



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 O₂ chemoreceptors induced elevations in f_H and changes in net shunt. These tests attest that diverse populations of baroreceptors, O₂ 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

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 inervado 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 inerva 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, inervam 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 inervação adrenérgica no coração, os répteis Squamata também possuem extensa inervação 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).

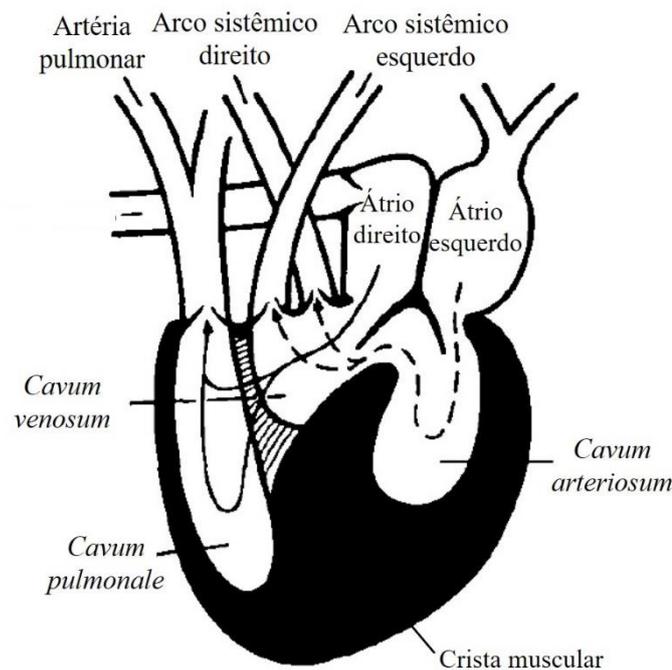


Figura 2: Ilustração esquemática do coração de um quelônio. As setas contínuas indicam períodos de ventilação (respiração aérea), no qual o sangue venoso entra pelo átrio direito durante a diástole e segue para as câmaras ventriculares, *cavum venosum* e em seguida para o *cavum pulmonale*, a partir 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).

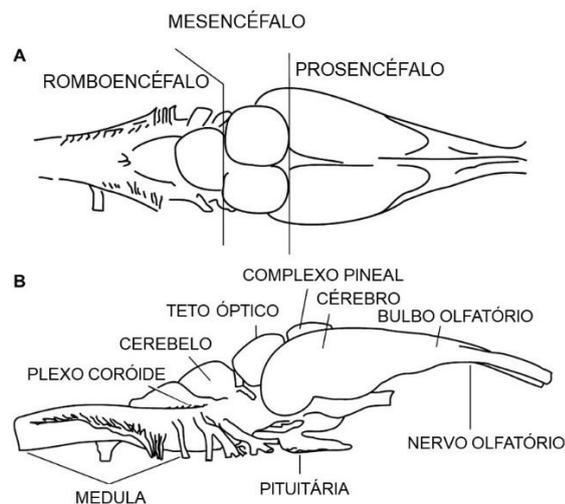


Figura 3. Diagrama da estrutura encefálica de tartarugas e lagartos. **A)** Vista dorsal das grandes regiões do encéfalo **B)** Vista lateral com os maiores componentes externos (Modificado de Wyneken, 2007)

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 teleosteos (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 mecánísticas.

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.

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.

FRITSCHÉ, 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).

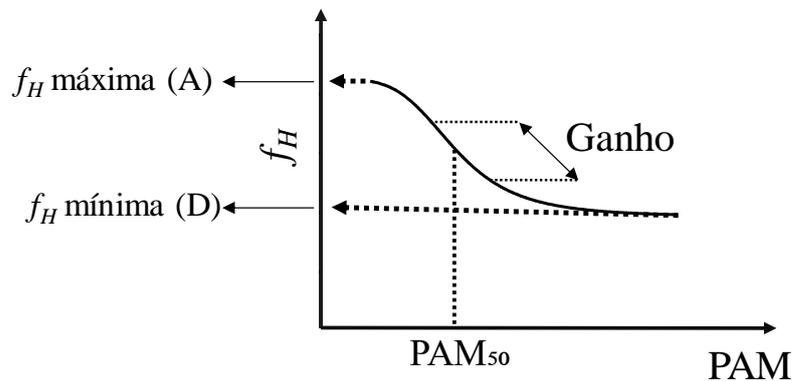


Figura 1. Curva barorreflexa, indicando parâmetros resultantes da aplicação do método farmacológico. Na ordenada, estão indicados a frequência cardíaca máxima (A), a frequência cardíaca mínima (D). No eixo x, a PAM_{50} corresponde ao valor da PAM a 50% da amplitude da f_H . O ganho é a medida utilizada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

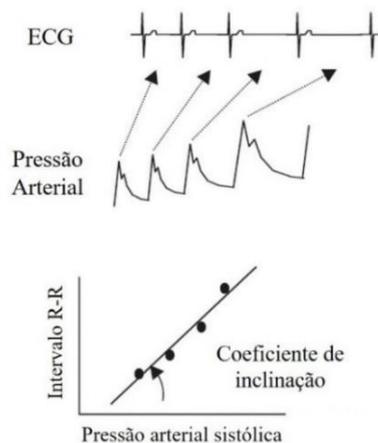


Figura 2. O método da sequência. A parte superior da figura ilustra uma sequência barorreflexa positiva, na qual a PAS e intervalo RR aumentam. Abaixo, a representação gráfica através da qual é obtida a regressão linear da sequência barorreflexa. A sensibilidade barorreflexa é obtida através da média 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.

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 P_a .

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.

SCHEMLING, 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.