anestésicos em estudos que enfrentam limitações éticas em mamíferos (SAPRU e KRIEGER, 1979). Em decorrência disso, buscamos produzir uma preparação de vertebrado descerebrado, representativo no grupo Squamata, que permita estudos eficientes de reflexos autonômicos dentro de aspectos éticos. Assim, buscamos avaliar o efeito da anestesia com isoflurano, anestésico inalatório de uso corrente, na expressão do mecanismo barorreflexo e manutenção da pressão arterial. Avaliamos a preparação descerebrada como modelo experimental útil, analisando se, o mecanismo barorreflexo, um importante reflexo autonômico, permanece íntegro após a preparação, e se suas características têm similaridade com o de um animal íntegro. Ainda, verificamos a efetividade do método da sequência para estudos de barorreflexo.

2. OBJETIVOS GERAIS

Investigar a sensibilidade barorreflexa em répteis e comparar a efetividade de métodos de análise barorreflexa (farmacológico e método da sequência) e possíveis modelos de estudo para a avaliação do barorreflexo (animal acordado, anestesiado e descerebrado).

2.1. Objetivos específicos

- a. Descrever o mecanismo barorreflexo da cascavel sul americana, *Crotalus durissus*
- b. Avaliar o uso de animais descerebrados como alternativa para estudos de sensibilidade barorreflexa.
- c. Quantificar o efeito da anestesia com isoflurano sobre o mecanismo barorreflexo.
- d. Avaliar a confiabilidade do uso do método da sequência em comparação ao método farmacológico para descrição do barorreflexo em animais acordados em repouso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção e manutenção dos animais

Os animais utilizados neste experimento (n = 13) foram doados por centros de recepção e/ou criação científica, como o Instituto Butantan em São Paulo e o Jacarezário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em Rio Claro/São Paulo. Os exemplares foram transportados e mantidos no Departamento de Ciências Fisiológicas em São Carlos (UFSCar). Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho de Ética de Uso de animais (CEUA-UFSCar).

Os animais foram mantidos em caixas individuais (dimensões 44x50x43cm), à temperatura de 28-30°C, com livre acesso à água e foram alimentadas a cada duas semanas com camundongos provenientes do Biotério Central da UFSCar. A alimentação foi interrompida duas semanas antes de qualquer procedimento experimental para evitar o efeito do incremento metabólico pós-prandial (SDA - ANDRADE et al. 1997) nos animais de estudo. Tal período não configura jejum em serpentes.

3.2. Anestesia e pós-operatório

Para qualquer procedimento de instrumentação, os animais foram primeiramente anestesiados com CO₂ (WANG et al., 1993; LEITE et al., 2013) até perda dos reflexos de ajuste de postura corporal, para que pudessem ser manipulados com segurança. O procedimento segue a Resolução Normativa CONCEA n. 29, que especifica os cuidados anteriores ao manuseio de serpentes viperídeas. Em seguida, foi inserido um tubo endotraqueal para ventilação mecânica com o anestésico inalável isoflurano; 3-5% na indução e 2-4% na manutenção da anestesia (TAMBOURGI e BIZERRA, 2010). Após a perda total de tônus muscular, os animais foram submetidos às cirurgias descritas a seguir. Todos os animais receberam anestésico local (lidocaína 2%) nos pontos de incisão, além de injeções de antibiótico (Chemitril 11 mg/kg) e anti-inflamatório (Flunixin 1,1 mg/kg), como indicado para répteis (CUBAS et al., 2006; WAXMAN et al., 2015) no pós-operatório, a cada 48 horas. Ao final dos protocolos propostos, os animais receberam dose intravenosa do anestésico Pentobarbitol 100mg/kg. O momento de eutanásia, foi conferido ao momento de execução do procedimento de descerebração.

3.3. Instrumentação

Após o protocolo de anestesia e sob efeito do isoflurano (5 - 3%), foram realizadas incisões ventrolaterais (~4,5cm) no primeiro terço do corpo dos animais. Isso permitiu a

exposição da área rostral ao coração e acesso aos vasos centrais. Assim, foi realizada canulação oclusiva da artéria vertebral para medição da pressão arterial no arco sistêmico direito. Ao final do procedimento as cânulas foram exteriorizadas e fixadas com pontos de sutura no dorso do animal. Tal procedimento permitiu o registro contínuo da Pa (sistema de transdução, amplificação, e registro *ADInstruments*) e cálculos de f_H e dos parâmetros de pressão arterial (Labchart, *ADInstruments*).

3.4. Descerebração

Para este procedimento, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Durante anestesia, foi realizada uma incisão medial na pele da cabeça para expor o crânio e utilizando aparelho de micro broca (AWT/WR-115) foi feita uma pequena abertura medial (~2-3mm diâmetro) na caixa craniana ao nível da sexta escama caudal à escama superior da abertura ocular (Figura 3). Os vasos aparentes foram cauterizados. Em seguida foi realizada uma incisão nas meninges expondo o teto óptico. Após isso, foi feita uma incisão com cauterizador, perpendicular à base do crânio, sobre o teto óptico seccionando toda a estrutura nervosa àquele nível. Todo o sistema nervoso rostral à incisão foi cauterizado e inviabilizado. Permaneceram intactas as estruturas referentes ao cerebelo, tronco encefálico e a porção posterior do hipotálamo. Geofan (esponja hemostática) e algodão foram inseridos no espaço aberto para estabilização do tecido nervoso remanescente. A incisão foi, posteriormente, suturada a fim de evitar ressecamento do tecido. O procedimento de descerebração, por ser um procedimento que, de forma irreversível, levou a perda de funções para a vigília e operação normal, foi considerado o momento de eutanásia dos animais. Assim, posteriormente, quando mencionado momentos e períodos de recuperação pós-cirurgia nos animais descerebrados, será uma referência à finalização do efeito da anestesia na preparação e o concomitante reestabelecimento de padrões autonômicos para manutenção de funções viscerais.

Após a descerebração, foi realizada a canulação da artéria vertebral conforme descrito anteriormente. Na sequência, a anestesia foi retirada e a preparação recuperada por 24h antes dos protocolos experimentais.

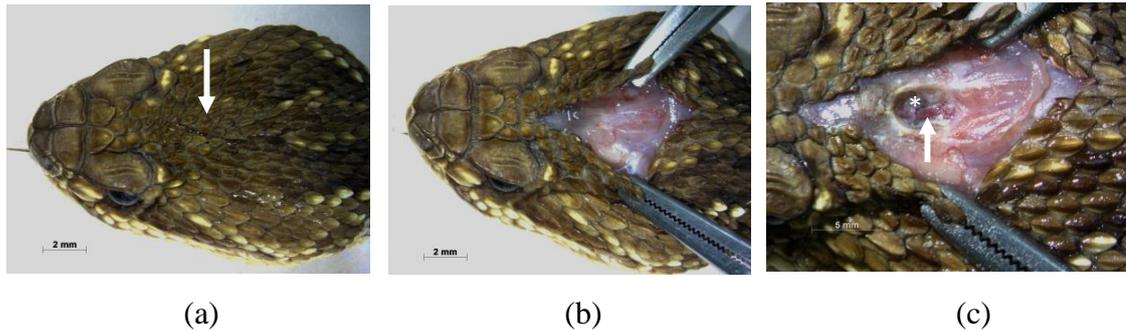


Figura 3. Imagens para referência do procedimento de descerebração, mostrando o local de incisão (seta branca) ao nível da sexta escama caudal à escama superior da abertura ocular (a); a incisão na pele do dorso da cabeça (b); abertura no crânio com micro broca (c) expondo meninge (*) com grande vaso arterial (seta branca) a altura da incisão para descerebração.

3.5. Barorreflexo em cascavéis intactas a 30°C

O protocolo para estudo do barorreflexo foi realizado em 7 animais ($560 \pm 68\text{g}$), que passaram pelo processo de anestesia e instrumentação conforme descritos acima. Este procedimento permitiu a administração de drogas experimentais e registro da Pa sis. Os animais se recuperaram dos procedimentos cirúrgicos por 24-48h (ou até estabilização dos parâmetros cardiovasculares medidos) em uma câmara climática, a 30°C. Em seguida registraram-se o sinal de pressão durante 40 minutos para cálculo de Pa sis e f_H e análise do barorreflexo pelo método da sequência. Na sequência, uma série de injeções intravasculares permitiram a injeção de drogas para o protocolo farmacológico (0,5 ml). Os fármacos vasoativos, utilizadas neste estudo foram: o agonista $\alpha 1$ -adrenérgico, fenilefrina (PE), 5.0, 10.0, 25.0 e 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; e o doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP), 2.5, 5.0, 10.0 e 25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ conforme descrito em protocolo similar para estudo em lagarto teiú (ZENA et al. 2016). As injeções foram realizadas em doses crescentes e de maneira intercalada entre PE e SNP. Antes da aplicação de cada dose, os parâmetros cardiovasculares foram monitorados para certificação de que haviam retornado aos valores de pré-injeção. Injeção de salina de mesmo volume foi utilizada como controle do procedimento.

3.6. Barorreflexo em cascavéis descerebradas a 30°C

Para o estudo do barorreflexo com animais descerebradas, seis animais ($941,5 \pm 55,5\text{g}$) foram submetidos aos procedimentos de anestesia, instrumentação implantação de cânulas sistêmicas e descerebração (descrita nos itens 3.2). Os animais se recuperaram da anestesia e instrumentação por um período de 24-48h em câmaras climáticas, a 30°C. Os protocolos se seguiram em dois dias na mesma temperatura. No primeiro dia de experimento foi realizado o registro de 40 minutos para análise da sensibilidade barorreflexa pelo método da sequência e

posterior a isso, a realização do protocolo farmacológico. No segundo dia de experimento, no mesmo animal, os mesmos protocolos foram realizados após aplicação do protocolo de anestesia com isoflurano, com ventilação mecânica a 5% (frequência 1-3 respirações/minuto) por 15 a 30 minutos para indução e 3% para manutenção por todo o tempo de aplicação do protocolo.

3.7. Análise barorreflexa pelo método da sequência

Para análise do barorreflexo pelo método da sequência, os dados foram coletados em repouso, anteriormente à aplicação de qualquer droga vasoativa. Sequências de valores de RRi e PAS foram obtidas com o programa *Labchart (ADInstruments)* e em seguida exportados para o programa *CardioSeries v.2.4 (www.danielpenteado.com)*, que forneceu valores de ganho ($RRi \times PAS$), BEI, e número de sequências barorreflexas e rampas, positivas e negativas. Os valores de ganho obtidos em RRi (ms) foram convertidos e apresentados em bpm para a comparação com o método farmacológico.

Assim, arquivos contendo 300 contrações cardíacas consecutivas (~10min) foram analisados para observação de ocorrência de sequências barorreflexas, contendo trechos, com ao menos 3 ciclos, que apresentaram aumentos progressivos na PAS e intervalo RRi (sequências UP) ou vice-versa (sequências DOWN). Foi considerado atraso (*delay*) de 1 ciclo cardíaco para análise, por este resultar em maior número de sequências detectadas.

3.8. Análise barorreflexa pelo método farmacológico

A análise foi realizada a partir de trechos de registros de pressão obtidos anteriormente e durante o maior efeito após a aplicação de doses de PE e SNP. Os registros de pressão foram utilizados para obtenção de valores de f_H e PAM no repouso e após alteração de resistência periférica. A relação entre PAM e f_H para cada animal foi obtida através da função logística sigmoide de quatro parâmetros (REID, 1996):

$$FC = \frac{(A - D)}{1 + (P_{MA}/C)^B} + D$$

Nesta, o A representa a f_H máxima (bpm); D é a f_H mínima; B é o coeficiente de inclinação e C é o valor de PAM no ponto médio do intervalo f_H (PAM₅₀; kPa). O ganho (G₅₀) do barorreflexo (ou sensibilidade barorreflexa) no (PAM₅₀ quando PAM = C) foi calculado como:

$$G_{50} = \frac{-B(A - D)}{4C}$$

Para a análise foram observados trechos dentro de até 5 minutos após as injeções, com pico de resposta de Pa e f_H às drogas vasoativas e que não apresentem artefatos no traçado de Pa.

3.9. Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. A comparação das médias obtidas através do método da sequência (número de rampas de Pa, número de rampas barorreflexas, número de rampas não-barorreflexas, BEI) entre os grupos intactos e descerebrados foram realizadas através do teste de Mann-Whitney. As variáveis barorreflexas obtidas através do método farmacológico (f_H máxima, f_H mínima, amplitude da f_H , G_{50} , PAM50), bem como a análise das médias de PAM e f_H em resposta as doses de PE e SNP também foram analisadas através do teste de Mann-Whitney.

O efeito da anestesia e da descerebração no ganho, PAM sis e f_H foram analisados através de um modelo generalizado misto. As análises estatísticas foram feitas através dos softwares IBM SPSS versão 20 e GraphPad Prism versão 7.0. As diferenças entre as médias do modelo generalizado misto foram analisadas através do pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Método da sequência

A sensibilidade barorreflexa (ganho) da preparação descerebrada foi $111,2 \pm 19,62$ (bpm/kPa), maior que em animais intactos, $27,08 \pm 5,97$ (bpm/kPa) (Figura 4; Tabela 1).

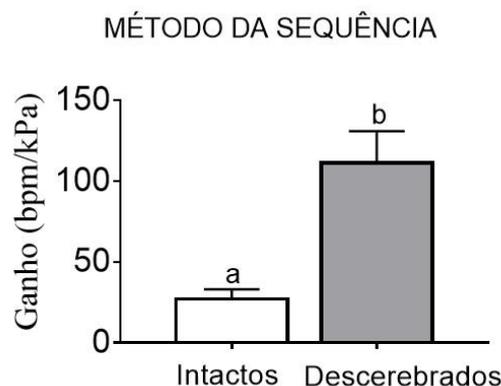


Figura 4. Ganho (bpm/kPa) obtido pelo método da sequência em animais intactos e descerebrados. Ganho de animais intactos (barra branca) e descerebrados (barra cinza) obtido pelo método da sequência. Valores indicados por letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. Intactos, N = 7. Descerebrados, N = 6. Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M.

O número de rampas de Pa *UP* de animais intactos foi 33,2% maior que de animais descerebrados, enquanto que o número de rampas *DOWN* e número total de rampas de Pa foram similares entre animais intactos e descerebrados (Figuras 5; Tabela 1). Em animais descerebrados foi possível observar um número 48,8% a mais de rampas barorreflexas positivas em relação aos animais intactos (Figura 5; Tabela 1). O número de sequências barorreflexas negativas e número total de sequências barorreflexas foi semelhante entre os grupos (Figuras 5; Tabela 1). O número de sequências não barorreflexas positivas e negativas foi semelhante entre animais intactos e descerebrados, bem como o total de sequências não barorreflexas (Figura 5; Tabela 1). O BEI relativo a sequências positivas (BEI +/ BEI UP) foi 88% maior em animais descerebrados enquanto que o BEI relativo a sequências negativas (BEI -/BEI DOWN) foi similar entre os grupos. O BEI total foi semelhante entre os grupos, sendo 29% em animais intactos e 42% em animais descerebrados (Figuras 5; Tabela 1).

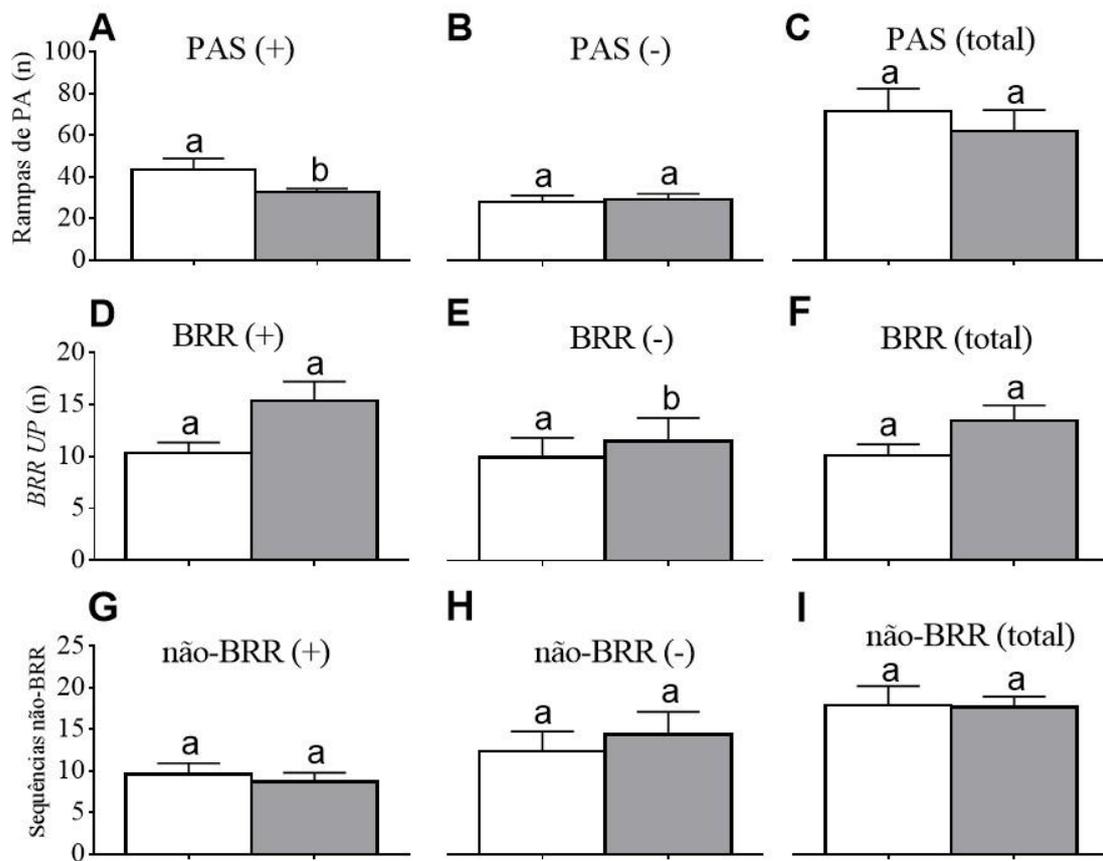


Figura 5. Variáveis barorreflexas obtidas através do método da sequência. As variáveis obtidas pelo no método da sequência em animais intactos ($n = 7$) e descerebrados ($n = 6$) em sequências positivas e negativas. Os gráficos apresentam as rampas de pressão arterial (A, B, C), sequências barorreflexas (D, E, F), sequências não-barorreflexas (G, H, I) e o índice de efetividade barorreflexa (J, K, L). Letras diferentes representam diferença estatística entre as variáveis de animais intactos e descerebrados. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M.

Tabela 1. Variáveis obtidas através do método da sequência em cascavéis descerebradas e intactas.

	INTACTOS	DESCEREBRADOS
PAM sistêmica (kpa)	3,9 ± 0,4	3,69 ± 0,3
Frequência cardíaca (bpm)	33,4 ± 2,3	33,88 ± 3,6
RRi (s)	1,9 ± 0,2	2,35 ± 0,24
PAS (kPa)	4,5 ± 0,3	4,11 ± 0,3
Ganho (bpm/kPa)	26,4 ± 6,5	111,2 ± 19,6*
BEI ALL	0,2 ± 0,03	0,42 ± 0,5
BEI UP	0,2 ± 0,02	0,47 ± 0,06*
BEI DOWN	0,3 ± 0,05	0,40 ± 0,1
Rampas UP de PA	43,5 ± 5,7	32,6 ± 1,5*
Rampas DOWN de PA	28,0 ± 3,6	29,3 ± 2,7
Total de rampas de PA	71,7 ± 3,4	62,2 ± 4,1
Rampas UP BRR	10,3 ± 1,0	15,3 ± 1,7*
Rampas DOWN BRR	9,9 ± 1,5	11,5 ± 2,0
Total de rampas BRR	20,2 ± 2,1	26,8 ± 3,0
Rampas UP não-BRR	9,6 ± 1,3	8,6 ± 1,1
Rampas DOWN não-BRR	8,3 ± 1,3	9,0 ± 5,4
Total de rampas não BRR	17,9 ± 2,3	17,7 ± 1,3

Os dados são apresentados como média ± E.P.M. As variáveis foram obtidas pelo método da sequência, que forneceu o índice de efetividade barorreflexa (BEI), as rampas de Pa *down* e *up* (negativas e positivas), as rampas barorreflexas *down* e *up* (positivas e negativas) e rampas não barorreflexas *down* e *up* (positivas e negativas) e ganho. Além disso são apresentados os valores basais de f_H , PAM sis, intervalo RR e pressão arterial sistólica (PAS). Asteriscos (*) indicam a diferença estatística entre animais intactos (n=7) e descerebrados (n=6).

4.2. Método farmacológico

As doses de PE causaram elevações da Pa em animais intactos e preparação descerebrada (Figura 6 e 8). Foi possível observar compensações barorreflexas da f_H correspondentemente ao aumento da Pa em animais intactos (Figura 6) e descerebrados (Figura 8). Em animais intactos, todas as doses de SNP testadas causaram diminuição da Pa e elevações compensatórias da f_H (Figura 7; Figura 10).

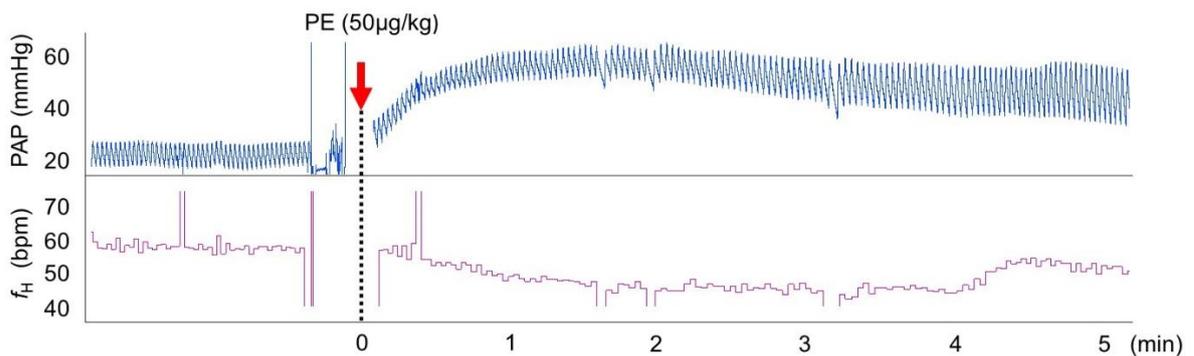


Figura 6. Efeito da fenilefrina (50 µg/kg) na pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (f_H) em animais intactos ao longo de 5 minutos.

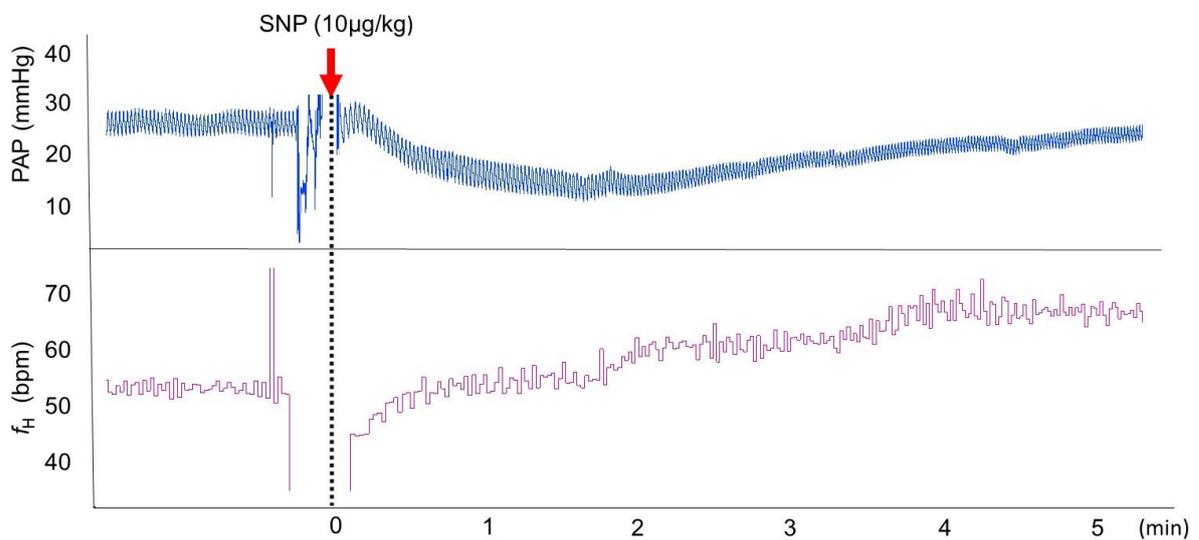


Figura 7. Efeito do nitroprussiato de sódio (10 µg/kg) na pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (f_H) em animais intactos ao longo de 5 minutos.

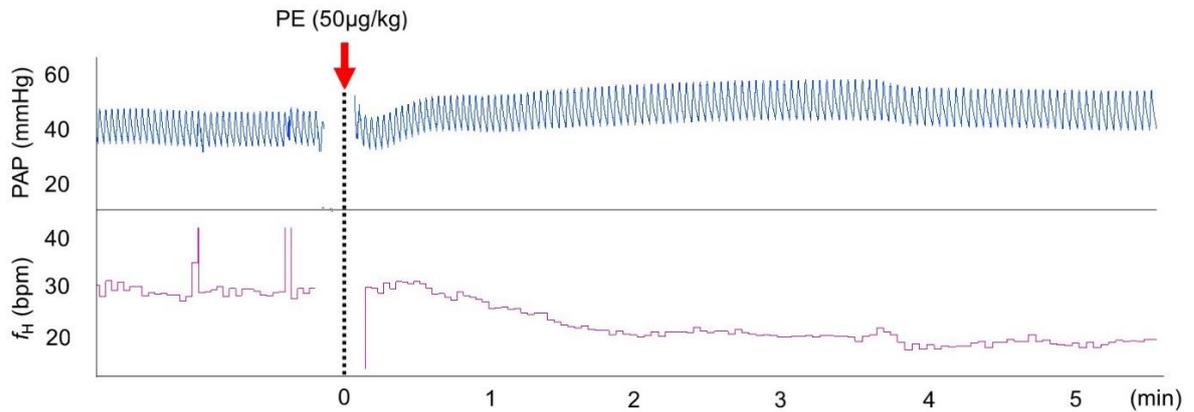


Figura 8. Efeito da fenilefrina (50µg/kg) na pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (f_H) em animais descerebrados ao longo de 5 minutos.

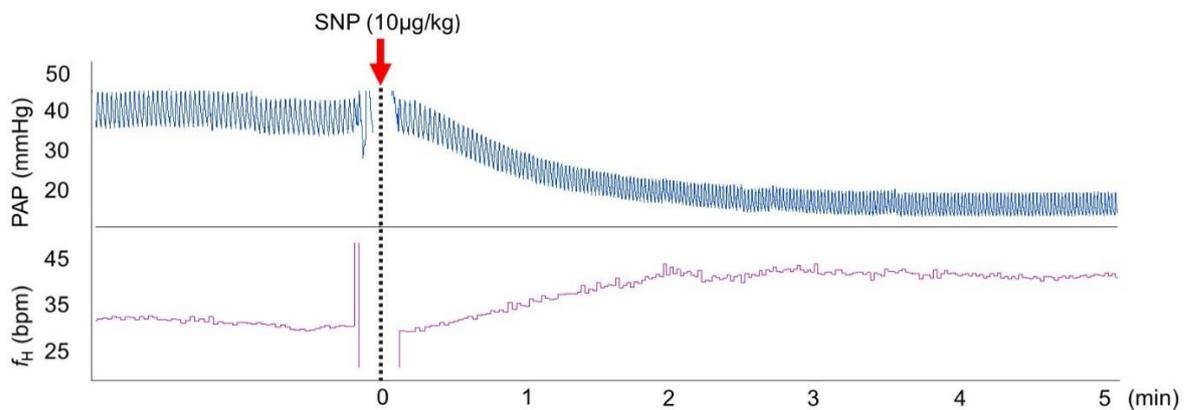


Figura 9. Efeito do nitroprussiato de sódio (10µg/kg) na pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (f_H) em animais descerebrados ao longo de 5 minutos.

As injeções de de SNP (2.5, 5, 10 e 20µg/kg) provocaras quedas na PAM sis nos animais descerebrados, enquanto a f_H aumentou em resposta às reduções da Pa (2.5, 5, 10 e 25µg/kg) (Figuras 8, 9 e 10).

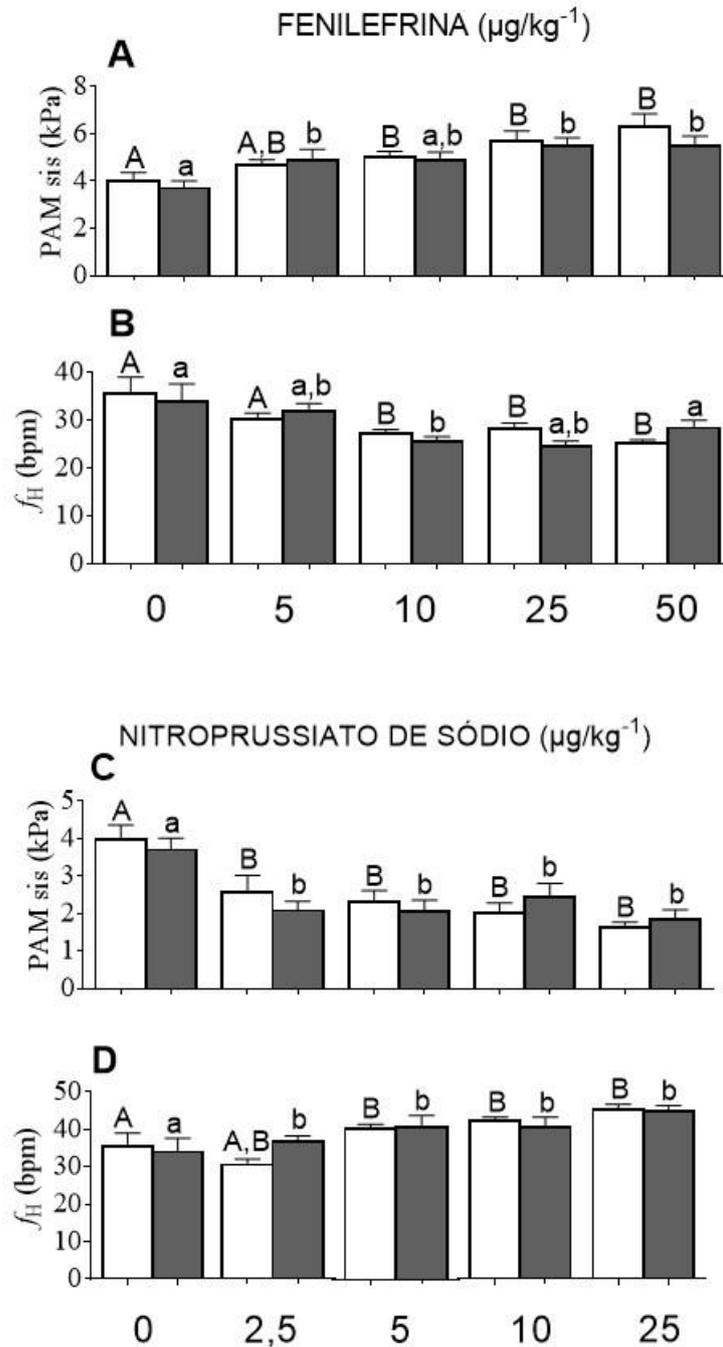


Figura 10. Efeito das injeções de PE e SNP na f_H e PAM sistêmica em cascavéis descerebradas e intactas. Os gráficos exibem o efeito da PE e do SNP na PAM sistêmica (A, C) e na f_H (B, D) de animais intactos (barras brancas) e descerebrados (barras cinzas). Diferentes letras indicam a diferença estatística das doses dos fármacos em animais intactos (letras maiúsculas) e descerebrados (letras minúsculas). Descerebrados, N = 6. Intactos, N = 7. Os dados foram apresentados como média±E.P.M.

O ganho obtido pelo método farmacológico foi semelhante entre animais intactos ($27,98 \pm 9,36$ bpm/kPa) e descerebrados ($40,9 \pm 11,74$ bpm/kPa) (Figura 11).

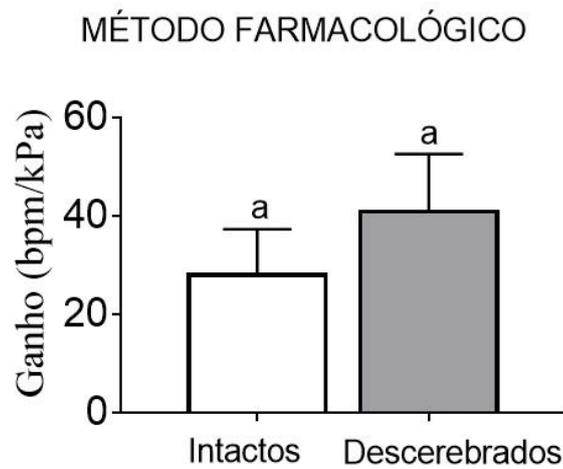


Figura 11. Ganho (bpm/kPa) obtido através do método farmacológico em animais intactos e descerebrados. Valores de ganho de animais intactos (barra branca) e descerebrados (barra cinza) obtidos através do método farmacológico. Valores indicados por letras iguais representam a igualdade estatística entre os grupos. Intactos, N = 7. Descerebrados, N = 6. Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M.

As variáveis barorreflexas, f_H mínima, f_H máxima, amplitude da f_H , coeficiente de inclinação, pressão arterial no ponto médio da f_H , coeficiente de regressão foram semelhantes entre animais intactos e descerebrados (Figura 12A, 12B e 12C; Figura 13A e 13B; Tabela 2).

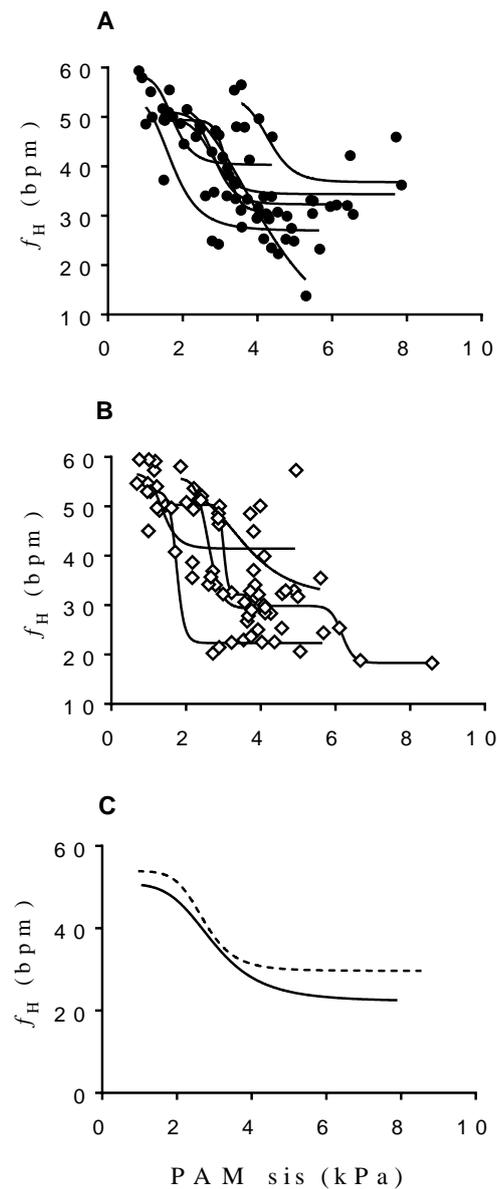


Figura 12. Curvas barorreflexas individuais de animais intactos e descerebrados (30°C). As curvas foram obtidas através de injeções de PE (5.0, 10.0, 25.0 e 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e SNP (2.5, 5.0, 10.0 e 25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Os gráficos apresentam as curvas individuais (A, B) e médias (C) de animais intactos (círculos; linhas contínuas) e descerebrados (losangos; linhas pontilhadas). Intactos, $N = 7$; descerebrados = 6.

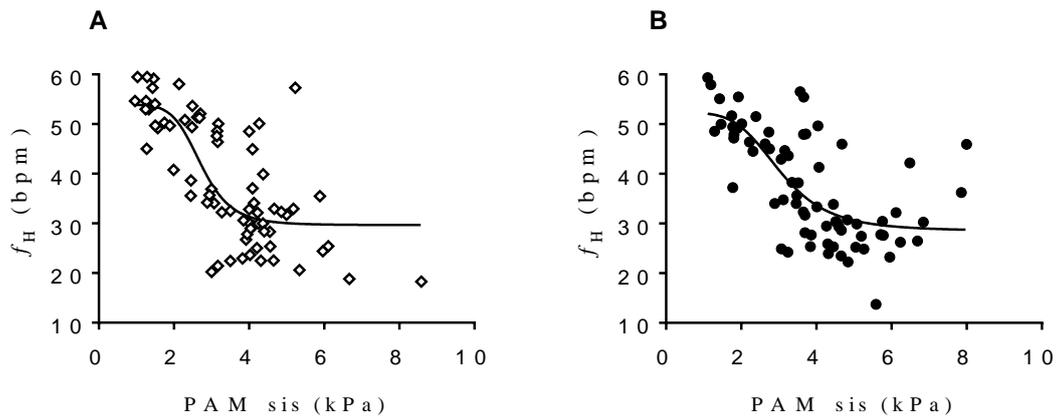


Figura 13. Curvas barorreflexas médias de animais descerebrados e intactos (30°C). Curvas obtidas através com as injeções de PE e SNP em cascavéis intactas (B; círculos) e descerebradas (A; losangos). Intactos, N = 7; descerebrados, N = 6.

Tabela 2. Variáveis obtidas pelo método farmacológico em cascavéis descerebradas e intactas.

	INTACTOS	DESCEREBRADOS
PAM sistêmica basal (kPa)	3,9 ± 0,4	3,69 ± 0,31
Frequência cardíaca basal (bpm)	33,4 ± 2,3	33,88 ± 3,6
Frequência cardíaca mínima (D) (bpm)	27,9 ± 4,5	29,57 ± 3,4
Frequência cardíaca máxima (A) (bpm)	52,6 ± 0,9	49,91 ± 4,1
Amplitude da f_H (bpm)	23,9	20,3
Coefficiente de inclinação (B)	-21,9 ± 6,5	-25,27 ± 7,5
PAM50 (kPa)	3,2 ± 0,3	3,23 ± 0,6
Ganho50 (bpm/kPa)	27,9 ± 9,3	40,9 ± 11,7
R²	0,8 ± 0,1	0,79 ± 0,1

Os dados são apresentados como média±E.P.M. A tabela apresenta as variáveis Frequência cardíaca mínima (D), Frequência cardíaca máxima (A), coeficiente de inclinação (B), PAM50 (pressão arterial no ponto médio da frequência cardíaca), G50 (ganho máximo) e R². Não foram observadas diferenças estatísticas entre as variáveis de animais intactos e descerebrados. Intactos, N = 7. Descerebrados, N = 6.

4.3. Comparação métodos farmacológico e método da sequência

Em animais intactos o ganho foi similar quando calculado através dos métodos da sequência e farmacológico (Figuras 14B; Tabela 3). Animais descerebrados por sua vez, apresentaram maior sensibilidade barorreflexa através do método da sequência (Figura 14A; Tabela 3).

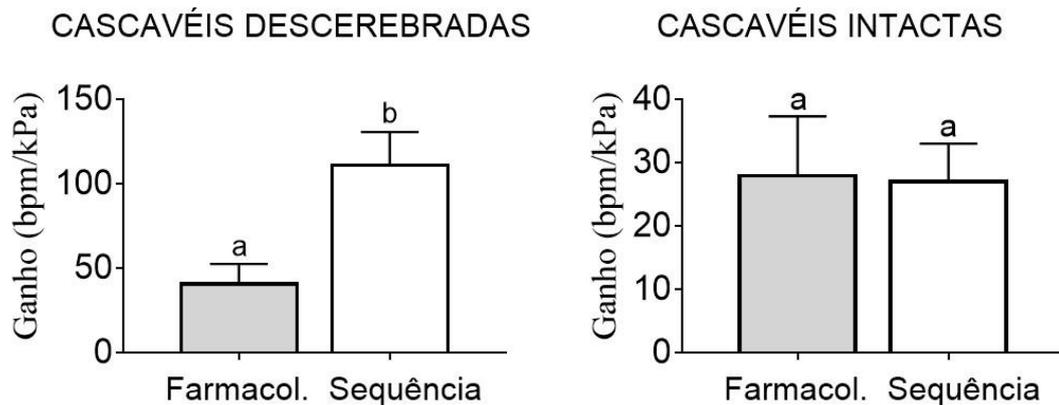


Figura 14. Os valores de ganho (bpm/kPa) de animais intactos, obtidos através dos métodos da sequência e farmacológico. A barra sem preenchimento (branca) representa o método da sequência (n=7). A barra preenchida (preta) representa o método farmacológico (n=7).

Tabela 3. Comparação da sensibilidade barorreflexa de animais intactos e descerebrados obtida através dos métodos da sequência e farmacológico.

GANHO		
	Método da sequência	Método farmacológico
Intactos (30°C)	27,0 ± 5,9 bpm/kPa	27,9 ± 9,3 bpm/kPa
Descerebrados (30°C)	111,2 ± 19,6 bpm/kPa	40,9 ± 11,7 bpm/kPa *

Os dados são expressos em média±E.P.M. A tabela mostra o ganho (bpm/kPa) de animais intactos e descerebrados calculados pelo método da sequência e farmacológico. Valores com asteriscos (*) indicam diferença estatística. Intactos, N = 7. Descerebrados, N = 6.

4.4. Método farmacológico em animais anestesiados

Na preparação anestesiada (isoflurano 3%), não foi possível observar relação clara entre PAM e f_H em resposta a PE e SNP (Figuras 15 e 16). Portanto, não foi possível a obtenção de curvas barorreflexas e o cálculo do ganho através do método farmacológico nesses animais.

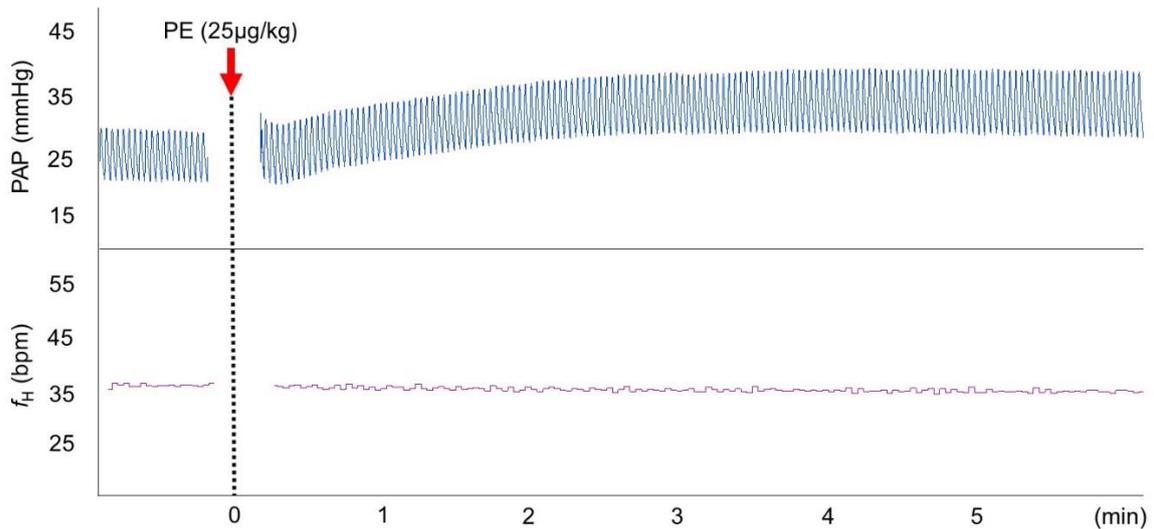


Figura 15. Efeito da fenilefrina (25 µg/kg) na pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (f_H) em animais descerebrados anestesiados ao longo de 5 minutos.

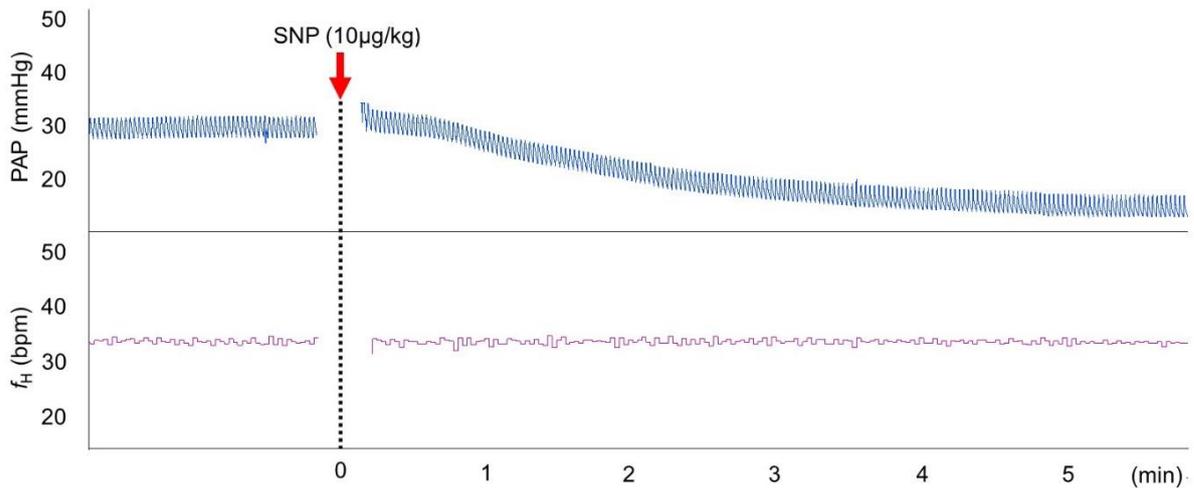


Figura 16. Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) (10 µg/kg) na pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (f_H) em animais descerebrados anestesiados ao longo de 5 minutos.

Apesar da f_H ser similar entre anestesiados e não anestesiados, a PAM sis de repouso foi menor sob anestesia (Figura 17A, 17B; Tabela 4).

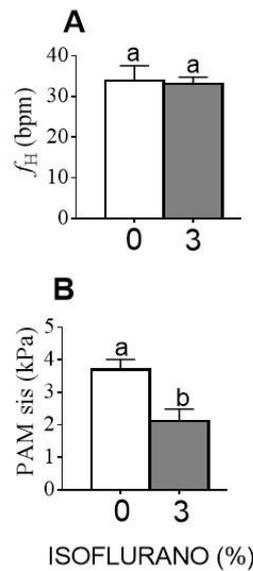


Figura 17. Variáveis cardiovasculares f_H (bpm) e PAM sis (kPa) basais de animais descerebrados e descerebrados anestesiados. As barras sem preenchimento (branco) representam animais descerebrados (n=6) e as barras preenchidas (preto) representam animais descerebrados anestesiados (n=6).

Tabela 4. Parâmetros cardiovasculares em animais descerebrados anestesiados e não anestesiados

	Descerebrados não anestesiados	Descerebrados anestesiados
PAM sistêmica (kPa)	3,6 ± 0,3	2,1 ± 0,3*
Frequência cardíaca (bpm)	33,8 ± 3,6	33,1 ± 1,6

Os dados são apresentados como média±E.P.M. A tabela apresenta a f_H (bpm) e PAM sistêmica (kPa) de animais descerebrados anestesiados e não anestesiados. Valores indicados com asterisco são estatisticamente diferentes. Descerebrados anestesiados, N = 6. Não anestesiados, N = 6.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da sensibilidade barorreflexa na cascavel sul americana *Crotalus durissus*

As características do barorreflexo podem ser obtidas através de informações sobre os barorreceptores, sobre os centros de integração no SNC e a partir dos efetores autonômicos envolvidos nesse reflexo. Dessa maneira, na literatura existe uma variedade de estudos distintos que descrevem as características do barorreflexo em vertebrados basais. Em serpentes e outros répteis, grande parte destes estudos evidenciam de maneira qualitativa a presença do mecanismo barorreflexo e reflexos cardiovasculares em resposta a alterações ortostáticas de Pa (LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978; HOHNKE, 1975).

A descrição da sensibilidade barorreflexa por sua vez, pode ser realizada através de métodos pouco invasivos, como os métodos farmacológico e da sequência, e métodos invasivos com a estimulação direta dos barorreceptores (*open loop*). Nos métodos *open loop*, a resposta do componente sensor (barorreceptores) é estudada separadamente da resposta da f_H e seu reflexo causado na Pa sistêmica (VLIET e WEST, 1994). A estimulação dos barorreceptores e as descargas individuais de cada receptor são obtidas e então codificadas em valores de PAM (VLIET e WEST, 1994). Tais métodos requerem preparações anestesiadas, pois são altamente invasivos. Por esse motivo, atualmente os métodos mais utilizados são os métodos farmacológicos, que analisam a resposta da Pa sistêmica e da f_H causada pela injeção de drogas vasoativas (ALTIMIRAS et al., 1998; MILLARD e MOALLI, 1980; HAGENSEN et al., 2010). Além disso, a falta de informações sobre a localização dos barorreceptores em vertebrados basais também confere vantagem para os métodos farmacológicos, pois as alterações de pressão causadas pelos fármacos estimulam todas as regiões do sistema circulatório que contém barorreceptores. O método da sequência, por sua vez, apresenta vantagens semelhantes, mas dispensa a utilização de fármacos. Este método é muito utilizado em mamíferos (e.g OSTING et al., 1997) mas pouco utilizado em vertebrados ectotérmicos.

A cascavel sul americana exibiu reflexos claros de taquicardia em resposta a eventos de hipotensão, enquanto que eventos hipertensivos causaram bradicardia reflexa. O G50 (ganho) normalizado, índice que representa a porcentagem de mudança da f_H por unidade da Pa (kPa), foi de 67% na cascavel, valor relativamente próximo ao relatado em duas espécies de lagartos *Salvator marianae* 94% (ZENA et al., 2016) e *Tiliqua rugosa* 98% (BERGER, 1980) ambos a $\sim 25^\circ\text{C}$. A amplitude da f_H de *C. durissus*, 23,98, foi próxima ao teiú *Salvator marianae*, 24,7 (ZENA et al., 2016).

Em animais intactos e descerebrados, a PE pareceu ter um efeito menos significativos que o SNP na geração de alterações de RP e respostas cardiovasculares, mesmo em doses maiores (PE 100 e 1000 μ g/kg). Skals (2005) observou que a PE causa efeitos menos pronunciados no sistema cardiovascular (DC, VSsis, Rsis) da cascavel *Crotalus durissus*, em comparação à adrenalina, o que pode ser resultado de uma baixa afinidade da PE com os receptores alfa-adrenérgicos nessa espécie. De maneira semelhante, o teiú não exibiu bradicardia significativa em resposta a todas as doses de PE, o que pode ser atribuído em parte ao alto tônus vagal no coração desses animais, pois diminuições drásticas na f_H durante episódios hipertensivos poderiam comprometer a homeostase cardíaca (ZENA et al., 2016). Nenhuma dessas hipóteses, no entanto, foi testada nos trabalhos citados. Além disso, a anatomia cardíaca dos répteis possibilita a ocorrência de desvios intracardíacos durante episódios hipertensivos. Sendo assim, outra explicação para a não ocorrência de bradicardia significativa em todas as injeções de PE é a possibilidade de elevação do DC para a circulação sistêmica (*net shunt* D-E), a fim de evitar altas pressões no circuito pulmonar (ZENA et al., 2016).

O método da sequência forneceu valores de ganho similares ao método farmacológico em animais intactos. Isso indica que o método da sequência é tão eficaz quanto o método farmacológico para o estudo da sensibilidade barorreflexa. Os métodos, no entanto, possuem diferenças importantes. A injeção de drogas vasoativas no método farmacológico causa estímulos diretos nos barorreceptores presentes nas grandes artérias do sistema circulatório, que é maior que o esperado em condições fisiológicas, quando o animal está em repouso (PARLOW et al., 1995). O método da sequência possui a vantagem de não necessitar o uso de drogas vasoativas e refletir a sensibilidade barorreflexa em condições fisiológicas, no entanto, retrata apenas um trecho da porção linear da curva barorreflexa. Apenas métodos farmacológicos fornecem a amplitude da f_H , os platôs da curva sigmoide e ganho no intervalo médio (PAM50) permitindo assim, melhor caracterização dos limites do barorreflexo em cada indivíduo (PARLOW et al., 1995).

Embora os métodos farmacológicos sejam amplamente utilizados na fisiologia comparada eles representam certa dificuldade metodológica em relação ao método da sequência. O estudo do barorreflexo em situações dinâmicas (SDA, alterações de temperatura) pode ser dificultado através do método farmacológico quando há necessidade de replicação dos protocolos de injeção de fármacos vasoativos. Em primeiro lugar, o tempo de recuperação de cada injeção pode ser longo e variar de indivíduo para indivíduo. Em segundo lugar, as múltiplas injeções de fármacos vasoativos também podem causar sensibilização de receptores e/ou debilitar os animais de pesquisa. Esses problemas podem ser resolvidos pelo método da

sequência, através do qual o registro pode ser repetido quantas vezes necessário sem causar prejuízo aos animais.

Dessa maneira, os métodos farmacológicos fornecem valores limítrofes dos parâmetros cardiovasculares em resposta a eventos de bradicardia e taquicardia. Isso pode ser importante para se conhecer as variações nos limiares do mecanismo barorreflexo entre diferentes espécies de vertebrados, no entanto, se o interesse for o estudo do mecanismo barorreflexo em condições fisiológicas e sob menor influência possível de manipulações farmacológicas, o método da sequência é mais indicado. Ainda, em alguns casos, a combinação dos dois métodos pode fornecer resultados confiáveis e complementares para o entendimento do barorreflexo.

As características do barorreflexo nas cascavéis foi similar à de outras espécies de répteis da ordem Squamata descritas na literatura (ZENA et al., 2016; BERGER, 1980). Além disso, as cascavéis apresentaram reflexos pronunciados em resposta a hipotensão, o que também é consistente com o observado em crocodilos e lagartos (HAGENSEN et al., 2010; ZENA et al., 2016).

5.2. Avaliação do uso de um animal descerebrado como modelo

No presente estudo foi observado que a descerebração não alterou parâmetros cardiovasculares basais, como PAM e f_H , em consistência com o observado em procedimentos semelhantes realizados em mamíferos (CHAI et al., 1963; KORNER e WHITE, 1969; LEE et al., 2002). Os animais descerebrados não apresentaram P_a e f_H diferentes dos animais intactos.

Além disso, a sensibilidade barorreflexa e os parâmetros barorreflexos (método farmacológico) foram similares entre animais descerebrados e intactos, indicando que o barorreflexo se mantém funcional e com a mesma magnitude de resposta, mesmo na ausência de regiões encefálicas superiores. Em gatos, Chai et al (1963) em que a remoção de áreas encefálicas superiores, incluindo o hipotálamo manteve as respostas barorreflexas funcionais. Além disso, estímulos no bulbo dorsal causam igual aumento da força contrátil do coração quando comparados com animais intactos, sendo assim esse aumento não depende de estruturas diencefálicas e de nível mediano dos colículos. Em anfíbios anuros (WANG et al., 2004), a descerebração não elimina reflexos cardiovasculares em resposta a alterações ventilatórias. De maneira similar, na cascavel sul americana, a região do tronco encefálico é grande responsável pela integração do sistema cardiovascular no SNC.

O NTS, no entanto, envia e recebe projeções de estruturas superiores do telencéfalo e do prosencéfalo, como a amígdala e o hipotálamo, respectivamente e que estão intimamente relacionadas a funções autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais (LOEWY e SPYER,

1990). Na cascavel, a remoção dessas estruturas superiores levou a um aumento da sensibilidade barorreflexa e índice de efetividade barorreflexa em sequências BEI positivas obtidas pelo método da sequência. Isso pode indicar que a remoção de áreas encefálicas superiores, pode retirar influências centrais que estariam sobrepondo o barorreflexo em parte de sua atuação. Isso se manifesta especificamente em eventos espontâneos de elevação de pressão gerando mais recrutamento cardíaco e respostas pontuais de maior magnitude. Esse aspecto seria manifestado em eventos espontâneos de alteração de pressão e, portanto, não exerceria influencia na aferição do barorreflexo pelo método farmacológico. Assim, em animais descerebrados, o método da sequência parece superestimar a sensibilidade barorreflexa, pois a remoção das áreas superiores encefálicas retiraria aspectos do controle autonômico e neuroendócrino do SNC, que influenciam o barorreflexo.

Apesar disso, a descerebração manteve o barorreflexo funcional, de maneira similar ao descrito em estudos que se utilizam de drogas vasoativas ou outros métodos que evocam alterações de P_a em mamíferos (LEE et al., 2002; KORNER et al., 1969; CHAI et al., 1963). Estes resultados sobre a manutenção dos ajustes basais e manutenção do barorreflexo é importante, pois atesta que a remoção das estruturas encefálicas superiores foi eficiente e que esse procedimento mantém o animal sem reações de estresse e dor. Esse ponto é fundamental, em situações de distresse, ativação do mecanismo de luta e fuga, ou mesmo nocicepção ou estresse mental, o mecanismo barorreflexo é normalmente reduzido ou inibido, podendo-se observar aumento da P_a e taquicardia resistente (ABRAM et al., 1983; NOSAKA, 1996).

5.3. Efeito do uso da anestesia (isoflurano)

Em mamíferos (LEE et al., 2002; POTERACK et al., 1991) e répteis (MOSLEY e SMITH, 2004) o isoflurano causa diminuição dos valores basais de PAM e f_H . Na cascavel sul americana, o isoflurano causou diminuição da PAM sis basal, mas a f_H não sofreu alterações significativas. Anestésicos voláteis tem diversos efeitos no sistema cardiovascular, dentre eles ações cronotrópicas e inotrópicas negativas no coração (BOSNJAK e KAMPINE, 1983), alterações nos tônus simpático e parassimpático (SKOVSTED et al., 1970) e dilatação do músculo liso vascular (SCHMELING e FARBER, 1994), que podem afetar o controle barorreflexo. Em ratos (LEE et al., 2002), a descerebração mantém as respostas depressoras do barorreflexo causadas pelo isoflurano, indicando as regiões pontinas são as principais envolvidas no mecanismo de ação do isoflurano. Além disso, o isoflurano causa diminuição parâmetros barorreflexos, como amplitude da f_H , dos platôs e da sensibilidade barorreflexa (LEE et al., 2002). De maneira similar, na cascavel foi observado que o isoflurano mantém sua ação depressora mesmo na

ausência de regiões encefálicas superiores. Essa depressão pareceu afetar consideravelmente o mecanismo barorreflexo em resposta a eventos de hipertensão e hipotensão, pois na maioria dos animais não foi possível observar uma resposta clara da f_H a tais alterações. Sendo assim, não foi possível caracterizar o efeito do isoflurano na curva barorreflexa sigmoide, bem como o cálculo da sensibilidade barorreflexa nos animais anestesiados.

Sundin et al., 2001 já havia apontado o problema da utilização de anestésicos voláteis durante a coleta de dados, pois observou que descargas neurais de receptores pulmonares em tartarugas anestesiadas com halotano são suprimidas. Dessa maneira, sugeriu que anestésicos inaláveis não devem ser utilizados em estudos de respostas neurais reflexas ou de descargas neurais. Nas cascavéis descerebradas, o isoflurano parece anular os reflexos neurais para correção de alterações na Pa. Dessa maneira, pesquisas com medições de Pa que utilizam animais anestesiados ou com pouco tempo de recuperação da anestesia devem ser suas conclusões tomadas com cautela pois o anestésico afeta a PAM sis basal dos animais, bem como a eficiência do mecanismo barorreflexo em tamponar alterações da Pa.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- a. O método da sequência é uma boa ferramenta para estudo do barorreflexo.
- b. A descerebração não elimina respostas autonômicas, como o barorreflexo.
- c. A sensibilidade barorreflexa pode ser superestimada quando calculada através do método da sequência em animais descerebrados.
- d. O anestésico isoflurano (3%) compromete o mecanismo barorreflexo em cascavéis, abolindo respostas de f_H em resposta a alterações de Pa.

7. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – número do processo 1692101. Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte ao projeto (2018/05035-0) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fisiologia Comparada (INCT Fiscomp) pelos equipamentos e estrutura. Agradecemos também ao Instituto Butantan – SP Brasil, pela doação de animais e ao suporte oferecido por Gustavo Marega Oda no manuseio e manejo dos animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDALA, A. P. L.; RYBAK, I. A.; SMITH, J. C.; PATON, J. F. R. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem–spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **J Physiol.**, v. 587, n.14, p. 3539–3559, jun. 2009.

ABRAM, S. E.; KOSTREVA, D. R.; HOPP, F. A.; KAMPINE, J. P. Cardiovascular responses to noxious radiant heat in anesthetized cats. **American Physiological Society.**, v. 245, p. R576-80, out. 1983.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012.

ALTIMIRAS, J.; FRANKLIN, C. E.; AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 2235-2242, jul. 1998.

ANDRADE, D. V.; CRUZ-NETO, A. P.; ABE, A. S. Meal size and specific dynamic action in the rattlesnake *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae). **Herpetologica.**, v. 53, p. 485–493, dez. 1997.

ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; ABE, A. S.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H. Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake *Python molurus*. **J. Comp. Physiol.**, v.184B, p. 903–912, jul. 2014.

BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biological Reviews.**, v. 60.2., p. 121-162, out. 1985.

BAGSHAW, R. J.; COX, R. H. Nitrous oxide and the baroreceptor reflexes in the dog. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica.**, v. 26, p. 31-38, ago. 1982.

BENNETT, R. A. A Review of Anesthesia and Chemical Restraint in Reptiles. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine.**, v. 22, n. 3, p. 282-303, set. 1991.

BERTINIERI, G.; RIENZO, D. M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U.; PEDOTTI, A., MANCIA, G. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. **Journal of hypertension.**

Supplement: official journal of the International Society of Hypertension., v.3., p. S79-81. 1985.

BERGER, P. J.; GIBBINS, I. L.; HARDS, D. K.; CROSBY, L. J. The distribution and ultrastructure of sensory elements in the baroreceptor region of the truncus arteriosus of the lizard *Trachydosaurus rugosus*. **Cell Tissue Res**, v. 226, p. 389-406, set. 1982.

BERGER, P. J.; EVANS, B. K; SMITH, D. G. Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard *Trachydosaurus rugosus*. **J. Exp. Biol.**, v. 86, p. 197-209, ago. 1980.

BONATH, K. Halothane inhalation anaesthesia in reptiles and its clinical control. **Internacional Zoo Yearbook.**, v. 19, p. 112-125, 1978.

BLESSING, W.W. Depressor neurons in rabbit caudal medulla act via GABA receptors in rostral medulla. **Am J Physiol (Heart Circ Physiol 23)**., v. 254, n. 4, p. H686-92, abril. 1988.

BOSNJAK, Z.; KAMPINE, J. P. Effects of halothane, enflurane. and isoflurane on the SA node. **Anesthesiology.**, v. 58, 3 p.14-321, 1983.

CHAI, C. Y.; SHARE, N. N.; WANG, S. C. Central control of sympathetic cardiac augmentation in lower brain stem of the cat. **Am. J. Physiol.**, v. 205 p.749-53, out. 1963.

CROSSLEY, D.; ALTIMIRAS, J.; WANG, T. Hypoxia elicits an increase in pulmonary vasculature resistance in anaesthetised turtles (*Trachemys scripta*). **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 3367-337, nov. 1998.

CUBAS, Z. S. SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo, Roca, 2006.

DI RIENZO, M.; CASTIGLIONI, P.; MANCIA, G.; PEDOTTI, A.; PARATI, G. Advancements in estimating baroreflex function. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine.**, v. 20.2, p. 25-32, mar/abr. 2001.

DOBSON, K. L.; HARRIS, J. A detailed surgical method for mechanical decerebration of the rat. **Experimental Physiology**. v. 97.6., p. 693–698, jun. 2012.

DONALD, J. A.; O'SHEA, J. E.; LILLYWHITE, H. B. Somatostatin and the innervation of the heart of the ratsnake, *Elaphe obsoleta*. **Am. J. Physiol.**, v. 258., p. R1001- R100, maio. 1990.

DOURSOUT, M. F.; CHELLY, J. E. Effects of basal anaesthesia on cardiac function. **Br. J. Anaesth.**, v. 60, p. 119S-122S, 1988.

FILOGONIO, R., WANG, T.; TAYLOR, E. W.; ABE, A. S.; LEITE, C. A. C. Vagal tone regulates cardiac shunts during activity and at low temperatures in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 186(8), p. 1059-1066, dez. 2016.

GALLI, G. L. J.; SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; TAYLOR, E. W.; WANG, T. The adrenergic regulation of the cardiovascular system in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. **Comparative Biochemistry and Physiology.**, v. 148, p. 510-520, jun. 2007.

GALLI, G.; SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; TAYLOR, E. W.; WANG, T. The role of nitric oxide in the regulation of the systemic and pulmonary vasculature of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 175(3), p.201-8, abr. 2005.

GENTLE, M. J. Pain-related behaviour following sodium urate arthritis is expressed in decerebrate chickens. **Physiol Behav.**, v. 62, n. 3, p. 581–584, set. 1997.

HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 156., p. 458-462, ago. 2010.

HICKS, J. W. The physiological and evolutionary significance of cardiovascular shunting patterns in reptiles. **News Physiol. Sci.**, v. 17, p. 241-245, dez. 2002.

HOHNKE, L. A. Regulation of arterial blood pressure in the common green iguana. **American Journal of physiology.**, v. 228, n. 2, fev.1975.

JENSEN, B.; ABE, A. S.; ANDRADE, D. V.; NYENGAARD, J. R.; WANG, T. The Heart of the South American Rattlesnake, *Crotalus durissus*. **Journal of morphology.**, v. 271, p.1066–1077, fev. 2010.

JENSEN, B.; MOORMAN, A. F. M.; WANG, T. Structure and function of the hearts of lizards and snakes. **Biological Reviews.**, v. 89, p. 302-336, maio. 2014.

JENSEN, B.; VAN DER BERG, G.; VAN DEN DOEL, R.; OOSTRA, R-J.; WANG. T.; MOORMAN, A. F. M. Development of the Hearts of Lizards and Snakes and Perspectives to Cardiac Evolution. **PLoS ONE.**, v. 8(6), p. e6365, jun. 2013.

KORNER, P. I.; UThER, J. B.; WHITE, S. W. Central nervous integration of the circulatory and respiratory responses to arterial hypoxemia in the rabbit. **Circ Res.**, v. 24, p. 757–76, jun. 1969.

LEE, J. S.; MORROW, D.; ANDRESEN, M. C.; CHANG, K. S. Isoflurane Depresses Baroreflex Control of Heart Rate in Decerebrate Rats. **Anesthesiology.**, v. 96, p. 1214–22, maio. 2002.

LEITE, C. A. C.; TAYLOR, E. W.; WANG, T.; ABE, A. S.; ANDRADE, D. O. V. Ablation of the ability to control the right-to-left cardiac shunt does not affect oxygen uptake, specific dynamic action or growth in the rattlesnake *Crotalus durissus*. **J. Exp. Biol.**, v. 216, p.1881–1889, jan. 2013.

LILLYWHITE, H. B.; DONALD, J. A. Neural regulation of arterial blood pressure in snakes. **Physiol. Zool.**, v. 67, n. 6, p.1260–1283, nov/dez. 1994.

LILLYWHITE, H. B.; SEYMOUR, R. S. Regulation of arterial blood pressure in Australian tiger snakes. **J. Exp. Biol.**, v 75, p. 65-79, out. 1978.

LOEWY, A.; SPYER, M. **Central Regulation of Autonomic Functions.** Oxford University Press, New York, p. 168-187, 1990.

LIU, J. C. Tonic inhibition of thermoregulation in the decerebrate monkey (*Saimiri sciureus*). **Experimental neurology**, v. 64. p. 632-648, dez.1978.

MILLARD, R. W.; MOALLI, R. Baroreflex sensitivity in an amphibian, *Rana catesbeiana*, and a reptilian, *Pseudemys scripta elegans*. **J. Exp. Zool.**, v. 213, n. 2, p.283-288, ago. 1980.

MILSOM, W. K.; LANGILLE, B. L.; JONES, D. R. Vagal control of vascular resistance in the turtle, *Chrysemys scripta*. **Can. J. Zool.**, v. 55, p. 359-367, set. 1977.

MORISSON, S. F.; NAKAMURA, K.; MADDEN, C. J. Central control of thermogenesis in mammals. **Exp. Physiol.**, v. 93, p. 773-797, maio/jul. 2008.

MOSLEY, C. A; DYSON, D.; SMITH, D. A. The cardiovascular dose-response effects of isoflurane alone and combined with butorphanol in the green iguana (*Iguana iguana*). **Vet Anaesth Analg.**, v. 31, n.1, p. 64-72, jan. 2004.

NOSAKA, S. Modifications of arterial baroreflexes: obligatory roles in cardiovascular regulation in stress and poststress recovery. **Japanese Journal of physiology**, v. 46, p. 271-288, ago. 1996.

OOSTING, JAN.; STRUIJKER-BOUDIER, H. A. J.; JANSSEN, B. J. A. Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats. **Journal of Hypertension**, v. 15, p. 391-399, jan. 1997.

PARATI, G.; POMIDOSSI, G.; RAMIREZ, A.; CESANA, B.; MANCIA, G. Variability of the haemodynamic responses to laboratory tests employed in assessment of neural cardiovascular regulation in man. **Clinical science**, v. 69, p.533-540, nov.1985.

PARLOW, J.; VIALE, J. P.; ANNAT, G.; HUGHSON, R.; QUINTIN, L. Spontaneous Cardiac Baroreflex in Humans Comparison with Drug-Induced Responses. **Hypertension**, v. 25, p. 1058-1068, maio. 1995.

PICKERING, A. E.; PATON, J. F. R. A decerebrate, artificially-perfused in situ preparation of rat: Utility for the study of autonomic and nociceptive processing. **Journal of Neuroscience Methods.**, v. 115., p. 260–271, jan. 2006.

POTERACK, K. A.; KAMPINE, J. P.; SCHEMLING W. T. Effects of isoflurane, midazolam, and etomidate on cardiovascular responses to stimulation of central nervous system pressor sites in chronically instrumented cats. **Anesth Analg.**, v.73, p.64–75, jul. 1991.

REID, I. A. Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. **News Physiol. Sci.**, v. 1, p.270-274, 1996.

SAPRU, H. N.; KRIEGER, A. J. Cardiovascular and respiratory effects of some anesthetics in the decerebrate rat. **European Journal of Pharmacology.**, v.53, p. 151-158, set.1979.

SCHEMELING, W. T.; FARBER, N. E.; Anesthetic Actions on Cardiovascular Control Mechanisms in the Central Nervous System. **Advances in Pharmacology.**, v. 31, p. 617-642, 1994.

SEYMOUR, S.; LILLYWHITE, H. B. Blood pressure in snakes from different habitats. **Nature.**, v.264, p. 664-666, dez. 1976.

SHELTON, G.; BURGGREN, W. W. Cardiovascular dynamics of the Chelonia during apnoea and lung ventilation. **J. exp. Biol.**, v.64, n.2, p. 323-43, abr. 1976.

SILVERMAN, J.; GARNETT, N. L.; GISZTER, S. F.; HECKMAN, C. J.; KULPA-EDDY, J. A.; LEMAY, M. A.; PERRY, C. K.; PINTER, M. Decerebrate Mammalian Preparations: Unalleviated or Fully Alleviated Pain? A Review and Opinion. **Contemporary topics. The American Association for Laboratory Animal Science.**, v. 44, n. 4, p. 34-36, jul. 2005.

SKALS, M.; SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; WANG, T. Venous tone and cardiac function in the South American rattlesnake *Crotalus durissus*: mean circulatory filling pressure during adrenergic stimulation in anaesthetised and fully recovered animals. **J. exp. Biol.**, v. 208, p. 3747-3759, out. 2005.

SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; ANDRADE, D. O. V.; WANG, T. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and pulmonary blood pressures. **Am J Physiol-Reg I.**, v. 289, p. R1280–R1288, 2005.

SKOVSTED. P.; PRICE, M. L.; PRICE, H. L. The effects of short-acting barbiturates on arterial pressure, preganglionic sympathetic activity and barostatic reflexes. **Anesthesiology.**, v. 33, p. 10- 18, jul. 1970.

STEFFEY, E. P.; HOWLAND, D. Isoflurane potency in the dog and cat. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p.1833-1836, 1977.

STRIEDTER, G. F. Evolution of the hippocampus in reptiles and birds. **J Comp Neurol.**, v. 524(3), p. 496-517, fev. 2016.

SUNDIN, L.; BURLESON, M.; WANG, T.; REID, S.; SALGADO, H.; ABE, A. S; GLASS, M.; MILSOM, W. Pulmonary receptors in reptiles: discharge patterns of receptor populations in snakes versus turtles. **J. Comp. Physiol B.**, v. 171, p. 103-111, dez. 2001.

TAMBOURGI, D. V.; BIZERRA, A. F.; QUEIROZ, G. P. IBAÑEZ, O. C. M.; SANTORO, M. L.; **Manual Prático sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório.** Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, p. 45-61, 2010.

TAYLOR, E. W; ANDRADE, D. V; ABE, A. S; LEITE, C. A. C; WANG, T. The unequal influences of the left and right vagi on the control of the heart and pulmonary artery in the rattlesnake, *Crotalus durissus*. **J. Exp. Biol.**, v. 212, p. 145–151, ago. 2009.

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

TAYLOR, E.W.; LEITE. C.A.C.; MCKENZIE, D. J.; WANG, T. Control of respiration in fish, amphibians and reptiles. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43(5), p. 409-424, maio. 2010.

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

VLIET, B. N. V.; WEST, N. H. Phylogenetic Trends in the Baroreceptor Control of Arterial Blood Pressure. **Physiological Zoology**., v. 67, p. 1284-1304, nov/dez. 1994.

WANG, T.; FERNANDES, W.; ABE, A. S. Blood pH e O₂ homeostasis upon CO₂ anesthesia in the rattlesnake (*Crotalus durissus*). **The Snake**., v. 25, p. 777-784, 1993.

WANG, T.; TAYLOR, E. W.; REID, S. G.; MILSOM, W. K. Interactive effects of mechano- and chemo-receptor inputs on cardiorespiratory outputs in the toad. **Respiratory Physiology & Neurobiology**., v. 140, p. 63-76, jan. 2004.

WAXMAN, S.; PRADOS, A. N.; LUCAS, J. J.; ANDRES, M. I. S.; REGNER, P.; OLIVEIRA, V. C.; ROODT, A.; RODRÍGUEZ, C. Pharmacokinetics of Enrofloxacin and Its Metabolite Ciprofloxacin after Single Intramuscular Administration in South American Rattlesnake (*Crotalus Durissus Terrificus*). **Pak Vet J.**, v. 35(4), p. 494-498, jan. 2015.

WOOLF, C. L Long Term Alterations in the Excitability of the Flexion Reflex Produced by Peripheral Tissue Injury in the Chronic Decerebrate Rat. **Pain**., v. 18, p. 325-343, out. 1984.

ZENA, L. A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; BÍCEGO, K. C. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard (*Salvator merianae*). **J. exp. Biol.**, v. 219, p. 725-733, dez. 2016.

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