



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP

**Ajustes cardiovasculares em modelo experimental descerebrado, cascavel sul
americana (*Crotalus durissus*)**

Driele Tavares

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP

**Ajustes cardiovasculares em modelo experimental descerebrado, cascavel sul
americana (*Crotalus durissus*)**

Driele Tavares

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em ciências fisiológicas.

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Driele Tavares, realizada em 03/12/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Cleo Alcântara Costa Leite (UFSCar)

Prof. Dr. Luciano Rivaroli (UFSJ)

Prof. Dr. André Luis da Cruz (UFBA)

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo (UNESP)

Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro (USP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

*“Ao meu passado
Eu devo o meu saber e a minha ignorância
As minhas necessidades, as minhas relações
A minha cultura e o meu corpo
Que espaço o meu passado deixa para a minha liberdade hoje?
Não sou escrava dele”*

Amarelo, azul e branco
(ANAVITÓRIA, Rita Lee)

Dedico:

Aos meus pais:
Regina e Roberto

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio, suporte e compreensão pelos dias distantes.

Ao meu orientador Dr. Cleo Alcantara Costa Leite, pelo suporte, grandes explicações e aulas com muita paciência, otimismo e amor pela ciência. Obrigada por me permitir embarcar nesse projeto.

À minha orientadora Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela confiança, apoio incondicional, incentivo e cuidado, serei eternamente grata!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (proc. 168061/2017-1) e à FAPESP (proc. 2018/05035-0), pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Instituto Butantan pela parceria e fornecimento dos animais.

Ao tecnólogo Gustavo Marega Oda, pelos cuidados com os animais, ensinamentos de manejo, equipamentos, softwares e apoio na realização das cirurgias.

Aos demais funcionários do departamento sempre prestativos e solícitos, Sr. Ângelo, Carmem, Dona Graça, Dona Bete.

Às alunas Samanta e Gabriella que iniciaram os trabalhos com a cascavel descerebrada e me ensinaram tudo com bastante paciência.

Ao amigo e colega de profissão Lucas Zena, por toda troca de experiências e conhecimentos, apoio e risadas.

Aos demais colegas do Laboratório de Biologia Experimental pela grande ajuda ao longo da jornada, sendo auxiliando as cirurgias, discutindo dados, montando setup, fazendo faxina ou churrasco.

Aos amigos e colegas de laboratório (e programa): Lívia, Cibele, Samanta, Gustavo, Sofia, Pri Siqueira, Fabrício, Natália Viana, Natália Portruneli, Vicente, Mariana, Polly, Henrique, Carol, DW, Eliton, Nathan, Rocco, Noeli, Israel, Z, Michelly, Elisa, Mari, Renato

e tantos outros que passaram pela minha vida nesses longos anos de pós. Todo meu carinho e gratidão!

À “minha aluna” Sofia, por acreditar e confiar em mim e sempre me incentivar. Espero que essa parceria se repita um dia. Seu entusiasmo pela ciência me inspira!

Um agradecimento especial à colega de laboratório e grande amiga, Lívia, por toda ajuda no lab, muita coisa não seria tão fácil sem seu apoio e espírito de equipe. Agradeço também aos momentos de risadas e choros ao longo dos anos dividindo o Apartamento 12. À parceria para atravessar a pandemia com o mínimo de sanidade mental. Aos bólos e lanchos e vinhos e pacaemba e máscaras e álcool em gel!

Ao amigo Gu, mais do que um tecnólogo, um ombro amigo pra todas as horas, uma enciclopédia ambulante, um apoio fundamental. Sou imensamente grata por todos os momentos ao lado de umas das pessoas mais generosas que eu conheci. Um biólogo excepcional. Exemplo de profissional. Espero, um dia, poder trabalhar novamente ao seu lado! Valeuuuuu Guuuuuuu!

Às minhas amigas de Baurucity: Tati, Gih e Dessa, todo meu amor e gratidão pela distração de tudo relacionado ao trabalho! Rs

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

“A grandeza de um homem não está na quantidade de riqueza que ele adquire, mas em sua integridade e habilidade de afetar positivamente as pessoas ao redor.”

Bob Marley

RESUMO

A classe dos répteis ocupa posição importante dentre os vertebrados para investigações acerca da evolução dos mecanismos modulatórios no sistema cardiovascular. Alguns estudos cardiovasculares são desenvolvidos com medições *in situ*, em modelos experimentais sob anestesia terminal. Infelizmente, esta abordagem compromete as respostas cardiovasculares por suprimir as modulações autonômicas. O presente trabalho avalia a efetividade de um novo modelo experimental para estudos cardiovasculares em Squamatos, utilizando animais descerebrados. O modelo permite o registro de diversas variáveis fisiológicas em uma preparação de animal eutanasiada com o sistema nervoso autonômico (SNA) funcional, livres de interferentes anestésicos. Para que a preparação descerebrada seja considerada efetiva, são necessários diversos níveis de validações que observam: a capacidade de recuperação do SNA; a integridade desse sistema na situação experimental; sua capacidade de processar e coordenar respostas perante desafios; seu grau de similaridade com o animal intacto; assim como o tempo de viabilidade funcional da preparação. Assim, trabalhamos com os seguintes objetivos: (1) avaliar o perfil da progressão de recuperação pós-cirúrgica dos valores médios dos parâmetros cardiovasculares em repouso e sua estabilidade ao longo do tempo; (2) avaliar o nível de recuperação pós-cirúrgica da modulação autonômica de um mecanismo cardiovascular complexo, como o barorreflexo; (3) avaliar o perfil da progressão de recuperação pós-cirúrgica autonômica, refletido por índices modulatórios, como Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) e barorreflexo; (4) avaliar a capacidade de resposta e adaptação do SNA na regulação hemodinâmica das preparações submetidas à desafios hemodinâmicos. Observamos que as preparações foram capazes de manter parâmetros cardiovasculares médios em repouso, estáveis e em nível similar aos de animais intactos. Com a preparação, foi possível realizar instrumentação de alta complexidade, registrar um grande número de parâmetros concomitantes e integrá-los. Os índices barorreflexos, representativos de processos modulatórios autonômicos complexos, foram recuperados ao nível observado por animais intactos em repouso, 3 dias após a cirurgia. Os indicadores modulatórios autonômicos utilizados (barorreflexo e VFC) perduram estáveis por pelo menos 15 dias. As preparações foram capazes de realizar ajustes hemodinâmicos complexos em resposta a desafios hemodinâmicos e estímulos de quimiorreceptores após longo período depois do procedimento cirúrgico. A aplicação de anestesia altera o perfil de respostas modulatórias aos desafios nas mesmas condições, comprovando a persistência dos processos autonômicos. Concluimos que o modelo é representativo, por ser capaz de manter parâmetros cardiovasculares estáveis e similares a animais intactos; é útil, por ser capaz de prover registro de múltiplas variáveis, de recuperar modulações autonômicas em nível similar ao de animais intactos; e viável para procedimentos de longo prazo, por manter tais capacidades por longo tempo após a eutanásia.

Palavras-chave: cascavel, descerebração, sistema nervoso autônomo, barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca, cardiovascular, anestesia.

ABSTRACT

The reptile class has considerable importance among vertebrates for investigations about the evolution of modulatory mechanisms in the cardiovascular system. Some cardiovascular studies have been performed with *in situ* measurements and experimental models under terminal anesthesia. Unfortunately, this approach compromises cardiovascular responses by suppressing autonomic modulations. The present study analyzes the effectiveness of a new experimental model for cardiovascular studies in Squamates using decerebrate animals. The model allows recording several physiological variables on an animal preparation euthanized with a functional autonomic nervous system (ANS), free of anesthetic interferences. For the decerebrate preparation to be considered adequate, several levels of validations are needed that observe: the ANS's ability to recover; the integrity of that system throughout the experimental process; its ability to process and coordinate responses to challenges; its degree of similarity with the intact animal, as well as the functional viability time of the preparation. Thus, we had the following objectives: (1) to evaluate the profile of the progression of post-surgical recovery on the mean values of cardiovascular parameters at rest and its stability over time; (2) to assess the post-surgical recovery level of the autonomic modulation of a complex cardiovascular mechanism, such as the baroreflex; (3) to assess the profile of the progression of autonomic post-surgical recovery, reflected by modulatory indices, such as Heart Rate Variability (HRV) and baroreflex; (4) to evaluate the ANS's responsiveness and adaptation of the hemodynamic regulation of preparations submitted to hemodynamic challenges. We observed that the preparations maintained mean cardiovascular parameters at rest stable and similar to those of intact animals. Furthermore, with the preparation, it was possible to accomplish highly complex instrumentation, record a large number of concomitant parameters and integrate them. Baroreflex indices, representative of complex autonomic modulatory processes, were recovered to the level observed on intact animals at rest three days after surgery. The autonomic modulatory indicators used (baroreflex and HRV) remained stable for at least 15 days. The preparations were able to perform complex hemodynamic adjustments in response to hemodynamic challenges and chemoreceptor stimuli for an extended period after the surgical procedure. The anesthesia procedure changed the profile of modulatory responses to challenges under the same conditions, proving the persistence of autonomic processes. We conclude that the model is representative of the species, as it can maintain the cardiovascular parameters similar to those of intact animals. It is a valuable model because it allows for multiple variables recording. It is viable for long-term procedures, as it maintains these capabilities for a long time after euthanasia.

Keywords: rattlesnake, decerebration, autonomic nervous system, baroreflex, heart rate variability, cardiovascular, anesthesia.

LISTA DE AREVIATURAS

ANS - sistema nervoso autônomo

BEI - índice de eficiência barorreflexa

BRS – sensibilidade barorreflexa

C - complacência vascular

CO - débito cardíaco

ECG - eletrocardiograma

EPM – erro padrão da média

Fe – fenilefrina

f_H - frequência cardíaca

G_{50} – ganho barorreflexo

G_{op} – ganho operacional barorreflexo

G_{pul} : condutância pulmonar

G_{sys} : condutância sistêmica

IP – intervalo de pulso

NaCN – cianeto de sódio

\dot{Q}_{LaO} - fluxo do arco sistêmico esquerdo

PAM_{pul} - pressão arterial média pulmonar

PAM_{sys} - pressão arterial média sistêmica

PCO_2 - pressão parcial de dióxido de carbono

PSD - densidade espectral de potência

\dot{Q}_{pul} - fluxo sanguíneo pulmonar

\dot{Q}_{sis} - fluxo sanguíneo sistêmico

RMSSD - Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre intervalos NN adjacentes

RRI - intervalo R-R entre batidas

SDNN - Desvio Padrão de todos os intervalos NN

SNP – nitroprussiato de sódio

VFC - variabilidade da frequência cardíaca

V_{stot} - volume sistólico total

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema representativo do coração de répteis não crocodilianos. (Driele Tavares)..... | 21 |
| Figura 2. Esquema simplificado da circulação de répteis não crocodilianos. (Driele Tavares) | 22 |
| Figura 3. Esquema simplificado do desvio intracardíaco (DÍc). (Driele Tavares) | 23 |
| Figura 4. Exemplar de Cascavel Sul Americana, <i>Crotalus durissus</i> . (Foto: Gustavo Marega Oda) | 34 |

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Figura 1. Parâmetros cardiovasculares e barorreflexos ao longo do tempo após cirurgia em cascavéis intactas, <i>Crotalus durissus</i>. Os valores foram obtidos pelo Método da Sequência de análise barorreflexa. (a) frequência cardíaca - f_H ; (b) pressão arterial média - PAM; (c) ganho barorreflexo operacional - G_{op} ; (d) índice de eficiência barorreflexa - BEI. Os valores são médias \pm EPM. Letras diferentes denotam diferença estatística (One-Way ANOVA/Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$)..... | 52 |
| Figura 2. Parâmetros cardiovasculares e barorreflexos ao longo do tempo após cirurgia em cascavéis descerebradas, <i>Crotalus durissus</i>. Os valores foram obtidos pelo Método da Sequência de análise barorreflexa. (a) frequência cardíaca - f_H ; (b) pressão arterial média - PAM; (c) ganho barorreflexo operacional - G_{op} ; (d) índice de eficiência barorreflexa - BEI. Os valores são médias \pm EPM. Letras diferentes denotam diferença estatística (One-Way ANOVA/Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$)..... | 53 |
| Figura 3. Valores do barorreflexo entre os grupos experimentais, cascavéis não descerebradas e preparações descerebradas após a recuperação. A - Valores médios de ganho barorreflexo operacional (G_{op}) e ganho barorreflexo máximo (G_{50}), 72h após a cirurgia: coluna preta - cascavéis não descerebradas; coluna cinza - preparações descerebradas. B - Curvas barorreflexas sigmóides médias obtidas com o método farmacológico: linha preta - cascavéis não descerebradas; linha cinza - preparações | |

descerebradas. Setas pontilhadas indicam G_{op} . Setas contínuas indicam G_{50} . Os valores são médias \pm EPM. Letras diferentes denotam valores diferentes. (Two-Way ANOVA/Tukey; $P < 0,05$; $n = 6$).....54

CAPÍTULO 2

Figura 1. Passos do processo de descerebração em cascavel sul-americana *Crotalus durissus*. Sequências de imagens do dorso da cabeça de cascavel (682,54g) através de campo cirúrgico, onde observa-se: A, indicação da área de incisão (seta vermelha); B, incisão rostro-caudal medial; C, abertura do crânio com visão do vaso central; D, visão do teto óptico após cauterização do vaso e abertura das meninges; E, cavidade remanescente após cauterização e retirada do tecido nervoso; F, cavidade preenchida para estabilização. Escala 5mm.....75

Figura 2. Imagens de encéfalo de cascavel não descerebrada, *Crotalus durissus* (898,75 \pm 264,75g). A - Imagem da superfície do SNC, vista dorsal; B - imagem da superfície do SNC, vista lateral; C - histologia do SNC, secção coronal na região medial; D - histologia do SNC, secção sagital na região medial. Linha tracejada indica área de corte no processo de descerebração. Ce - cerebelo, Hc- hemisférios cerebrais, Bu - bulbo, Bo - bulbos olfatórios, Qo - quiasma óptico, To - teto óptico, Po - ponte, Me - medula espinhal. Coloração Tricrômio de Masson.....76

Figura 3. Imagens de encéfalo de cascavel descerebrada, *Crotalus durissus* (682,54). - Imagem da superfície do SNC, vista dorsal; A - imagem da superfície do SNC; B - imagem da superfície do SNC, vista lateral; C - histologia do SNC, secção coronal na região medial; D - histologia do SNC, secção sagital na região medial. Seta vermelha indica uma área da secção para descerebração. Ce - cerebelo, Bu - bulbo, To - teto óptico, Po - ponte, Me - medula espinhal. Coloração Tricrômio de Masson.....77

Figura 4. Variação da frequência cardíaca média (f_H - Painel A) e densidade espectral (PSD - Painel B) ao longo do tempo, após procedimento de descerebração em cascavéis, *Crotalus durissus*, a 30°C. Círculos são valores médios \pm EPM. O tempo zero é a primeira hora após a cirurgia. Letras diferentes indicam medias diferentes (Kruskal-Wallis - Dunns's, $P < 0,05$, $n = 10$).....78

CAPÍTULO 3

Figura 1. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra *Head Lift*. A) f_H – frequência cardíaca; B) DC – débito cardíaco; C) PAMsis – pressão arterial média sistêmica; D) PAMPul – pressão arterial média pulmonar. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).....105

Figura 2. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra *Head Lift*. A) \dot{Q}_{sis} – fluxo sanguíneo sistêmico; B) \dot{Q}_{pul} – fluxo sanguíneo pulmonar; C) G_{sis} – condutância sistêmica; D) G_{pul} – condutância pulmonar; E) V_{stot} – volume sistólico total e F) $\dot{Q}_{pul} \cdot \dot{Q}_{sis}$ – taxa de desvio sanguíneo. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).....106

Figura 3. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra *Tail Lift*. A) f_H – frequência cardíaca; B) DC – débito cardíaco; C) PAMsis – pressão arterial média sistêmica; D) PAMPul – pressão arterial média pulmonar. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).....108

Figura 4. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra *Tail Lift*. A) \dot{Q}_{sis} – fluxo sanguíneo sistêmico; B) \dot{Q}_{pul} – fluxo sanguíneo pulmonar; C) G_{sis} – condutância sistêmica; D) G_{pul} – condutância pulmonar; E) V_{stot} – volume sistólico total e F) $\dot{Q}_{pul} \cdot \dot{Q}_{sis}$ – taxa de desvio sanguíneo. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada

sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).....109

Figura 5. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano perante desafio de quimiorrecepção ao NaCN. A) f_H – frequência cardíaca; B) DC – débito cardíaco; C) PAMsis – pressão arterial média sistêmica; D) PAMPul – pressão arterial média pulmonar. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).....111

Figura 6. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano perante desafio de quimiorrecepção ao NaCN. A) \dot{Q}_{sis} – fluxo sanguíneo sistêmico; B) \dot{Q}_{pul} – fluxo sanguíneo pulmonar; C) G_{sis} – condutância sistêmica; D) G_{pul} – condutância pulmonar; E) V_{stot} – volume sistólico total e F) $\dot{Q}_{pul} \cdot \dot{Q}_{sis}$ – taxa de desvio sanguíneo. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).....112

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros cardiovasculares e do barorreflexo no estabelecimento da recuperação e ao final do protocolo experimental. Os valores foram obtidos com o Método da Sequência de análise barorreflexa.....54

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros de VFC ao longo do tempo após descerebração em cascavel, *C. durissus*, a 30°C78

Tabela 2. Parâmetros cardiovasculares de preparações de cascavel (*Crotalus durissus*), descerebradas estáveis, a 25°C, com e sem anestesia inalatória (2% de isoflurano) e 24h após descerebração.....79

Tabela 3. Barorreflexo em grupos experimentais de cascavéis descerebradas, *Crotalus durissus*: preparação estável e preparação anestesiada (2% de isoflurano).....80

Tabela 4. Parâmetros cardiovasculares de estudos prévios em cascavel (*Crotalus durissus*), com e sem anestesia82

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 20 |
| 1.1 Coração e circulação dos répteis | 20 |
| 1.2 Controle cardiovascular pelo SNA e mecanismos regulatórios | 23 |
| 1.3 Encéfalo reptiliano..... | 28 |
| 1.4 Estresse animal, dor e interferentes cirúrgicos | 29 |
| 1.5 Descerebração | 32 |
| 1.6 Cascavel..... | 33 |
| 2. OBJETIVOS..... | 35 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 35 |
| 2.2 Objetivos específicos | 35 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

CAPÍTULO 1 - A modulação autonômica do modelo de cascavel descerebrada (*Crotalus durissus*) é similar à do animal não-descerebrado

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 46 |
| 2. Material e métodos | 47 |
| 2.1 Animais experimentais..... | 47 |
| 2.2 Preparação animal e descerebração..... | 47 |
| 2.3 Instrumentação para o barorreflexo..... | 48 |
| 2.4 Registros e protocolo experimental..... | 49 |
| 2.5 Análises barorreflexas..... | 49 |
| 2.6 Análise estatística | 50 |
| 3. Resultados..... | 51 |

| | | |
|-----|--|----|
| 3.1 | Barorreflexo ao longo do tempo | 51 |
| 3.2 | Cascavel não descerebrada x preparação descerebrada após estabilização | 53 |
| 4. | Discussão | 55 |
| 5. | Considerações Finais..... | 59 |
| 6. | Referências | 60 |

CAPÍTULO 2 - Recuperação e persistência da modulação autonômica em cascavéis descerebradas (*Crotalus durissus*)

| | | |
|-----|--|----|
| 1. | Introdução | 66 |
| 2. | Matérial e métodos | 68 |
| 2.1 | Animais experimentais..... | 68 |
| 2.2 | Descerebração e registro de ECG..... | 68 |
| 2.3 | Anatomia e histologia | 70 |
| 2.4 | Variáveis cardiovasculares | 70 |
| 2.5 | Protocolo experimental e análise de dados | 71 |
| 2.6 | Análise estatística | 73 |
| 3. | Resultados..... | 74 |
| 3.1 | Anatomia e histologia | 74 |
| 3.2 | Modulação autonômica após descerebração | 77 |
| 3.3 | Parâmetros cardiovasculares em repouso em animais descerebrados | 78 |
| 3.4 | Modulação cardiovascular autonômica oferece suporte ao barorreflexo..... | 80 |
| 3.5 | O efeito da anestesia sobre os parâmetros cardiovasculares..... | 80 |
| 4. | Discussão | 83 |
| 5. | Considerações finais..... | 90 |
| 6. | Referências | 90 |

**CAPÍTULO 3 - Modulação cardiovascular em cascavéis (*Crotalus durissus*)
descerebradas: viabilidade da preparação para protocolos longos**

| | |
|---|-----|
| 1. Introdução..... | 99 |
| 2. Materiais e métodos | 100 |
| 2.1 Animais experimentais..... | 100 |
| 2.2 Cirurgias de descerebração e instrumentação | 100 |
| 2.3 Protocolo experimental | 102 |
| 2.4 Análise de dados e estatística..... | 103 |
| 3. Resultados..... | 104 |
| 3.1 Redução da perfusão cefálica..... | 104 |
| 3.2 Aumento de retorno venoso | 107 |
| 3.3 Estímulos de quimiorreceptores | 110 |
| 4. Discussão | 113 |
| 5. Considerações finais..... | 117 |
| 6. Referências | 117 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 123 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Coração e circulação dos répteis

O coração dos répteis tem despertado interesse por décadas. Isto acontece não só pela sua morfologia complexa, mas também pela capacidade de desviar frações de fluxo sanguíneo entre os dois circuitos, sistêmico ou pulmonar, a cada ciclo. Tal desvio sanguíneo intracardíaco daria suporte a uma série de ajustes fisiológicos importantes para a homeostasia (Hicks, 2002). Este é um assunto que se mantém sob intenso debate ao longo dos anos.

Estruturalmente o coração dos squamatos é constituído por um seio venoso contrátil em grande parte das espécies; dois átrios, um esquerdo (AE) e um direito (AD), separados completamente por um septo, além de um ventrículo. O ventrículo único é uma estrutura complexa, subdividida em três câmaras interconectadas denominadas *cavum pulmonale* (CP), *cavum venosum* (CV) e *cavum arteriosum* (CA). Uma estrutura denominada crista muscular separa o CP das demais câmaras e sua borda dorsolateral não oclui a luz do ventrículo, permitindo comunicação entre as câmaras. Assim, é possível que volume de sangue arterial ou venoso sejam bombeados de volta ao circuito de onde vieram, caracterizando um desvio sanguíneo intracardíaco (Hicks e Comeau, 1994). Três grandes vasos originam-se do ventrículo, a artéria pulmonar (AP), arco sistêmico direito (AoD) e arco sistêmico esquerdo (AoE). A artéria pulmonar surge a partir do CP e as aortas do CV. Assim que emerge do coração o AoD se divide em subclávias e artérias carótidas e um terceiro ramo do AoD (braquiocefálico) se une ao AoE para formar a aorta dorsal (Hicks, 1994).

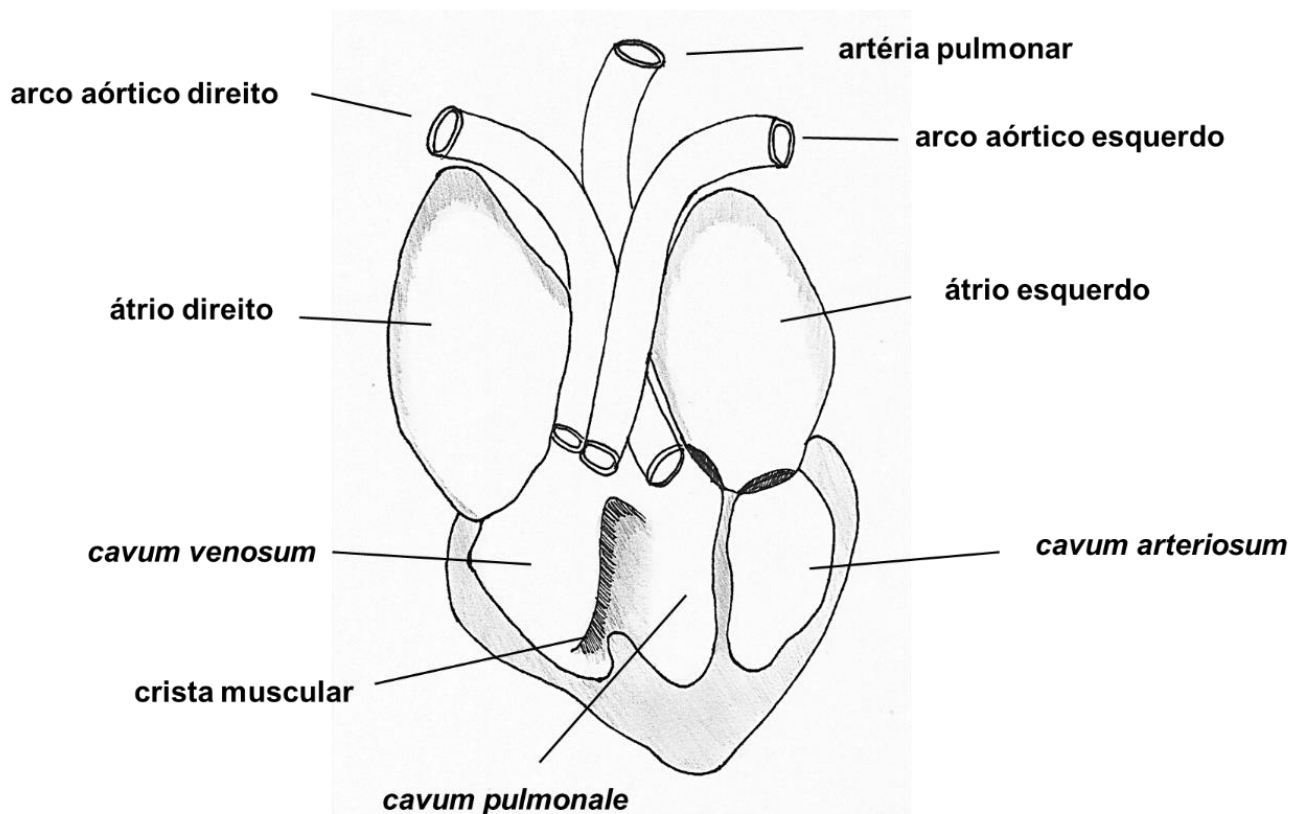


Figura 1. Esquema representativo do coração de répteis não crocilianos. (Driele Tavares).

Na circulação desses animais, o sangue arterial oxigenado chega ao AE pelas veias pulmonares. O sangue venoso sistêmico, desoxigenado, chega através das veias cavas ao coração pelo seio venoso que se abre no AD. Durante a diástole ventricular, o sangue venoso vindo do AD é preferencialmente direcionado ao CP passando pela crista muscular que o separa do CV. Nesta fase, o sangue rico em oxigênio entra preferencialmente no CA vindo do AE. Durante a sístole ventricular, o sangue é ejetado nas artérias sistêmicas proveniente do CA passando pelo CV. O sangue venoso é preferencialmente bombeado para o pulmão pela artéria pulmonar, vindo do CP. No momento inicial da sístole, a contração do músculo cardíaco faz com que a crista muscular feche essa comunicação entre CV e CP, causando separação entre o circuito sistêmico e o pulmonar até o próximo ciclo (Wang et al., 1997; Jensen, et al., 2010).

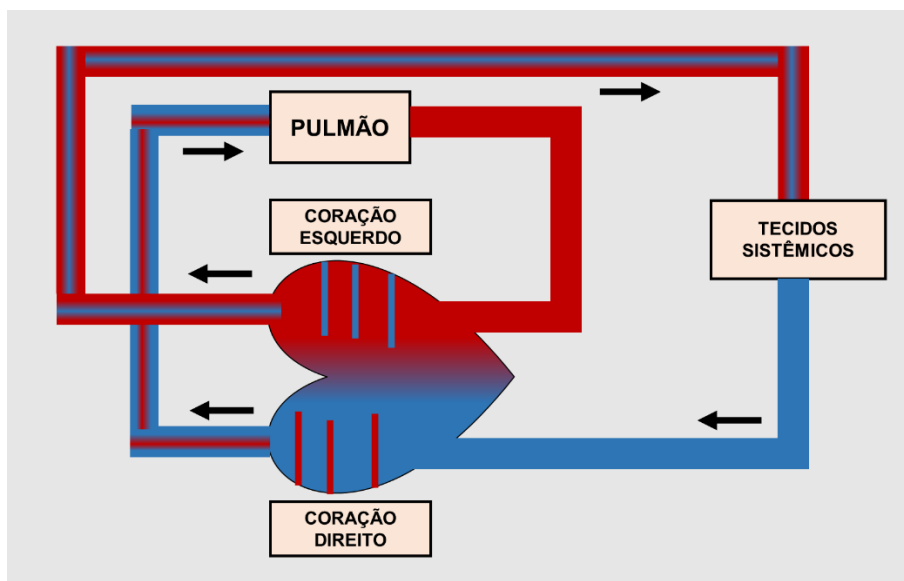


Figura 2. Esquema simplificado da circulação de répteis não crocodilianos. (Driele Tavares)

Os desvios sanguíneos são definidos de acordo com sua direção, como sendo da direita para a esquerda (D-E) ou da esquerda para a direita (E-D). O desvio D-E representa recirculação de sangue sistêmico (pobre em oxigênio) de volta a circulação arterial sistêmica. Uma vez que este volume de sangue não passa pelos pulmões, a porção desviada não tem chance de ser reoxigenada. Em contraste, o desvio E-D representa a recirculação do sangue pulmonar (rico em oxigênio) para a circulação pulmonar com efeito oposto sobre a PO_2 arterial sistêmica. Os desvios podem ocorrer simultaneamente a cada ciclo cardíaco, por mecanismos de pressão ou de lavagem de forma que é possível ambos desvios em um mesmo ciclo cardíaco (Hicks, 2002; Hicks e Wang, 1996, 2012). Direção e magnitude do desvio podem ser afetadas pela modulação autonômica da resistência periférica dos circuitos sistêmico e pulmonar, e pela atividade vagal na regulação colinérgica na resistência arterial central, no circuito pulmonar (Hicks, 1994). A relação entre as resistências periféricas dos circuitos sistêmico e pulmonar e, principalmente, a constrição da artéria pulmonar, definem o quanto de sangue recirculará em cada circuito. Uma resistência pulmonar baixa favorece o desvio sanguíneo E-D. Alta resistência pulmonar favorece o desvio sanguíneo D-E (Eme et al., 2009, 2010; Leite et al., 2013, 2014; Burggren et al, 2020).

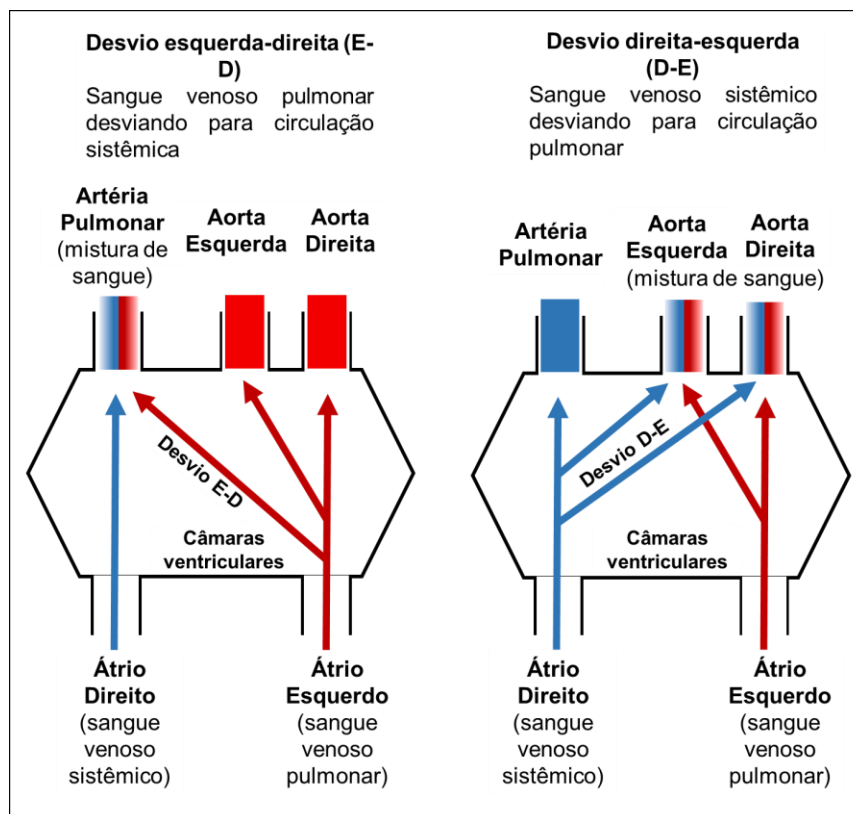


Figura 3. Esquema simplificado do desvio intracardíaco (DIc). (Driele Tavares).

1.2 Controle cardiovascular pelo SNA e mecanismos regulatórios

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) é o grande responsável pela modulação das funções fisiológicas não-voluntárias que dão suporte à vida. O coração dos répteis é innervado por ramos nervosos adrenérgicos excitatórios do SNA-simpático e pelos ramos inibitórios colinérgicos do SNA-parassimpáticos. Esta inervação alcança os átrios, incluindo a região do marca-passo, e o ventrículo (Wang et al., 2001a,b). A função parassimpática é exercida principalmente pelo nervo vago, que desempenha um papel importante na função autonômica em répteis innervando coração, traqueia, pulmões, vasculatura pulmonar e coronariana, dentre outros (Taylor et al., 1999). Em seu ramo aferente, o vago leva informações dos quimiorreceptores de O_2 presentes no arco aórtico e dos receptores de CO_2 dentro do pulmão, dentre diversas outras. O ramo eferente inclui inervação do coração, músculo liso pulmonar e o esfíncter ao redor da artéria pulmonar (Altimiras et al., 1997; Wang et al., 2001a,b).

O desempenho cardíaco sofre grande efeito de dois parâmetros funcionais: a frequência cardíaca e o volume sistólico. Estes são controlados por fatores neurais com a inervação do marca-passo e músculo cardíaco e fatores não neurais, como a distensão tecidual causada pelo enchimento cardíaco (mecanismo de Frank-Starling) ou substâncias circulantes (hormônios). Diversas substâncias possuem influência na modulação do trabalho cardíaco.

O efeito da modulação adrenérgica no coração e de outras partes do sistema circulatório (ex.: via catecolaminas, tais como epinefrina e norepinefrina) também parece ser uma característica filogeneticamente antiga. A influência das catecolaminas circulantes liberadas por células cromafins distribuídas difusamente desempenham um papel significativo nos vertebrados. O tecido cromafín é comum em ciclóstomos e está intimamente associado aos gânglios simpáticos organizados por segmentos em elasmobrânquios e, em grande parte, em teleósteos e anfíbios (Laurent et al., 1983). Estudos em cascavéis demonstraram que a estimulação adrenérgica leva à efeitos sistêmicos, como vasoconstrição e diminuição na condutância vascular. Isto redireciona o sangue para o circuito pulmonar. Um efeito menos pronunciado desta modulação foi visto na vasculatura pulmonar, sugerindo que a determinação do desvio se deve primariamente ao controle adrenérgico na condutância sistêmica (Galli et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados por Overgaard e colaboradores (2002) em *Trachemys scripta*.

O controle vagal colinérgico inibitório do coração (na qual o principal neurotransmissor é a acetilcolina) é uma característica de todos os vertebrados. Este estímulo parece desempenhar papel importante no controle do desvio cardíaco em répteis cuja vasculatura pulmonar possui uma inervação vasoconstrictora colinérgica (Wang et al., 2001; Skovgaard e Wang, 2006). Como foi observado por Hicks (1994) após estimulação parassimpática vagal em *Pseudemys scripta*, ocorreu um aumento do desvio D-E. Em cascavéis (*in situ*), Taylor e colaboradores (2009) observaram que a estimulação elétrica eferente do vago esquerdo provoca contração da artéria pulmonar. Análises histológicas comprovaram ampla inervação parassimpática ao longo da artéria pulmonar (Filogonio et al., 2020). Corroborando com esses achados, a vagotomia do ramo esquerdo em cascavéis foi responsável pelo aumento em 70% do fluxo pulmonar e aumento na f_H (frequência cardíaca) (Leite et al., 2013, 2014) Portanto, o nervo vago tem um papel significativo na regulação da resistência vascular pulmonar e hemodinâmica.

No coração, a modulação autonômica, além de definir a f_H , determina as oscilações instantâneas no intervalo entre batimentos cardíacos consecutivos - intervalo R-R (RR_i) (Task Force, 1996). O resultado dessa modulação ao longo do tempo é chamado de Variabilidade de Frequência Cardíaca (VFC) (Altimiras, 1999). A VFC está presente em peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (Taylor et al., 1999, 2014; Zena et al., 2017; Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). Em peixes, a importância da modulação pelo nervo vago nas variações da atividade cardíaca foi atestada por Campbell e colaboradores (2006), que observaram após vagotomia em *Myoxocephalus scorpius*, elevação da f_H e desaparecimento da VFC. Leite e colaboradores (2009) observaram que o nervo vago tem um papel predominante no controle da frequência cardíaca média e em variações de RR_i em pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Em anfíbios, Zena e colaboradores (2017) demonstraram a presença da VFC em sapos cururus. Além disso, foi observado que esses animais exibem interações cardiorrespiratórias viabilizadas por modulação vagal do coração acoplando o trabalho cardíaco aos ciclos ventilatórios. Modulações semelhantes foram observadas em cascavel (Sanches et al., 2019) e teiú (Duran et al., 2020) evidenciando que as modulações de VFC para produzir interações cardiorrespiratória foram mantidas ao longo da evolução. A vagotomia (física ou química) em cascavel, assim como em outros répteis resulta em taquicardia, perda da VFC e conseqüentemente de tais interações (Wang et al., 2001; Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020).

Essas modulações se desenvolvem ao longo do período embrionário uma vez que os receptores colinérgicos e adrenérgicos aparecem no coração no início do desenvolvimento (Taylor et al., 2014) refletindo o efeito de múltiplas influências autonômicas concomitantes sobre a f_H de modo que a existência e persistência da VFC reflète a ocorrência dos múltiplos processos autonômicos em um animal em repouso.

A modulação autonômica também é responsável pelo mecanismo barorreflexo que atua na regulação rápida das flutuações da pressão arterial. Os barorreceptores, proprioceptores transmuralis fásicos, são ativados pelo estiramento das paredes vasculares em decorrência das oscilações de pressão arterial ao longo de cada ciclo cardíaco. Sua ativação é processada centralmente e resulta em processos compensatórios que envolvem alterações de atividade cardíaca, alterações de resistência vascular periférica e do retorno venoso (Cowley et al., 1973; Kirchheim, 1976; Guyenet, 2006; La Rovere et al., 2008). Estudos com desnervação de barorreceptores demonstraram sua importância na regulação em parâmetros cardiovasculares com incapacidade de manutenção de níveis estáveis de

pressão arterial média (PAM) e f_H (Lataro et al., 2010; Rodrigues et al., 2011; Armelin et al., 2016; Castania et al., 2019).

A presença do barorreflexo foi relatada em diferentes classes de vertebrados, desde peixes, (Sandblom e Axelsson, 2005; Armelin et al., 2016; 2021), anfíbios (West e Van Vilet, 1994; Zena et al., 2015), répteis (Millard e Moali, 1980; Hagensen et al., 2010; Zena et al., 2016), aves (Smith, 1994) e mamíferos (Coleman, 1980; Silva et al., 2019). Em trabalho recente, Filogonio e colaboradores (2019) demonstraram a presença do barorreflexo em cascavéis e outros squamatas. Assim como a VFC, o mecanismo barorreflexo parece ter sido altamente conservado ao longo da evolução.

Os barorreceptores de baixa pressão, localizados na artéria pulmonar, átrio e ventrículo, também fazem parte da regulação barorreflexa. Eles são ativados durante a distensão atrial e são sensíveis às alterações de volume sanguíneo (Zoller et al., 1972; Thrasher, 1994). Esse mecanismo e receptores já foram bem descritos em mamíferos (Hisdal et al., 2001; Oga et al., 2018). Infelizmente não há descrição desses barorreceptores em répteis.

Dentre outros reflexos com influência hemodinâmica, destacamos o reflexo de Cushing. Este é amplamente descrito em mamíferos (McGilliduddy et al., 1978; Paton et al., 2009; Schmidt et. al., 2018), mas nenhum relato na literatura foi encontrado com descrição desse mecanismo em répteis. Por definição, este reflexo ocorre em resposta ao aumento da pressão intracraniana (PIC) e ocasiona aumento na pressão arterial. Esta tende a ser ajustada para um nível ligeiramente acima da PCI a cada momento. Há evidências acerca do papel das catecolaminas nesta resposta. O aumento da PA pode ser mediado pela vasoconstrição α -adrenérgica e estimulação cardíaca β -adrenérgica (Galli et al., 2007). Esse reflexo é um importante recurso para preservar o tecido cerebral e evitar problemas de isquemia. Embora não se tenha determinado a localização exata dos centros que coordenam o reflexo de Cushing, há a hipótese de que o Núcleo do Trato Solitário seja o local onde os sinais são interpretados. Esta região participa do controle de funções respiratórias e outras regulações cardiovasculares. O mecanismo de transdução no tronco cerebral também permanece desconhecido. Pesquisadores acreditam que o mecanismo de Cushing compõe o grupo de reflexos que agem para a homeostasia da pressão arterial (McGilliduddy et al., 1978; Dickinson, 1990; Osborns, 2005; Paton et al., 2009; Schmidt et. al., 2018).

Outros mecanismos de curto prazo para regulação da PAM podem envolver diversos ajustes reflexos e possuem ação sobre o débito cardíaco (DC), alterando tanto f_H quanto o volume de ejeção sistólica. Ou ainda, eles podem modular a contratilidade dos vasos, afetando o retorno venoso, ampliando ou reduzindo a complacência e resistência vascular, entre outros fatores (Guyton, 1955). Situações cotidianas ou patológicas, como em casos de hipotensão ou alteração postural, são controladas rapidamente pelos mecanismos barorreflexos.

Outros fatores também são importantes. O mecanismo de Frank-Starling é um exemplo de um mecanismo não-reflexo que possui papel fundamental no controle cardiovascular. Pode se dizer que ele representa uma característica intrínseca do músculo cardíaco e é uma importante resposta fisiológica de curto prazo relacionada com a capacidade do coração em modificar sua contratilidade se adaptando às variações de retorno venoso. Quanto maior o volume a ser bombeado, maior a força de contração. Este mecanismo já foi descrito em peixes (Altimiras e Axelsson, 2004; Amelio et al., 2013; Imbrogno et al., 2014), anfíbios (Gleeson et al 1980; McKean et al., 1997; Hedrick et al., 1999), aves (Grubb, 1982; Peters et al., 2005), répteis (Gleeson et al., 1980; Franklin e Axelson, 1994; Franklin, 1994; Farrell et L., 1994; Wang et al., 2002; Keen et al., 2016) e mamíferos (Methawasin et al., 2014). Em cascavéis foi observado que o aumento do retorno venoso causado pela elevação do volume sanguíneo gerou um pequeno aumento no volume sistólico (V_{stot}). Contudo, foi experimentalmente demonstrado que o retorno venoso afeta fortemente o V_{stot} quando o volume de enchimento vascular é reduzido (ex.: em casos de depleção do volume sanguíneo). Este fato corrobora a conexão entre tais mecanismos (Skalls et al., 2005).

A regulação da pressão arterial também está diretamente relacionada com a ativação e resposta dos quimiorreceptores periféricos. Esses receptores, localizados na carótida e no arco aórtico, são sensíveis à diminuição de O_2 , aumento do CO_2 e queda de pH. Marshall (1994) destaca que os resultados de estudos com estimulação de quimiorreceptores podem ser conflituosos, especialmente dependendo das condições experimentais, como a utilização de ventilação mecânica ou não. A resposta primária da estimulação dos quimiorreceptores envolve taquicardia e vasoconstrição como efeito do aumento da atividade simpática. A resposta secundária com bradicardia e vasodilatação estão diretamente relacionadas com o reflexo causado pelos barorreceptores pulmonares em resposta à hiperventilação. Deste modo, a direção da mudança provocada pela estimulação dos quimiorreceptores carotídeos

tanto para resistência vascular periférica, como para a f_H , pode ser fortemente influenciada pela mudança ventilatória. A vasoconstrição pode ser considerada uma resposta primária à estimulação dos quimiorreceptores carotídeos, enquanto que a vasodilatação pode ser considerada secundária à um aumento na ventilação (Smatresk, 1990; Marshall, 1994; Prabhakar et al., 2015). Em répteis os quimiorreceptores possuem distribuição diferente dos mamíferos. Eles receptores são compostos por um conjunto de células *glomus* localizadas ao redor da carótida e suas ramificações, aorta e artéria pulmonar (Marshall, 1994; Milson e Burleson, 2007; Taylor et al., 2010; Reyes et al., 2015). Denis e colaboradores (2004) demonstraram que cascavéis expostas a elevadas concentrações de CO_2 apresentaram aumento na f_H e PAM.

As modulações e integrações do SNA possuem diferentes níveis de complexidade e muitos aspectos das interações do sistema nervoso encontrado em mamíferos parecem ter sido altamente conservados ao longo da evolução. A manutenção da homeostase corpórea exige que essas modulações funcionem em seu estado ótimo e a integridade dos componentes físicos que integram as respostas cardiovasculares é fundamental e, portanto, bom determinante de funcionamento do SNA. Embora a literatura seja ricamente abastecida com informações sobre os parâmetros cardiovasculares de cascavéis, a integração de múltiplos parâmetros desses animais em repouso merece maiores investigações.

1.3 Encéfalo reptiliano

A estrutura básica do sistema nervoso central dos animais é bastante similar entre os grupos (Northcutt, 2002). Grande parte das estruturas cerebrais de répteis são homólogas a dos mamíferos (Northcutt, 1967, 1981, 2002; Bruce, 2007). O encéfalo dos répteis é composto pelo telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e medula espinhal, possuindo formato tubular e linearmente organizado (Wyneken, 2007). O telencéfalo inclui os bulbos olfatórios, pedúnculos olfatórios e hemisférios cerebrais. O diencéfalo é relativamente menor que o telencéfalo e suas estruturas se localizam mais ventralmente ao encéfalo e inclui o tálamo e hipotálamo, infundíbulo, e ainda pelas glândulas pituitárias e pineal. Na região do tálamo, está presente o quiasma óptico. Mesencéfalo é constituído pelo teto óptico (porção dorsal), o tegumento (porção ventral), aqueduto cerebral e terceiro ventrículo. Dorsalmente, o rombencéfalo está localizado entre o teto óptico até a medula espinhal. Ventralmente, a medula oblonga ou bulbo, e é composta pelo cerebelo, quarto

ventrículo e núcleo de alguns nervos cranianos, dentre eles, trigêmeo, facial, glossofaríngeo e nervo vago (Northcutt, 1967, 2002; Bruce, 2007; Wyneken, 2007; Naumann et al., 2015). Em répteis, o encéfalo também possui a barreira hematoencefálica, composta por meninges (Wyneken, 2007).

O sistema nervoso pode ser estruturalmente dividido em sistema nervoso central e periférico. Funcionalmente, pode ser identificado o sistema nervoso autônomo (SNA). Sua estrutura se difere dos mamíferos, que possuem os nervos do SNA originados em regiões discretas (nervos simpáticos – região toracolombar e parassimpáticos- região crânio-sacral). Neste grupo, as raízes destes nervos surgem ao longo da estrutura da medula espinhal (Wyneken, 2007).

1.4 Estresse animal, dor e interferentes cirúrgicos

O estresse pode ter diferentes determinantes em animais e pode se fazer presente em situações como, manuseio, diferentes condições ambientais, disponibilidade de água e comida, temperatura, medo, dor, vida social, dentre outros (Blanchard et al., 2001). Independente da sua origem, o estresse pode acarretar alterações em parâmetros hormonais, fisiológicos e/ou comportamentais (Edes et al., 2018). Ele não é necessariamente danoso, mas parte do mecanismo de preparação para mudanças. Parâmetros cardiovasculares, que dão suporte a alterações metabólicas e mudanças no nível de atividade, podem ser alterados frente ao estresse agudo, como foi observado em ratos submetidos a manuseio, contenção e imobilização. Nestes animais, a f_H e PAM são elevadas nestas três diferentes manobras (Ondicova et al., 2019). O mesmo também foi observado sobre o estresse de manuseio em aves marinhas (*Calonectris leucomelas*). A f_H é elevada após o contato e este parâmetro só retorna à valores basais após 90 minutos de repouso (Müller et al., 2017). Neste mesmo estudo, utilizando análise da VFC, os autores atribuíram os resultados à elevação na atividade simpática do SNA.

Répteis também são susceptíveis às alterações fisiológicas decorrentes do estresse. Níveis plasmáticos de corticosterona têm sido um dos principais bioindicadores de estresse neste grupo (Guillette et al., 1995; Tyrrell e Cree, 1998; Moore et al., 2003). Captura e contenção em lagartos *Urosaurus ornatos* provocam diminuição nos níveis de testosterona e aumento na corticosterona (Moore et al., 1991). Nas serpentes *Agkistrodon contortrix* e

Pantherophis alleghaniensis, foi observado que o estresse de manuseio aumenta os níveis de lactato e diminuem o pH sanguíneo (Cerreta et al., 2020)

Assim como o estresse, a nocicepção também é capaz de alterar respostas fisiológicas. Este é um ponto complexo e de difícil análise, pois a nocicepção, a percepção de dor, as sensações de medo e também o distresse causado por estas, apesar de comporem mecanismos diferentes, possuem sinergismo e podem facilmente se confundir (Morton e Griffiths, 1985; Bateson, 1991). Em humanos, o córtex pré-frontal e tálamo são responsáveis pelo processamento em interpretação dos estímulos que causam dor (Groh et al., 2018; Ong et al., 2019). As amígdalas cerebrais, pelo medo (Feinstein et al., 2011). A origem primitiva do diencéfalo e do sistema límbico, sua persistência em grupos mais recentes de vertebrados, assim como alguns estudos funcionais, indicam que grupos não-mamíferos devem compartilhar os mesmos locais de processamento de dor (Mathews, 2008; LeBlanc et al., 2016; Groh et al., 2018; Silva e Seminowicz, 2019) e medo (Maren et al., 2001; Phelps e LeDoux, 2005).

A percepção de dor é de difícil caracterização devido a seu caráter subjetivo. Contudo, atualmente há protocolos estruturados sob conceitos éticos relevantes para analisar presença de dor, sua intensidade e suas consequências em parâmetros comportamentais e fisiológicos (Gatchel et al., 2007). Mamíferos, como: cachorros, gatos, coelhos e especialmente ratos e camundongos, são muito utilizados como modelo para o estudo da dor (Mogil, 2009; Jaggi et al., 2011). Em ratos, a dor aguda causada pela injeção de formalina na pata causa aumento na f_H média por 30 minutos. Contudo, tal alteração não é acompanhada por variação na PAM (Santuzi et al., 2013). Alterações semelhantes na f_H foram observadas por Charlet e colaboradores (2011). O aumento na f_H acompanhada de redução de VFC foi observado camundongos após laparotomia sem tratamento analgésico pós-cirúrgico (Arras et al., 2007). Desta forma, parâmetros cardiovasculares, bem como indicador de funcionamento/modulação autonômica, são indicadores comumente utilizados para avaliar resposta à dor.

A nocicepção pode ser definida como o mecanismo fisiológico de informação de lesões teciduais. Assim, ela envolve as vias pelas quais ocorre a percepção, transdução, transmissão e modulação dos sinais neurais gerados em resposta à um estímulo externo nocivo (Mosley, 2011; Perry e Nevarez, 2018). Os componentes neurais responsáveis pelo processamento/resposta de nocicepção têm sido descritos em répteis, em estudos mais

recentes (Stoskopf, 1994; Liang e Terashima, 1993; Machin, 2001). Comparações neuroanatomicas entre répteis e mamíferos sugerem que essa classe de animais possui estruturas que possibilitam a percepção da dor, embora esta seja subjetiva e possa variar de entre organismos e espécies (Mosley, 2011; Perry e Nevarez, 2018). Em estudo avaliando comportamento de resposta de tartarugas após injeção de formalina, Makau e colaboradores (2017) relataram que os animais aumentam consideravelmente o tempo de retirada do membro posterior após tensionamento muscular (as patas foram gentilmente esticadas com o uso de uma pinça) para quando comparada com os controles submetidos à injeções de salina ou dimetilsulfóxido, atestando a capacidade de sentir e reagir ao reflexo de dor causado pelo teste de formalina que atua via ativação direta das fibras nociceptoras.

Com a finalidade de abolir efeitos estressores, percepção de dor, integração de estímulos nociceptores e também, para respeitar questões éticas de bem-estar animal, alguns experimentos mais invasivos são executados sob o efeito de anestesia terminal. Contudo, muitos parâmetros fisiológicos podem ser alterados por anestésicos. No início dos anos 50, a preocupação dos efeitos adversos de anestésicos no sistema cardiovascular em humanos, especialmente durante cirurgias, foi testada e descrita para diversas substâncias e dosagens. Diversos efeitos foram descritos e dentre eles eram recorrentes as alterações na frequência cardíaca, pressão arterial e mecanismo barorreflexo (Johnstone, 1951; Gross et al., 1951; Imig, 1953; Robertson e Swan, 1957; Dundee e Black, 1960; Vatner, 1978).

Uma ampla variedade de anestésicos já foi utilizada em animais experimentais, sendo a cetamina e xilazina muito usada em roedores (Zandieh et al., 2003); benzocaína e triclaína, em peixes e anfíbios (Stoskopf, 1994; Machin, 2001); pentobarbital e anestésicos inalatórios, tais como halotano, sevoflurano e isoflurano, em répteis (Stoskopf, 1994; Machin, 2001).

Lee e colaboradores (2002) observaram que o anestésico isoflurano deprime o controle barorreflexo em roedores. Bagshaw e Cox (1982) relataram que o uso de óxido nítrico aumenta a atividade simpática eferente em cachorros. Blake e Korner (1982) observaram aumento na pressão arterial pelo efeito da cetamina em coelhos. Em répteis, estudos com cascavéis apontam que o uso do anestésico diminui o tônus vagal e eleva a atividade simpática, consequentemente aumentando a frequência cardíaca (Galli et al., 2005). Em tartarugas do deserto submetida ao sevoflurano, Rooney e colaboradores (1999), observaram diminuição nas pressões sistólica, diastólica e ventricular média, mas nenhuma alteração na frequência cardíaca. Assim, os anestésicos causam efeitos diversos na modulação cardiovascular e tais alterações devem ser consideradas a depender dos objetivos

da instrumentação. O efeito inibidor de anestésicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e especialmente SNA, tem sido um limitante importante para a investigação de questões mecânicas.

1.5 Descerebração

O Guia para Cuidado e Uso de Mamíferos em Neurociência e Pesquisa Comportamental da Academia Nacional de Ciência de Washington (Nacional Research Council, 2003), argumenta que processos que envolvem lesão cirúrgica para descerebração eliminam a possibilidade de percepção de dor, o que evita a necessidade de anestesia geral. Por exemplo, a descerebração foi utilizada para ablação da sensação de dor em gatos separando e inativando o córtex cerebral e o tálamo (Silverman et al., 2005). Modelos diversos com o uso de descerebração tem sido utilizado em espécies de mamíferos para estudos neurológicos clínicos que visam compreender os mecanismos espinhais envolvidos com a dor crônica (Dobson e Harris, 2012).

O procedimento de descerebração é utilizado desde antes de 1900 (Sherrington, 1898). Ao longo das décadas, os objetivos de sua utilização e as técnicas utilizadas foram sendo refinados. Experimentos acerca de rigidez muscular, avaliação posturais, reflexos, anestesia e respostas farmacológicas fazem parte das primeiras investigações utilizando a descerebração (Blake e Korner, 1982; Faber et al., 1982). A descerebração pode ser executada com uma grande diversidade de técnicas, como corte cirúrgico com bisturi e remoção manual do tecido remanescente, remoção por aspiração ou cauterização, ou lesão química (Dobson et al., 2012; Nakanishi e Whlan, 2012; Rocha et al., 2021). Também já foi denominado “descerebração”, a remoção dos hemisférios cerebrais (Fedde et al., 1977), do telencéfalo (Stehouwer, 1987; Uematsu e Todo, 1997) ou ainda, retirada do córtex, tálamo e hipotálamo (Faber et al., 1982).

Em protocolos de descerebração, a eutanásia é definida no momento do procedimento. Este processo gera alteração irreversível e assim, após o procedimento os animais estarão em um processo de deterioração progressiva de suas funções. Assim, as funções fisiológicas remanescentes e o tempo para tal deterioração em cada tipo de procedimento e espécie, são os aspectos que definem a relevância e uso do modelo para experimentação. Como ponto em comum, todas as variações de procedimento têm como propósito, a obtenção de uma preparação experimental eutanasiada e recuperada dos efeitos

anestésicos e assim, com funcionamento dos sistemas fisiológicos suficientemente capazes de fornecer dados e ser utilizado em uma pesquisa, pelo tempo necessário (Silverman et al., 2005).

1.6 Cascavel

A cascavel é uma serpente amplamente distribuída nas Américas. Na América do Sul, encontramos a espécie *Crotalus durissus*. No Brasil, essa espécie está presente em diferentes biomas como, cerrado, mata atlântica e caatinga. Ela encontra-se amplamente distribuída nos estados brasileiros (Wüster et al., 2005; Tozetti e Martins, 2008; Tozetti et al., 2009). Sua temperatura de preferência é 30° C (Filogonio et al., 2016) e possui comportamento de predação “senta-e-espera” (Whitford et al. 2018).

Além de sua ampla distribuição, a espécie possui algumas características fisiológicas e morfológicas interessantes para a experimentação: o baixo metabolismo, a ampla faixa térmica de atuação, a ausência de divisão toraco abdominal e apêndices, são aspectos que facilitam a instrumentação e aumentam a persistência funcional de uma preparação. A divisão incompleta dos ventrículos, um único e extenso pulmão, a presença de saco aéreo, inervação pulmonar unilateral também são aspectos interessantes à investigação (Jensen et al., 2013; Filogonio et al., 2020; Taylor et al., 2009; Leite et al., 2013, 2014). Isso permite a abordagem de questões funcionais relevantes para a compreensão dos circuitos sistêmico e pulmonar e de seu funcionamento conjunto.

A cascavel tem sido relevante à investigação funcional em squamatos. Há diversos estudos sobre seu metabolismo e hematologia (Andrade et al., 1997; Troiano et al., 2001; Arvedsen et al., 2005; Bovo et al., 2015) e fisiologia cardiovascular em diversas vertentes (Wang t al., 1998; Galli et al., 2004, 2005, 2007; Taylor et al., 2009; Leite et al., 2013, 2014; Filogonio et al., 2014, 2016, 2019a, 2019b, 2019c, 2020; Sanches et al., 2019; Rocha et al., 2021) o que nos permite ter ampla referência dos parâmetros analisados no presente trabalho.



Figura 4. Exemplo de Cascavel Sul Americana, *Crotalus durissus*. (Foto: Gustavo Marega Oda).

A espécie possui a seguinte classificação sistemática:

Reino: Animalia

Filo: Cordata

Classe: Reptilia

Ordem: Squamata

Subordem: Serpentes

Família: Viperidae

Gênero: Crotalus

Espécie: *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758).

O procedimento que avaliamos neste estudo é proposto para a investigação experimental de questões acerca da modulação cardiovascular no grupo dos Squamatos. Ele foi desenvolvido para lidar com a necessidade de instrumentação complexa e invasiva, com implantação de diversos sensores e sondas para monitoramento cardiovascular, em uma preparação com SNA funcional, sem os efeitos do processamento de estímulos de nociceptores ou os efeitos indesejados da anestesia sobre parâmetros cardiovasculares e suas regulações. O uso do animal descerebrado permite a captação de diversos parâmetros

concomitantemente (por exemplo, ventilatórios, cardiovasculares e metabólicos) uma vez que esse procedimento inativa o córtex cerebral e o tálamo mantendo o SNA intacto bem como todas as funções fisiológicas controladas por ele e, fundamentalmente, evitando dor e estresse podendo ser considerada uma alternativa para procedimentos realizados sob anestesia terminal (Silverman et al., 2005). Ainda de acordo com Silverman, após ablação do sistema tálamo-cortical, não há evidências que indiquem processamento central de qualquer dos reflexos envolvidos com nocicepção em mamíferos descerebrados.

O uso da descerebração em répteis como modelo de estudo para processos fisiológicos pode ser uma excelente ferramenta para compreensão de mecanismos que atualmente são realizados sob efeito de anestesia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de recuperação da modulação autonômica cardiovascular em *Crotalus durissus* após descerebração e instrumentação para determinar a viabilidade do modelo.

2.2 Objetivos específicos

Determinar se o modelo é útil, por ser capaz de prover registro de múltiplas variáveis, de recuperar modulações autonômicas em nível similar ao de animais intactos; e viável para procedimentos de longo prazo, conseguindo manter tais capacidades por longo tempo após a eutanásia.

- Estudar a representatividade dos dados gerados pelo modelo da cascavel descerebrada, avaliando a similaridade de seus parâmetros cardiovasculares em repouso e de modulações autonômicas complexas com dados obtidos de animais não descerebrados ou anestesiados.
- Estudar sua viabilidade em prover registros de múltiplos parâmetros cardiovasculares por longo prazo.

- Analisar as condições para utilização do modelo, traçando o perfil de recuperação de parâmetros cardiovasculares e da modulação autonômica após descerebração;
- Avaliar a duração do modelo, analisando a capacidade de modulação de resposta cardiovascular à desafios autonômicos longo tempo após a descerebração.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altimiras, J. e Axelson, M.** Intrinsic autoregulation of cardiac output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different heart rates. *Journal of Experimental Biology*, 207, 195–201 (2004).
- Altimiras, J.** Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? *Comparative Biochemistry Physiology Part A*, 124, 447–460, (1999).
- Altimiras, J., Aissaoui, A., Tort, L. and Axelsson, M.** Cholinergic and Adrenergic Tones in the Control of Heart Rate in Teleosts. How Should They be Calculated? *Comparative Biochemistry Physiology*, 118, 131–139 (1997).
- Amelio, D., Garofalo, F., Capria, C., Tota, B., and Imbrogno, S.** Effects of temperature on the nitric oxide-dependent modulation of the Frank–Starling mechanism: the fish heart as a case study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164, 356–362 (2013).
- Andrade, D.V., Cruz-Neto, A.P. and Abe, A.S.** Meal size and specific dynamic action in the rattlesnake *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae). *Herpetologica*, 53, 485-493 (1997).
- Andrade, D.V., Tattersall, G.J., Brito, S.P., Soncini, R., Branco, L.G., Glass, M.L., Abe, A.S. and Milsom, W.K.** The ventilatory response to environmental hypercarbia in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. *J Comp Physiol B*, 174, 281–291 (2004).
- Armelin, V.A., Braga, V.H.S., Teixeira, M.T., Rantin, F.T., Florindo, L.H. and Kalinin, A.L.** Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Fish Physiol Biochem*, 42, 1213–1224 (2016).
- Arras, M., Rettich, A., Cinelli, P., Kasermann, H.P. and Burki, K.** Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Veterinary Research*, 3, 1-10 (2007).
- Arvedsen, S.K., Andersen, J.B., Zaar, M., Andrade, D., Abe, A.S. and Wang, T.** Arterial acid–base status during digestion and following vascular infusion of NaHCO₃ and HCl in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 142, 495– 502 (2005).
- Bagshaw, R.J. and Cox, R.H.** Nitrous oxide and the Baroreceptor Reflexes in the Dog. *Acta anaesth. Scand*, 26, 31-38 (1982).
- Bateson, P.** Assessment of pain in animals. *Anita. Behav.*, 42, 827-839 (1991).
- Blake, D.W. and Korner, P.I.** Effects of ketamine and Althesin anesthesia on baroreceptor – heart rate reflex and hemodynamics of intact and pontine rabbits. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 5, 145-154 (1982).
- Blanchard, R.J., McKittrick, C.R. and Blanchard, D.C.** Animal models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*, 73, 261-271 (2001).

- Bootsma, M., Swenne, C.A., Van Bolhuis, H.H., Chang, P.C., Cats, V.M. and Brusckhe, A.V.G.** Heart rate and heart rate variability as indexes of sympathovagal balance. *Am J Physiol.*, 266, 1565-1571 (1994).
- Bovo, R.P., Fuga, A., Micheli-Campbell, M.A., Carvalho, J.E. and Andrade, D.V.** Blood oxygen affinity increases during digestion in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 186, 75–82 (2015).
- Bruce, L.L.** Evolution of the Nervous System in Reptiles In book: Evolution of Nervous Systems (Jon H. Kaas) *Academic Press*, 2, 125-156 (2007).
- Burggren, W., Filogonio, R. and Wang, T.** Cardiovascular shunting in vertebrates: a practical integration of competing hypotheses. *Biological Reviews*, 95, 323–23 (2019).
- Campbell H.A., Leite C.A.C., Wang T., Skals M., Abe A.S., Egginton S., Rantin F.T., Bishop C.M. and Taylor E.W.** Evidence for a respiratory component, similar to mammalian respiratory sinus arrhythmia, in the heart rate variability signal from the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *J Exp Biol*, 209, 2628–2636 (2006).
- Castania, J.A., Katayama, P.L., Brognara, F., Moraes, D.J.A., Sabino, J.P.J. and Salgado, H.C.** Selective denervation of the aortic and carotid baroreceptors in rats. *Experimental Physiology*. 104, 1335–1342 (2019).
- Castro, S.A., Taylor, E.W., Tavares, D., Filogonio, R., Rodrigues, G.J. and Leite, C.A.C.** The role of nitric oxide on the cardiovascular system of South American rattlesnake (*Crotalus durissus*). *Physiological and Biochemical Zoology* (2021). (2021).
- Cerreta, A.J., Cannizzo, S.A., Smith, D.C. and Minter, L.J.** Venous hematology, biochemistry, and Blood gas analysis of free-ranging Eastern Copperheads (*Agkistrodon contortrix*) and Eastern Ratsnakes (*Pantherophis alleghaniensis*). *PLoS ONE*, 15, 1-15 (2020).
- Charlet, A., Rodeau, J. and Poisbeau, P.** Radiotelemetric and Symptomatic Evaluation of Pain in the Rat After Laparotomy: Long-Term Benefits of Perioperative Ropivacaine Care. *The Journal of Pain*, 12, 246-256 (2011).
- Comeau, S.G. and Hicks, J.W.** Regulation of central vascular blood flow in the turtle. *Am. J. Physiol.*, 267, 569-578 (1994).
- Cowley, Jr. A.W., Liard, J.F. and Guyton, A.C.** Role of the Baroreceptor Reflex in Daily Control of Arterial Blood Pressure and Other Variables in Dogs. *Circulation Research*, 32, 564-576 (1973).
- Dobson, K.L. and Harris, J.** A detailed surgical method for mechanical decerebration of the rat. *Exp Physiol.*, 97, 693–698 (2012).
- Dundee, J.W. and Black, G.W.** A review of the cardiovascular effects of halothane. *Anaesthesia*, 15, 349-356 (1960).
- Duran L.M., Taylor E.W., Sanches P.V.W., Cruz A.L., Tavares D., Sartori M.R., Abe A.S. and Leite C.A.C.** Heart rate variability in the tegu lizard, *Salvator merianae*, its neuroanatomical basis and role in the assessment of recovery from experimental manipulation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 240 (2020).
- Edes, A.N., Wolfe, B.A. and Crews, D.E.** Evaluating allostatic load: a new approach to measuring long-term stress in wildlife. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49, 272-282 (2018).
- Eme, J., Gwalthney, J., Blank, J.M., Owerkowicz, T., Barron, G. and 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. *Journal of Experimental Biology*, 212, 3553–3563 (2009).
- Eme, J., Gwalthney, J., Owerkowicz, T., Blank, J. M. and Hicks, J. W.** Turning crocodilian hearts into bird hearts: growth rates are similar for alligators with and

- without right-to-left cardiac shunt. *Journal of Experimental Biology*, 213, 2673–2680 (2010).
- Faber, J.E., Harris, P.D. and Wiegman, D.L.** Anesthetic depression of microcirculation, central hemodynamics, and respiration in decerebrate rats. *Am J Physiol.*, 243, 837-843 (1982).
- Farrell, A., Franklin, C., Arthur, P., Thorarensen, H. and Cousins, K.** Mechanical performance of an in situ perfused heart from the turtle *Chrysemys scripta* during normoxia and anoxia at 5°C and 15°C. *J. Exp. Biol.* 191, 207-229. (1994).
- Fedde, M.R., Kuhlmann, W.D. and Scheid, P.** Intrapulmonary receptors in the tegu lizard: I sensitivity to CO₂. *Respiration Physiology*, 29, 35-48 (1977)
- Feinstein, J.S., Adolphs, R., Damasio, A.R. and Tranel, D.** The human amygdala and the induction and experience of fear. *Curr Biol.*, 21, 34–38 (2011).
- Filogonio, R., Orsolini, K., Castro, S., Oda, G., Rocha, G., Tavares, D., Abe, A. and Leite, C.** Evaluation of the sequence method as a tool to access spontaneous baroreflex in reptiles. *Journal of Experimental Biology Part A*, 278, 1-8 (2019b).
- Filogonio, R., Sartori, M.R., Morgensen, S., Tavares, D., Campos, R., Abe, A.S., Taylor, E.W., Rodrigues, G.J., De Nucci, G., Simonsen, U., Leite, C.A.C. and Wang, T.** The cholinergic regulation along the pulmonary arterial tree of the South American rattlesnake: vascular reactivity, muscarinic receptors, and vagal innervation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 319, 156-170 (2020).
- Filogonio, R., Taylor, E.W., Carreira, L.B.T., Leite, G.A.P.C., Abe, A.S. and Leite, C.A.C.** Systemic Blood Flow Relations in Conscious South American Rattlesnakes. *South American Journal of Herpetology*, 9, 171–176 (2014).
- Filogonio, R., Wang, T., Abe, A. and Leite, C.A.C.** Cooling and Warming Rates are Unaffected by Autonomic Vascular Control in the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus*). *South American Journal of Herpetology*, 14, 242 – 9 (2019a).
- Filogonio, R., Wang, T., Taylor, E.W., Abe, A.S. and 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*, 186, 1059–1066 (2016).
- Franklin, C. and Axelsson, M.** (1994). The intrinsic properties of an in situ perfused crocodile heart. *J. Exp. Biol.* 186, 269-288. (1994).
- Franklin, C. E.** Intrinsic properties of an in situ turtle heart (*Emydura signata*) preparation perfused via both atria. *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 501-507. (1994)
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W. and 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*, 175, 201-208 (2005).
- Galli, G.L.J., Taylor, E.W. and Wang, T.** The cardiovascular responses of the freshwater turtle *Trachemys scripta* to warming and cooling. *J Exp Biol*, 207, 1471–1478 (2004).
- Gleeson, T. T., Mitchell, G. S. and Bennett, A. F.** Cardiovascular responses to graded activity in the lizards *Varanus* and *Iguana*. *Am. J. Physiol.* 239, 174-179 (1980).
- Groh, A., Krieger, P., Mease, R.A. and Henderson, L.** Acute and chronic pain processing in the thalamocortical system of humans and animal models. *Neuroscience*, 387, 58-71 (2018).
- Gross, H., Stein, P. and Buchberg, A.S.** Surgical anesthesia, heart disease and cardiovascular response. *Curr Res Anesth Analg.*, 30, 250-261 (1951).
- Grubb, B. R.** Cardiac output and stroke volume in exercising ducks and pigeons. *J. Appl. Physiol.* 53, 207-211 (1982).

- Guillette L.J., Cree A. and Rooney A.A.** Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In: Warwick C., Frye F.L., Murphy J.B. (eds) *Health and Welfare of Captive Reptiles*. Springer, 32-81 (1995).
- Guyenet P.G.** The sympathetic control of blood Pressure. *Nature reviews Neuroscience* 7, 335-346 (2006).
- Hedrick, M. S., Palioca, W. B. and Hillman, S. S.** Effects of temperature and physical activity on blood flow shunts and intracardiac mixing in the toad *Bufo marinus*. *Physiol. Biochem. Zool.* 72, 509-519 (1999).
- Hicks, J.W. and Wang, T.** Functional Role of Cardiac Shunts in Reptiles. *J Exp Zool* 275, 204–216 (1996).
- Hicks, J.W.** Agrenergic and cholinergic regulation of intracardiac shunting. *Physiological Zoology*, 67, 1325-1346 (1994).
- Hicks, J.W. and Comeau, S.G.** Vagal regulation of intracardiac shunting in the turtle *Pseudemys scripta*. *J. exp. Biol.* 186, 109–126 (1994).
- Hicks, J.W. and Wang, T.** The Functional Significance of the Reptilian Heart: New Insights into an Old Question. In *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart* (eds. Sedmera, D. and Wang, T., p. 207–227. New York, NY: Springer New Yor (2012).
- Hicks, J.W.** The physiological and evolutionary significance of cardiovascular shunting patterns in reptiles. *News Physiol Sci*, 17, 241–245 (2002).
- Imbrogno, S., Capria, C., Tota, B. and Jensen, F.B.** Nitric oxide improves the hemodynamic performance of the hypoxic goldfish (*Carassius auratus*) heart. *Nitric Oxide*, 15, 24-31 (2014).
- Imig, C.J., Randall, B.F. and Hines, H.M.** Effect of pentobarbital sodium anesthesia upon volume blood flow, arterial pressure and heart rate. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 82, 9-10 (1953).
- Jaggi, A.S., Jain, V. and Singh, N.** Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25, 1–28 (2011).
- Jensen, B., Abe, A.S., Andrade, D.V., Nyengaard, J.R. and Wang, T.** The heart of the South American rattlesnake *Crotalus durissus*. *Journal of Morphology*, 271, 1066-1077 (2010).
- Jensen, B., van den Berg, G., van den Doel, R., Oostra, R.J., Wang, T., and Moorman, A.F.M.** Development of the Hearts of Lizards and Snakes and Perspectives to Cardiac Evolution. *PLoS ONE*, 8 (2013).
- Johnstone, M.** General anesthesia and cardiac inhibition. *Br Heart J.*, 13, 47-55 (1951).
- Keen, A.N., Shiels, H.A. and Crossley, D.A.** Cardiovascular function, compliance, and connective tissue remodeling in the turtle, *Trachemys scripta*, following thermal acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 311, 133–143 (2016).
- Kirchheim, H.R.** Systemic Arterial Baroreceptor Reflexes. *Physiological Reviews*, 56, 100-176 (1976).
- La Rovere, M.T., Pinna, G.D. and Raczak, G.** Baroreflex Sensitivity: Measurement and Clinical Implications. *Ann Noninvasive Electrocardiol*, 13, 191-207 (2008).
- Lataro, R.M., Castania, J.A., Chapleau, M.W., Salgado, H.C. and Fazan, Jr., R.** Baroreceptor and chemoreceptor contributions to the hypertensive response to bilateral carotid occlusion in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, 1990–1995 (2010).
- LeBlanc, B.W., Bowary, P.M., Chao, Y., Lii, T.R. and Saab, C.Y.** Electroencephalographic signatures of pain and analgesia in rats. *PAIN*, 157, 2330-2340 (2016).
- Lee, J.S., D., M.C. and, K.S.K.** Isoflurane Depresses Baroreflex Control of Heart Rate in Decerebrate Rats. *Anesthesiology*, 96, 1214–1222 (2002).

- Leite, C.A.C., Taylor, E.W., Guerra, C.D.R., Florindo, L.H., Belão, T. and Rantin, F.T.** The role of the vagus nerve in the generation of cardiorespiratory interactions in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *J Comp Physiol A.*, 195, 721-731 (2009).
- Leite, C.A.C., Taylor, E.W., Wang, T., Abe, A.S. and 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*, 216, 1881–1889 (2013).
- Leite, C.A.C., Wang, T., Taylor, E.W., Abe, A.S., Leite, G.S.P.C. and Andrade, D.O.V.** Loss of the ability to control right-to-left shunt does not influence the metabolic responses to temperature change or long-term fasting in the South American Rattlesnake *Crotalus durissus*. *Physiol Biochem Zool*, 87, 568–575 (2014).
- Liang, Y. and Terashima, S.** Physiological Properties and Morphological Characteristics of Cutaneous and Mucosal Mechanical Nociceptive Neurons With A-6 Peripheral Axons in the Trigeminal Ganglia of Crotaline Snakes. *The Journal of Comparative Neurology*, 328, 88-102 (1993).
- Machin, K.L.** Fish, amphibian, and reptile analgesia. *Analgesia and anesthesia*, 4, 19-33 (2001).
- Makau, C. M., Towett, P. K., Abelson, K. S. P. and Kanui, T. I.** Modulation of formalin-induced pain-related behaviour by clonidine and yohimbine in the Speke's hinged tortoise (*Kiniskys spekii*). *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 40, 439-446 (2017).
- Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F. and Cerutti, S.** Cardiovascular Neural Regulation Explored in the Frequency Domain. *Circulation*, 84, 482-491 (1991).
- Maren, S., Yap, S.A. and Goosens, K.A.** The Amygdala Is Essential for the Development of Neuronal Plasticity in the Medial Geniculate Nucleus during Auditory Fear Conditioning in Rats. *The Journal of Neuroscience*, 21, 1-6 (2001).
- Mathews, K.A.** Neuropathic Pain in Dogs and Cats: If Only They Could Tell Us If They Hurt. *Vet Clin Small Anim*, 38, 1365–1414 (2008).
- McKean, T., Scherzer, A. and Park, H.** Hypoxia and ischaemia in bufferperfused toad hearts. *J. Exp. Biol.* **200**, 2575-2581 (1997).
- Mei Methawasin, M., Hutchinson, K.R., Lee, E., Smith III, J.E. Saripalli, C., Hidalgo, C.G. Ottenheijm and C.A.C. Granzier, H.** Experimentally Increasing Titin Compliance in a Novel Mouse Model Attenuates the Frank-Starling Mechanism But Has a Beneficial Effect on Diastole *Circulation*, 129, 1924-1936 (2014).
- Mogil, J.** Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10, 283–294 (2009).
- Moore, M.C., Thompson, C.W. and Marler, C.A.** Reciprocal Changes in Corticosterone and Testosterone Levels following Acute and Chronic Handling Stress in the Tree Lizard, *Urosaurus ornatos*. *General and Comparative Endocrinology*, 81, 217-226 (1991).
- Moorea, I.T. and Jessopb, T.S.** Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior*, 43, 39–47 (2003).
- Mosley, C.** Pain and Nociception in Reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 14, 45-60, 2011.
- Müller, M.S., Vyssotski, A.L., Yamamoto, M. and Yoda, K.** Heart rate variability reveals that a decrease in parasympathetic ('rest-and-digest') activity dominates autonomic stress responses in a free-living seabird. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 117-126 (2017).
- Nakanishi, S.T and Whelan, P.J.** A decerebrate adult mouse model for examining the sensorimotor control of locomotion. *J Neurophysiol*, 107, 500–515 (2012).

- National Research Council.** Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. Washington, DC: The National Academies (2003).
- Naumann, R.K., Ondracek, J.M., Reiter, J., Shein-Idelson, M., Tosches, M.A., Yamawaki, T.M. and Laurent, G.** The reptilian brain. *Current Biology Magazine*, 25, 301-327 (2015).
- Northcutt, R.G.** Architectonic Studies of the Telencephalon of *Iguana iguana*. *J. Comp. Neur.*, 130, 109-148 (1967).
- Northcutt, R.G.** Evolution on the thelencephalon in nonmammals. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4, 301-350 (1981).
- Northcutt, R.G.** Understanding Vertebrate Brain Evolution. *Integ. and Comp. Biol.*, 42, 743-756 (2002).
- Oda, G.M., Leite, C.A.C., Abe,A.S. and Klein, W.** Effects of different levels of hypoxia and hypercarbia on ventilation and gas exchange in *Boa constrictor amaralis* and *Crotalus durissus* (Squamata: Serpentes). *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 294 (2021).
- Ondicova1, K., Hegedusova1, N., Tibensky, M. and Mravec, B.** Ivabradine reduces baseline and stress-induced increase of heart rate and blood pressure and modulates neuroendocrine stress response in rats depending on stressor intensity. *Gen. Physiol. Biophys.*, 38, 165-173 (2019).
- Ong, W., Stohler, C.S. and Herr, D.R.** Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. 56, 1137-1166 (2019).
- Perry, S.M. and Nevarez, J.G.** Pain and Its Control in Reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 21, 1-16 (2018).
- Peters, G. W., Steiner, D. A., Rigoni, J. A., Mascilli, A. D., Schnepf, R. W. and Thomas, S. P.** Cardiorespiratory adjustments of homing pigeons to steady wind tunnel flight. *J. Exp. Biol.* 208, 3109-3120 (2005).
- Phelps, E.A. and LeDoux, J.E.** Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human. *Behavior. Neuron*, 48, 175-187 (2005).
- Reyes, C., Fong, A.Y. and Milsom, W.K.** Distribution and Innervation of Putative Peripheral Arterial Chemoreceptors in the Red-Eared Slider (*Trachemys scripta elegans*) *Research in Systems Neuroscience*, 523, 1399-1418 (2015).
- Robertson, J.D. and Swan, A.A.B.** Effect of anaesthetics on baroreceptor reflexes. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Science*, 42, 113-125 (1957).
- Rocha, G.C., Castro, S.A., Taylor, E.W., Tavares, D. and Leite, C.A.C.** A decerebrate preparation of the rattlesnake, *Crotalus durissus* provides as an experimental model for study of autonomic modulation of the cardiovascular system in reptiles. *Physiol and Biochem Zool.*, 94, 269-285 (2021).
- Rodrigues, F.L., Oliveira, M., Salgado, H.C. and Fazan Jr. R.** Effect of baroreceptor denervation on the autonomic control of arterial pressure in conscious mice. *Exp Physiol*, 96, 853-862 (2011).
- Rooney, B., Levine, G., Gaynor, J., Macdonald, E. and Wimsatt, J.** Sevoflurane Anesthesia in Desert Tortoises (*Gopherus agassizii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 30, 64-69 (1999).
- Sanches P.V.W., Taylor E.W., Duran L.M., Cruz A.L., Dias D.P.M. and Leite C.A.C.** Respiratory sinus arrhythmia is a major component of heart rate variability in undisturbed, remotely monitored rattlesnakes, *Crotalus durissus*. *Journal of Experimental Biology*, 222 (2019).
- Santuzzi, C.H., Neto, H.A.F., Pires, J.G.P., Gonçalves, W.L.S., Gouvea, S.A. and Abreu, G.R.** High-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces pain

- and cardio-respiratory parameters in an animal model of acute pain: Participation of peripheral serotonin. *Physiotherapy Theory and Practice*, 29, 630–638 (2013).
- Sherrington, C.S.** Decerebrate rigidity, and reflex coordination of movements, 22, 319–332 (1898).
- Shiels, H.A. and White, E.** The Frank-Satraling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *The Journal of Experimental Biology*, 211, 2005–2013 (2008).
- Silva, J.T. and Seminowicz, D.A.** Neuroimaging of pain in animal models: a review of recent literature. *PAIN Reports*, (2019).
- Silverman, J., Garnett, N.L., Giszter, S.F., Heckman, C.J., Kulpa-Eddy, J.A., Lemay, M.A., Perry, C.K. and Pinter, M.** Decerebrate Mammalian Preparations: Unalleviated or Fully Alleviated Pain? Contemporary topics in laboratory animal science. *American Association for Laboratory Animal Science*, 44, 34–6 (2005).
- Stehouwer, D.J.** Effect of Tectotomy and Decerebration on Spontaneous and Elicited Behavior of Tadpoles and Juvenile Frogs. *Behavioral Neuroscience* 101, 378–384 (1987).
- Stoskopf, M.K.** Pain and analgesia in birds, reptiles, amphibians, and fish. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35, 775–780 (1994).
- Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology.** Heart rate variability standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur. Heart J.* 17, 354–381 (1996).
- Taylor, E.W., Andrade, D.O.V., Abe, A.S., Leite, C.A.C. and 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*, 212, 145–151 (2009).
- Taylor, E.W., Jordan D. and Coote J.H.** Central Control of the Cardiovascular and Respiratory Systems and Their Interactions in Vertebrates. *Physiological reviews*, 79, (1999).
- Tozetti, A.M. and Martins, M.** Habitat use by the South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in south-eastern Brazil. *Journal of Natural History*, 42, 1435–1444 (2008).
- Tozetti, A.M., Vettorazzo, A. and Martins, M.** Short-term movements of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in southeastern Brazil. *Herpetological Journal*, 19, 201–206 (2009).
- Troiano, J.C., Gould, E.G., Althaus, R., Malinskas, G., Gould, J.A., Heker, J., Vidal, J.C., Amantini, E. and Simoncini, C.** Blood biochemical profile of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in captivity. *J. Venom. Anim. Toxins*, 7 (2001).
- Tyrrell, C.L. and Cree, A.** Relationships between Corticosterone Concentration and Season, Time of Day and Confinement in a Wild Reptile (Tuatara, *Sphenodon punctatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 110, 97–108 (1998).
- Uematsu, K. and Todo, T.** Identification of the midbrain locomotor nuclei and their descending pathways in the teleost carp, *Cyprinus carpio*. *Brain Research*, 773, 1–7 (1997).
- Vatner, S.F.** Effects of Anesthesia on Cardiovascular Control Mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 26, 193–206 (1978).
- Wang, T., Abe, A.S. and Glass, M.L.** Effects of temperature on lung and blood gases in the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 121, 7–11 (1998).
- Wang, T., Burton, W., Abe, A.S. and Taylor, T.** Vagal control of heart rate and cardiac shunts in reptiles: Relation to metabolic state. *Experimental Physiology*, 86, 777–784 (2001a).
- Wang, T., Krosniunas, E.H. and Hicks, J.W.** The role of cardiac shunts in the regulation of arterial blood gases. *Amer. Zool.*, 37, 12–22 (1997).

- Wang, T., Taylor, E.W., Andrade, D. and Abe, A.S.** Autonomic control of heart rate during forced activity and digestion in the snake *Boa constrictor*. *The Journal of Experimental Biology*, 204, 3553-3560 (2001b).
- Whitford, M.D., Freymiller, G.A. and Higham, T.E.** Determinants of predation success: How to survive an attack from a rattlesnake. *Functional ecology*, 33, 1099-1109 (2019).
- Wüster, W., Ferguson, J.E., Quijada-Mascareñas, J.A., Pook, C.E., Salomão, M.G. and Thorpor, R.S.** Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology*, 14, 1095–1108 (2005).
- Wyneken, J.** Reptilian Neurology: Anatomy and Function. *Vet Clin Exot Anim*, 10, 837–853 (2007).
- Zandieh, S. Hopf, R., Redl, H. and Schlag, M.G.** The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. *Spinal Cord*, 41, 16-22 (2003).
- Zena L., Leite C.A.C., Longhini L., Dias D., Silva G., Hartzler L., Gargaglioni L. and Bicego K.** Analysis of the respiratory component of heart rate variability in the Cururu toad *Rhinella schneideri*. *Scientific Reports*, 7, 1-10, (2017).

CAPÍTULO 1

A modulação autonômica do modelo de cascavel descerebrada (*Crotalus durissus*) é similar à do animal não-descerebrado

Resumo

A preparação da cascavel descerebrada (*Crotalus durissus*) foi recentemente proposta como um novo modelo experimental para estudos cardiovasculares em Squamatos. Tal preparação amplia as possibilidades de registros concomitantes de variáveis em investigações complexas, dentro dos preceitos éticos, sem as alterações causadas pela anestesia terminal e, ainda assim, eliminando os processos de dor e estresse. Para atestar a funcionalidade do modelo e seu escopo de uso, é necessário avaliar se seus parâmetros cardiovasculares e ajustes autonômicos são equivalentes aos de um animal não descerebrado. Nesta investigação, comparamos os valores médios de múltiplas variáveis cardiovasculares em repouso entre a preparação descerebrada e serpentes não descerebradas e também, avaliamos a similaridade do barorreflexo, como indicador de um reflexo cardiovascular complexo de ação constante e rápida resposta. Assim, dois grupos, controle (GC) e preparação descerebrada (GD), após canulação oclusiva da artéria vertebral, tiveram registrados a pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (f_H) por 6h diárias após a cirurgia, durante 72h. O barorreflexo foi avaliado ao longo do tempo pelo monitoramento das variáveis operacionais obtidas pelo método da sequência (ganho operacional, BEI, número de sequências barorreflexas e número de rampas). Após 72h, o método farmacológico de acesso ao barorreflexo foi utilizado para analisar capacidades e limites deste mecanismo. Estabilização da f_H média (bpm) ocorreu dentro de 24h em ambos os grupos (GC - $30,4 \pm 1,41$ e GD - $38,19 \pm 3,61$). A PAM (kPa) alcançou à valores estáveis em 24h em GC ($4,34 \pm 0,26$) e 48h em GD ($3,44 \pm 0,18$). O ganho operacional ($\text{ms} \cdot \text{kPa}^{-1}$) estabilizou em 54h em GC ($2502 \pm 192,2$) e 48h em GD ($2082 \pm 290,1$). O BEI não se alterou ao longo do tempo, indicando que sua manutenção era recuperada com a saída da anestesia. Além disso, os valores máximos de Ganho barorreflexo (G50) também foram equivalentes entre os grupos (2097 ± 920 , controle e 1267 ± 516 , descerebrados). GC e GD mantiveram os parâmetros cardiovasculares em valores similares e apresentaram perfis de recuperação de modulação autonômica semelhantes. Assim, a cascavel descerebrada possui ajustes equivalentes aos obtidos em animais não descerebrados atestando sua relevância para estudo de modulação cardiovascular.

Palavras chave: descerebração, cascavel, barorreflexo, modelo experimental, cardiovascular, sistema nervoso autônomo.

1. Introdução

O sistema cardiovascular possui arranjo complexo com interações dinâmicas de múltiplos órgãos. Estes operam sob um grande número de reflexos e interações modulatórias. Estudar tal complexidade eventualmente requer a aquisição e integração de diversos parâmetros cardiovasculares ou a investigação de um fenômeno em múltiplos níveis. O uso consistente de diversas plataformas experimentais *in vivo*, *in situ*, *ex vivo*, *in vitro* ou *in silico* têm fornecido suporte experimental para a descrição de diversos mecanismos e funções em animais.

Muitas vezes, um alto nível de invasividade instrumental é necessária para o registro de parâmetros cardiovasculares. Eventualmente, o nível de instrumentação proposto pode estar além do limite adequado para um procedimento aplicado *in vivo*. Essa é uma limitação relevante, mesmo com a utilização de novas ferramentas modernas e miniaturizadas de monitoramento cardiovascular. Assim, é comum que as investigações sobre a modulação autonômica cardiovascular usem experimentos *in situ*, com registros “*open chest*” (Galli et al., 2005a; Galli et al., 2005b; Mosley et al. 2004; Skals et al., 2005; Skovgaard et al., 2005; Taylor et al., 2009). Tais abordagens *in situ* foram altamente valiosas para gerar dados simultâneos de múltiplos parâmetros. Elas foram essenciais para a investigação dos mecanismos básicos que operam à modulação cardiovascular. Contudo, devido à interferência dos anestésicos utilizados no funcionamento nervoso, é difícil acessar os mecanismos modulados pelo sistema nervoso autônomo (SNA).

Recentemente, foi sugerido um novo modelo experimental usando uma cascavel descerebrada para fornecer uma preparação pós-eutanásia com modulação autonômica funcional sobre o sistema cardiovascular (Rocha et al., 2021; Castro et al., 2021). O uso deste modelo permitiu registros concomitantes de vários parâmetros cardíacos e vasculares após a remoção da anestesia. Essa preparação foi apontada como possivelmente relevante para estudos modulatórios (Rocha et al., 2021). No entanto, a extensão de sua aplicação depende da similaridade ou correspondência das respostas cardiovasculares autonômicas fornecidas com aquelas de animais intactos.

O presente estudo fará uma avaliação quantitativa objetiva do novo modelo da cascavel descerebrada analisando um ajuste cardiovascular complexo modulado pelo SNA. Desta forma, utilizamos o barorreflexo como bioindicador de uma funcionalidade

autônoma complexa e comparamos o progresso de sua recuperação pós-instrumentação e o nível de sua atividade entre preparações descerebradas e cascavéis em repouso.

O barorreflexo é o principal reflexo cardiovascular para tamponar eventuais flutuações da pressão arterial (Bagshaw, 1985; Guyenet, 2006). Ele é um mecanismo com elevado grau de complexidade que faz monitoramento permanente e constante com rápidos ajustes da pressão arterial. Este mecanismo monitora a pressão com receptores físicos transmuralis nas paredes das principais artérias sistêmicas, integra tais informações centralmente com diversas outras influências centrais e periféricas e também, efetiva correções rápidas que envolvem ajustes de função cardíaca e em diversas seções vasculares. Desta forma, indicamos que o barorreflexo pode funcionar como um indicador sólido para avaliar a recuperação pós-cirúrgica da modulação autonômica cardiovascular.

2. Material e métodos

2.1 Animais experimentais

Os exemplares de cascavéis Sul Americanas, *Crotalus durissus*, utilizadas (n = 16, massa corporal: $687,94 \pm 61,93$ g, média \pm EPM) foram doadas pelo Instituto Butantan. Antes dos experimentos, as serpentes foram mantidas em recipientes individuais ($56 \times 38 \times 20$ cm), em sala com temperatura controlada, à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo 12:12, com abastecimento de água *ad libitum*, e alimentadas com camundongos a cada 15 dias. A alimentação foi interrompida 15 dias antes dos experimentos. Todos os procedimentos e protocolos foram previamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFSCar).

2.2 Preparação animal e descerebração

O protocolo de descerebração foi descrito em detalhes por Rocha e colaboradores (2021). Em suma, cada animal foi inicialmente sedado por aumento de PCO_2 (Wang et al., 1993; Leite et al. 2013, 2014) até que perdessem o controle motor, o que permitiu manuseio seguro e intubação para ventilação mecânica com 3-5% de anestésico inalável isoflurano (5% para indução por 5 minutos e 3% para manutenção da anestesia), 3-5 respirações por

minuto (volume corrente - $30 \text{ ml} \times \text{kg}^{-1}$) (Bertelsen et al., 2014). Sob anestesia, realizamos uma incisão rostro-caudal medial ($\sim 0,5 \text{ cm}$) no dorso da cabeça para expor o crânio. Uma pequena abertura medial ($\sim 2\text{-}3 \text{ mm}$) permitiu acessar as meninges logo acima do teto óptico. A artéria subjacente e qualquer eventual vaso colateral foram cauterizados e as meninges abertas. Uma sonda de cauterização foi usada para fazer uma incisão dorsoventral através do tecido cerebral na posição da terceira porção caudal do lobo óptico. Todo o sistema nervoso rostral àquela secção foi cauterizado e removido. Todas as estruturas neurais referentes ao cerebelo, tronco encefálico e porção posterior do hipotálamo permaneceram intactas. A cavidade restante foi preenchida com algodão estéril para estabilização do tecido remanescente.

A descerebração, como um procedimento irreversível que proporciona um estado irrecuperável, foi declarada como sendo o momento da eutanásia, e a preparação descerebrada resultante foi utilizada no estudo do barorreflexo (Silverman et al., 2005; Rocha et al., 2021; Castro et al., 2021).

Todas as diretrizes éticas para a instrumentação animal continuaram sendo respeitadas enquanto a preparação estava em uso, mesmo após a descerebração. Ao final da cirurgia os animais receberam tratamento profilático com injeções de antibiótico (Enrofloxaxina $11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) e anti-inflamatório (Flunixinina meglumina $1,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

2.3 Instrumentação para o barorreflexo

Preparações descerebradas ($n = 8$) foram canuladas sob o mesmo plano anestésico da cirurgia de descerebração. Uma incisão ventrolateral direita ($\sim 4,5 \text{ cm}$), rostral à posição do coração expôs a vasculatura central. A canulação oclusiva da artéria vertebral (cânula de polietileno PE50) forneceu acesso ao arco aórtico direito para registros de pressão arterial sistêmica (Psis). Os cateteres foram preenchidos com solução salina heparinizada (50 UI/ml , 0,9%).

As cascavéis não descerebradas ($n = 8$) passaram pelo mesmo procedimento (incluindo duração da anestesia) sem o processo de descerebração. Após a cirurgia, a anestesia foi retirada e as preparações descerebradas e as cascavéis não descerebradas foram realocadas em caixas plásticas e mantidas em câmara climatizada à 30°C .

2.4 Registros e protocolo experimental

Os registros cardiovasculares foram iniciados imediatamente após a cirurgia (taxa de amostragem, $1\text{k}\cdot\text{seg}^{-1}$ - software Powerlab/LabChart®, ADInstruments). Para isso, os cateteres foram conectados a transdutores de pressão (Baxter Edward PX600), acoplados a pré-amplificadores de sinal (Bridge Amp, ADInstruments). Os transdutores de pressão foram calibrados contra uma coluna de água. Os sinais de pressão foram registrados por 6h diariamente e amostras ao longo deste período foram utilizadas para as análises. Estes dados foram utilizados para caracterizar o perfil de recuperação da frequência cardíaca média (f_H) e pressão arterial média (PAM). Com os mesmos registros, utilizamos o Método da Sequência para descrever o barorreflexo operacional ao longo do tempo de recuperação (Filogonio et al., 2019).

Após observação incontestável da estabilização do barorreflexo, foi realizado um protocolo farmacológico ($n=6$ para cada grupo) para análise dos limites funcionais do ganho barorreflexo. O protocolo foi constituído de injeções intravasculares seriadas com doses crescentes do agonista vasoconstritor α_1 - adrenérgico, fenilefrina (1; 2,5; 5; 10 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), e do vasodilatador doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (1; 2,5; 5; 10 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Tanto a f_H média quanto PAM retornaram a uma linha de base estável antes da próxima injeção. Após protocolos experimentais, cada preparação e cascavel não descerebrada receberam injeção intravascular de barbitúrico (Tiopental, 100 $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ - Pearson, Brasil) seguido de solução hiper saturada de KCl.

2.5 Análises barorreflexas

Consideramos como recuperação, o estabelecimento da estabilidade dos parâmetros do barorreflexo após a cirurgia. O Método da Sequência foi utilizado para acessar as alterações barorreflexas ao longo do tempo. As comparações entre a preparação descerebrada e grupo controle utilizaram as médias dos parâmetros cardiovasculares e do barorreflexo após a recuperação.

A frequência cardíaca média (f_H) e o respectivo intervalo de pulso (IP) foram derivados do sinal da pressão arterial. A pressão arterial sistêmica média foi calculada como $\text{PAM} = 1/3 (\text{Psistólica}) + 2/3 (\text{Pdiastólica})$. Os parâmetros do barorreflexo operacional foram calculados com método da sequência utilizando séries sequenciais de 300 ciclos cardíacos,

com valores de pressão sistólica e RRI extraídos do sinal de pressão arterial registrado (LabChart - AD Instruments) e analisado com software CardioSeries (v2.7, www.danielpenteado.com), de acordo com Filogonio e colaboradores (2019; 2020). A sensibilidade do barorreflexo (BRS), representada pelo ganho operacional (G_{op}), foi calculada como os valores médios da inclinação das sequências barorreflexas detectadas em cada fragmento analisado. O índice de eficiência barorreflexa (BEI) foi calculado como a proporção entre o número de sequências barorreflexas e o número total de rampas (Di Rienzo, et al., 2001 e Filogonio et al., 2019):

$$BEI = \frac{\text{Número de sequências barorreflexas}}{\text{Número total de rampas}}$$

O ganho máximo (G_{50}) foi derivado do Método Farmacológico e calculado por uma função sigmoide não linear de quatro parâmetros (Reid, 1996):

$$IP = \frac{(IP_{max} - IP_{min})}{1 + \left(\frac{PAM}{C}\right)^B} + IP_{min}$$

onde B é o coeficiente de inclinação (ou seja, inclinação máxima da porção linear da curva). C é PAM no ponto médio do intervalo entre IP máximo e mínimo, de acordo com Filogonio et al., (2019). G_{50} foi calculado de acordo com Crossley e colaboradores (2015) como:

$$G_{50} = \left| \frac{-B(IP_{max} - IP_{min})}{4C} \right|$$

2.6 Análise estatística

Comparamos os valores médios sequenciais das variáveis barorreflexas ao longo do tempo após a cirurgia (G_{op} , BEI, número de sequências barorreflexas, número total de rampas, PAM, f_H médio) para cada grupo experimental usando ANOVA One-Way para medidas repetidas/Sidak ou Friedman/Dunn. Utilizamos One-Way ANOVA/Tukey para

comparar os parâmetros do barorreflexo no início da recuperação e no final do protocolo experimental. Utilizamos o teste Two-Way ANOVA/Tukey para comparar os parâmetros barorreflexos entre preparações descerebradas e cascavéis não descerebradas (controle) após estabilização. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) ($p < 0,05$; GraphPad Prism 7.0).

3. Resultados

3.1 Barorreflexo ao longo do tempo

A recuperação foi definida após a estabilização dos valores médios dos parâmetros cardiovasculares e do barorreflexo quando comparados com os valores logo após a cirurgia (tempo 0). Os primeiros registros feitos imediatamente após a cirurgia representam valores dos animais ainda sob anestesia e evidenciam nível semelhante de variáveis cardiovasculares e barorreflexas entre os grupos experimentais (Fig. 1 e 2).

O efeito da anestesia durou mais de 6h após o final do procedimento. Depois disso, houve progressão de recuperação semelhante entre os grupos experimentais (Fig. 1 e 2). As médias de f_H e PAM estabilizaram 24h após a cirurgia no GC (Fig. 1 A e B). Contudo, o G_{op} levou 54h para atingir valores estáveis. Os valores BEI foram semelhantes ao valor médio de recuperação logo após a cirurgia em ambos os grupos (Fig. 1 C e D).

O GD também recuperou a f_H média em 24h, porém a PAM levou mais tempo para reduzir à valores estáveis (Fig. 2 A e B). Após a cirurgia, G_{op} se elevou e se estabilizou após 48h, assim como a PAM. O BEI se manteve estável desde o início das medidas (Fig. 2 C e D).

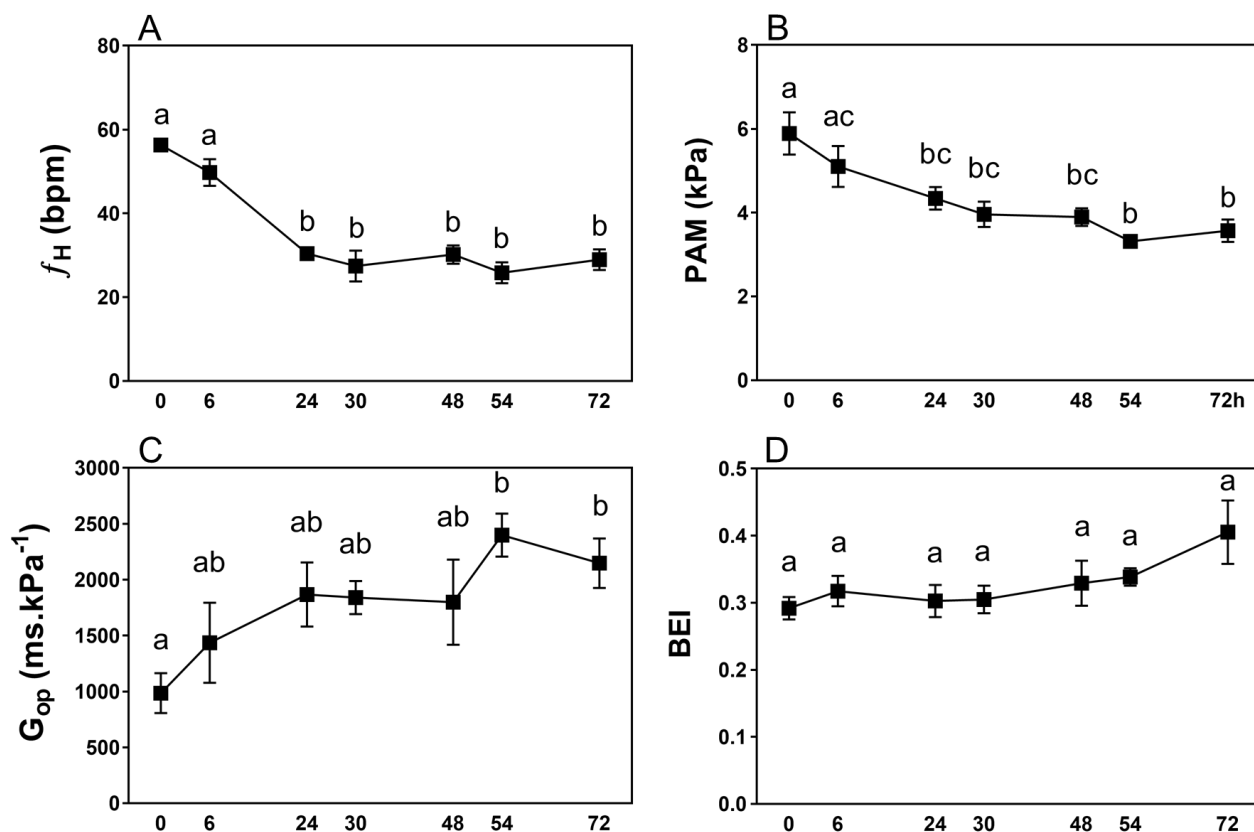


Figura 1. Parâmetros cardiovasculares e barorreflexos ao longo do tempo após cirurgia em cascavéis, *Crotalus durissus*. Os valores foram obtidos pelo Método da Sequência de análise barorreflexa. (a) frequência cardíaca - f_H ; (b) pressão arterial média - PAM; (c) ganho barorreflexo operacional - G_{op} ; (d) índice de eficiência barorreflexa - BEI. Os valores são médias \pm EPM. Letras diferentes denotam diferença estatística (One-Way ANOVA/Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$).

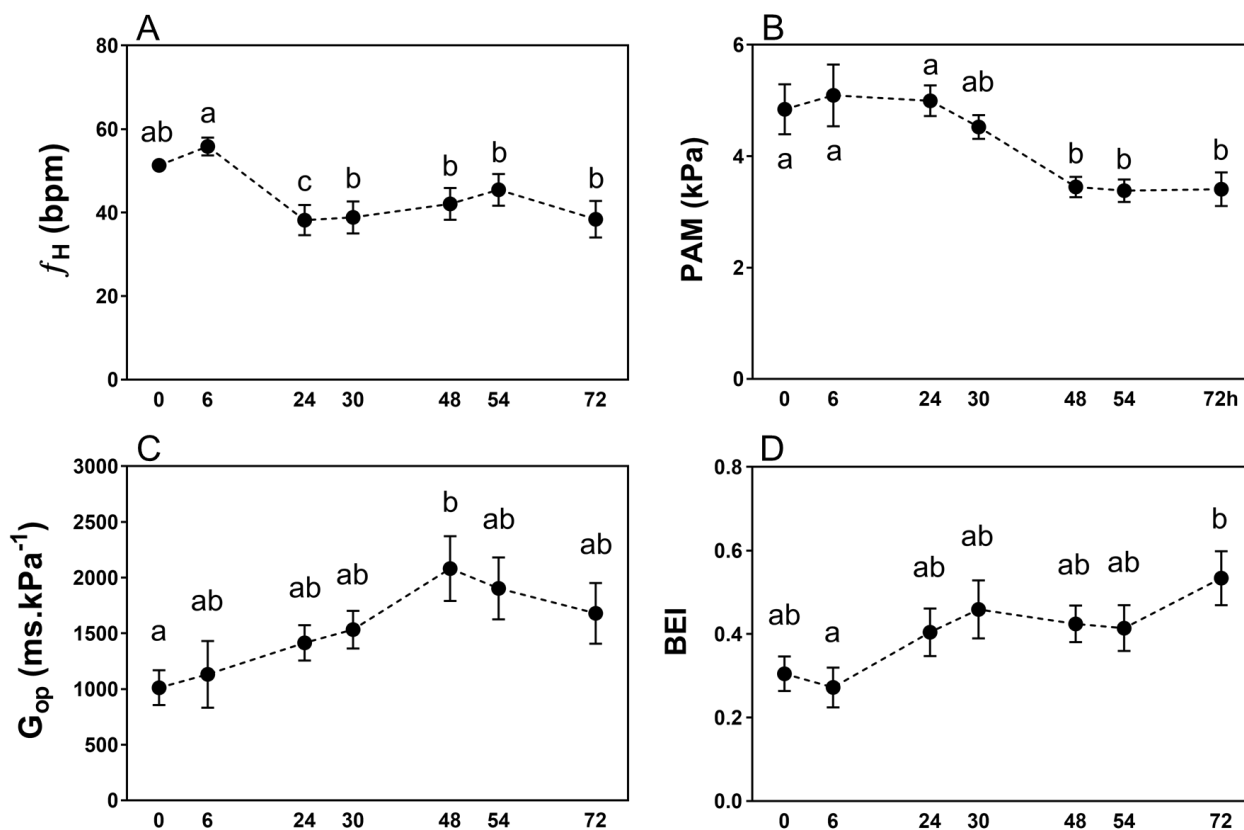


Figura 2. Parâmetros cardiovasculares e barorreflexos ao longo do tempo após cirurgia em cascavéis descerebradas, *Crotalus durissus*. Os valores foram obtidos pelo Método da Sequência de análise barorreflexa. (a) frequência cardíaca - f_H ; (b) pressão arterial média - PAM; (c) ganho barorreflexo operacional - G_{op} ; (d) índice de eficiência barorreflexa - BEI. Os valores são médias \pm EPM. Letras diferentes denotam diferença estatística (One-Way ANOVA/Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$).

3.2 Cascavel não descerebrada x preparação descerebrada após estabilização

Após estabilidade dos valores médios dos parâmetros cardiovasculares e barorreflexos de f_H , PAM, G_{op} serem alcançados, em cada grupo experimental, estes permaneceram estáveis até o final do protocolo experimental (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros cardiovasculares e do barorreflexo no estabelecimento da recuperação e ao final do protocolo experimental. Os valores foram obtidos com o Método da Sequência de análise barorreflexa.

| Parâmetro barorreflexo | Estabelecimento da estabilização | | Fim do experimento | |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Controle | Descerebrado | Controle | Descerebrado |
| f_H (bpm) | $30,4 \pm 1,41^a$ | $38,19 \pm 3,61^a$ | $28,95 \pm 2,44^a$ | $38,41 \pm 4,39^a$ |
| PAM (kPa) | $4,34 \pm 0,26^a$ | $3,44 \pm 0,18^a$ | $3,56 \pm 0,26^a$ | $3,40 \pm 0,30^a$ |
| G_{op} (ms·kPa ⁻¹) | $2502 \pm 192,2^a$ | $2082 \pm 290,1^a$ | $2147 \pm 221,5^a$ | $1679 \pm 272,4^a$ |
| BEI | $0,29 \pm 0,01^a$ | $0,48 \pm 0,04^a$ | $0,40 \pm 0,04^a$ | $0,48 \pm 0,04^a$ |

Os valores são médias \pm EPM. f_H - frequência cardíaca; PAM - pressão arterial média; G_{op} - ganho do barorreflexo operacional e BEI - índice de eficiência barorreflexa. Letras diferentes denotam valores diferentes. (Two-Way ANOVA/Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$).

Os ganhos operacionais e máximo foram semelhantes. Os valores médios de G_{op} e G_{50} foram $2147 \pm 221,5$ e 2097 ± 920 , no GC; e $1679 \pm 272,4$ e 1267 ± 516 , no GD, respectivamente, indicando que a estabilidade foi alcançada após a cirurgia. G_{op} e G_{50} não foram diferentes entre os grupos experimentais (Fig. 3).

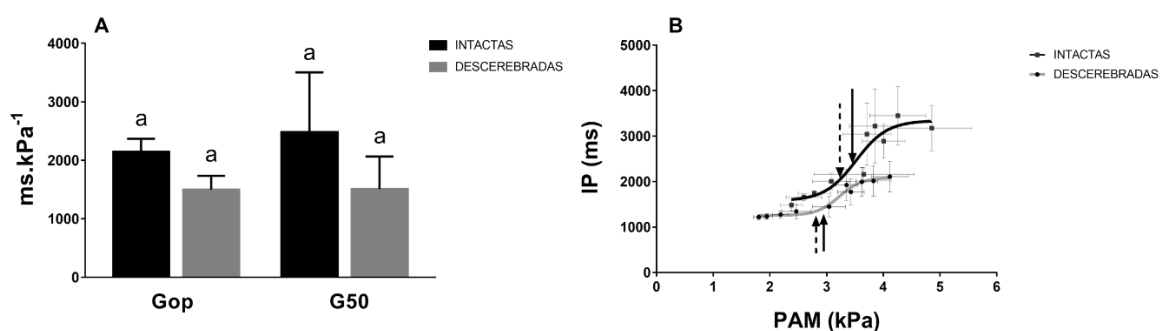


Figura 3. Valores do barorreflexo entre os grupos experimentais, cascavéis não descerebradas e preparações descerebradas após a recuperação. A - Valores médios de ganho barorreflexo operacional (G_{op}) e ganho barorreflexo máximo (G_{50}), 72h após a cirurgia: coluna preta - cascavéis não descerebradas; coluna cinza - preparações descerebradas. B - Curvas barorreflexas sigmóides médias obtidas com o método farmacológico: linha preta - cascavéis não descerebradas; linha cinza - preparações descerebradas. Setas pontilhadas indicam G_{op} . Setas contínuas indicam G_{50} . Os valores são médias \pm EPM. Letras diferentes denotam valores diferentes. (Two-Way ANOVA/Tukey; $P < 0,05$; $n = 6$).

4. Discussão

Recentemente, uma preparação de cascavel descerebrada foi validada e utilizada para investigar questões relacionadas ao papel do NO na modulação do sistema cardiovascular (Rocha et al., 2021; Castro et al., 2021). Essa preparação demonstrou ser capaz de gerar ajustes cardiovasculares complexos em resposta à diversos desafios hemodinâmicos, e estímulos à quimiorreceptores de O₂ e temperatura (Rocha et al., 2021). Parte das respostas cardiovasculares descritas diferiram daquelas obtidas com preparações anestesiadas *in situ* (Castro et al., 2021; Galli et al., 2005b). No entanto, apesar de ser relatado como uma importante ferramenta para pesquisa experimental, a relevância prática desse modelo é impactada pela semelhança de suas respostas autonômicas com as de serpentes não descerebradas. Infelizmente, tal comparação é limitada, pois não é possível submeter uma serpente não descerebrada ao mesmo nível de instrumentação mantida por uma preparação descerebrada.

Assim, focamos nossas análises na similaridade dos parâmetros de repouso e no barorreflexo. Este é um mecanismo complexo, dinâmico e bem conhecido. Ele pode modular uma série de ajustes cardíacos e vasculares que podem ser monitorados com instrumentação mínima (canulação da artéria vertebral). Em seguida, utilizamos a recuperação do barorreflexo pós-instrumentação para indexar a recuperação da modulação autonômica sobre o sistema cardiovascular. Além disso, esse índice foi usado para verificar a semelhança das respostas cardiovasculares entre serpentes não descerebradas e preparações descerebradas. Ambos os grupos recuperaram níveis semelhantes de respostas barorreflexas, indicando que a preparação do animal descerebrado pode fornecer dados confiáveis e representativos sobre os mecanismos autonômicos.

O barorreflexo como índice de recuperação

Em vertebrados, a PAM opera sob grandes influências tanto do débito cardíaco quanto da resistência vascular periférica. Embora a PAM seja relativamente constante ao longo do tempo, a pressão arterial instantânea tende a flutuar devido a diversos fatores, como ventilação, mudança de temperatura, níveis de atividade, ortostase e vários outros (Armelin et al. 2014, Filogonio et al., 2020; Wang et al., 2019; Van Vliet e West, 1987; Zena et al.,

2015). O barorreflexo é o principal reflexo cardiovascular para estabilizar eventuais flutuações da pressão arterial (Bagshaw, 1985; Guyenet, 2006). Sua relevância para a manutenção hemodinâmica é atestada por sua preservação através da linhagem de vertebrados (Bagshaw, 1985; Van Vliet e West, 1994; Armelin et al., 2021). Esse mecanismo foi experimentalmente evidenciado em todos os grupos de vertebrados, como peixes (Sandblom e Axelsson, 2005; Armelin et al., 2016; 2021), anfíbios (West e Van Vilet, 1994; Zena et al., 2015), crocodilo (Hagensen et al., 2010), quelônios (Millard e Moali, 1980); squamatos (Filogonio et al., 2019; Zena et al., 2016), aves (Smith, 1994) e mamíferos (Coleman, 1980). Portanto, a expressão de mecanismo tão relevante é adequada para indexar a presença e magnitude da modulação cardiovascular no presente estudo. Nossos resultados indicam que o SNA está operando em nível adequado para a manutenção dos parâmetros cardiovasculares e para a modulação de respostas autonômicas.

No entanto, devemos ponderar que o barorreflexo, tal como utilizado aqui, é um índice. Ele não reflete a expressão de todas as possíveis influências modulatórias sobre o sistema cardiovascular. A abordagem utilizada é adequada, pois permite uma comparação qualitativa e quantitativa entre grupos experimentais. Contudo, ela possui limites. Não devemos considerar que a preparação descerebrada seja igual ao animal não descerebrado. A preparação descerebrada não possui interação entre estruturas neurais superiores e o SNA. Além disso, espera-se que a capacidade modulatória se deteriore com o tempo na preparação descerebrada. Assim, dentro do presente contexto, é muito relevante que os parâmetros tenham sido observados em recuperação e estabilização ao longo de dias. Para que a confiabilidade do presente modelo seja determinada e sua utilização definida, foi importante investigar se ajustes cardiovasculares complexos estavam presentes e se eram realizados no mesmo nível ao longo do tempo de experimentação.

Os processos de instrumentação atenuaram o barorreflexo, e ambos os grupos experimentais apresentaram parâmetros cardiovasculares médios e G_{op} alterados após a cirurgia. O efeito depressivo da anestesia sobre o sistema autonômico pareceu ser de grande relevância, uma vez que ambos os grupos, apesar de instrumentação muito diferente (descerebração+canulação x canulação), tiveram magnitude semelhante de alterações cardiovasculares. É sabido que os anestésicos interferem no SNA e podem causar efeitos confusos e, às vezes contraditórios, nos parâmetros cardiovasculares (Hettrick et al., 1996; Rooney et al., 1999; Mosley et al., 2004; Taylor et al., 2009; Williams et al., 2018). A atenuação do barorreflexo sob anestesia foi relatada anteriormente para diferentes grupos de

vertebrados. O isoflurano e o enflurano diminuíram PAM, f_H e atividade do mecanismo barorreflexo em ratos (Lee et al., 2002; Lee et al., 2004). Em humanos, o isoflurano e o sevoflurano reduziram a sensibilidade barorreflexa, mas tiveram recuperação completa 2 horas após a suspensão da anestesia (Nagasaki et al., 2001). Não há relatos de recuperação barorreflexa após a exposição à anestésicos inalatórios em outros animais. Para outros anestésicos foi observado que ratos levam 5-6 horas para recuperar o barorreflexo após anestesia com pentobarbital sódico, 4 horas após cloral hidratado e 4-5 horas, após protocolo anestésico com Diazepam/Cetamina (Ming et al., 2004). Foi observado que o isoflurano aumentou a f_H em cascavéis e lagartos teiú como seu efeito sobre o equilíbrio autonômico, causando grande queda da modulação parassimpática (Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). Infelizmente, não há descrição da recuperação pós-cirúrgica do barorreflexo em outras espécies de vertebrados não mamíferos.

Adicionalmente, observamos que animais controle recuperaram a f_H e PAM médias (24h) antes do barorreflexo. Isso foi observado porque o G_{op} demorou mais para se restabelecer totalmente (54h). Tal informação possui grande relevância, uma vez que estudos dedicados à investigação de mecanismos modulatórios devem validar a presença e funcionalidade do mecanismo de interesse na condição experimental.

Recuperação barorreflexa

Os parâmetros cardiovasculares foram estabelecidos como estáveis, 48 horas após a instrumentação. Além disso, ambos os grupos tiveram perfis de recuperação semelhantes ao longo do tempo para as variáveis barorreflexas. Utilizamos o método de sequência para análises barorreflexas, o que permitiu análises sequenciais ao longo da duração do protocolo. É razoável assumirmos que, mesmo observando uma recuperação autonômica, a preparação não é um animal íntegro e, portanto, menores variações de pressão podem refletir menores interferências nos parâmetros hemodinâmicos, como estado de alerta, atividade, e outros fatores que exercem influências sobre a estabilidade do sistema cardiovascular.

O método de sequência possibilitou o registro de outros parâmetros importantes, como BEI. Sua diminuição indicaria menos eficácia do barorreflexo em recrutar o f_H para compensações de pressão, e seu aumento seria o oposto. Portanto, sua estabilidade ao longo do tempo é surpreendentemente interessante e indica que os outros reflexos e processos modulatórios que disputam o controle da f_H também estão reduzidos após a instrumentação

e, provavelmente, se recuperam junto ao controle da pressão arterial. Este resultado sugere certo equilíbrio modulatório entre os processos autonômicos. Se tal interpretação estiver correta, nossos resultados indicam que esse equilíbrio está presente e é mantido na preparação descerebrada.

Similaridade barorreflexa

Durante o método de descerebração, as vias aferentes e eferentes e áreas de integração central para o barorreflexo foram mantidas, como os nervos cranianos, o núcleo do trato solitário, bulbo ventrolateral caudal e bulbo ventrolateral rostral (Guyenet, 2006; Robertson et al., 2012). Com base na similaridade de G_{op} , BEI, G_{50} , entre grupos experimentais, podemos assumir que o barorreflexo está trabalhando de forma eficiente em toda a sua faixa operacional na preparação descerebrada. Tal resultado em animais descerebrados também indica que há pouca influência das áreas superiores do córtex interferindo no barorreflexo em cascavéis em repouso, a 30°C.

O protocolo farmacológico também atestou a capacidade da preparação descerebrada em manter a resposta barorreflexa após interferências hemodinâmicas (Filogonio et al., 2019; Armelin et al., 2021). No presente estudo, realizamos o protocolo farmacológico somente após a verificação da recuperação. Naquele momento, o ganho operacional e o ganho máximo foram semelhantes em ambos os grupos. A estabilização do barorreflexo foi mantida até 72h, indicando que a capacidade recuperada da modulação autonômica não decaiu ao longo desse tempo experimental. Essa é uma informação muito relevante. De acordo com os dados presentes, os projetos experimentais futuros podem ser tão longos quanto o protocolo atual. Pode ser útil abordar a duração da preparação do animal descerebrado ao longo do tempo. No entanto, isso exigiria um protocolo experimental dedicado e deveria envolver outros parâmetros cardiovasculares.

Parâmetros cardiovasculares durante a recuperação

Os grupos experimentais recuperaram a estabilidade dos valores médios dos parâmetros cardiovasculares 24h após a cirurgia, porém o G_{op} demorou 48h para aumentar e se estabilizar. Estabelecer o tempo adequado para a recuperação pós-cirúrgica é fundamental em qualquer projeto experimental para estudos *in vivo*. Essa questão é ainda

mais relevante se o protocolo envolver anestésicos e animais ectotérmicos. A anestesia pode durar tempo variável de acordo com: o tipo de anestésico, sua dosagem, massa corporal do animal, metabolismo do animal e tempo de instrumentação (Misal et al., 2016). Vertebrados ectotérmicos podem variar seu metabolismo em uma ampla faixa, de acordo com a temperatura ou estágio de desenvolvimento (Ligon et al., 2012; Leite et al., 2013, 2014). Portanto, a recuperação da anestesia é uma questão especial na instrumentação nestes animais.

Esse argumento é relevante, pois em biologia experimental é comum apontar a estabilidade das médias de f_H ou PAM para indicar o restabelecimento em repouso e atestar a recuperação de animais em experimento *in vivo* (Porges et al., 2003; Taylor et al., 2009; Hedrick et al., 2015). Nosso experimento indica que os valores médios de ambas as variáveis podem se recuperar antes do mecanismo barorreflexo e sugerimos que esse fato deve ser considerado quando as investigações abordarem os mecanismos regulatórios. Diferenças entre o tempo de recuperação dos parâmetros cardiovasculares médios e indicadores de função autonômica foram observadas anteriormente em cascavéis (Sanchez, et al., 2019) e lagarto teiú (Duran et al., 2020). Essa recuperação depende da espécie e, obviamente, espera-se que seja fortemente afetada pela qualidade da instrumentação, protocolo de anestesia e temperatura. Embora a recuperação total da capacidade de modulação autonômica não seja necessária para parte das investigações experimentais, o uso de índices reducionistas, como f_H e PAM médias, deve ser considerado com bastante cautela.

5. Considerações Finais

Preparações descerebradas têm sido uma ferramenta útil para estudos mecanísticos em várias áreas das ciências fisiológicas. Diversos níveis de descerebração foram desenvolvidos em várias espécies, como ratos (Gringson et al., 1997; Nakanishi e Whelan, 2012), coelhos (Clarke e Harris, 2001), gatos (McWilliam et al., 1991; Montano et al., 1992), sapos (Wang et al., 1999), peixes (Uematsu e Todo, 1997), de acordo com o estudo (por exemplo, nocicepção, função reflexa, comportamento, anestesia e muitos outros - Woods, 1964; Lee et al., 2002 ; Lee et al. 2004; Pickering e Paton, 2006; Meehan et al., 2017). A metodologia de descerebração utilizada neste estudo procede à eliminação da estrutura cerebral rostral ao teto óptico e mantém o núcleo dos centros autonômicos (Rocha et al.,

2021; Castro et al., 2021). Isso elimina a ativação do córtex cerebral e do tálamo, que são estruturas essenciais para o processamento de estímulos dolorosos e distresse (Silverman et al. 2005). Além disso, por ser um processo irreversível, resultado de uma preparação funcionalmente limitada no tempo, este procedimento é considerado o momento da eutanásia (Silverman et al., 2005; Rocha et al., 2021). A baixa taxa metabólica de repouso da cascavel pareceu auxiliar no prolongamento do tempo de decadência. A combinação desses fatores alterou o limite de duração da preparação descrevendo uma ferramenta interessante para estudos cardiovasculares.

O presente estudo indica que a preparação descerebrada foi capaz de recuperação pós-cirúrgica e manutenção da f_H e PAM médias ao longo de 72h. Também foi capaz de modular a variação espontânea da pressão e também ajustar as alterações de pressão induzidas farmacologicamente na mesma magnitude das serpentes não descerebradas. Portanto, consideramos que esta preparação é capaz de produzir resultados representativos em investigações mecanísticas acerca da modulação autonômica do sistema cardiovascular.

6. Referências

- Armelin, V.A., Braga, V.H.S., Abe, A.S., Rantin, F.T. and Florindo, L.H.** Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake *Python molurus*. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 184, 903–912 (2014).
- Armelin, V.A., Braga, V.H.S., Teixeira, M.T., Guagnoni, I.N., Wang, T. and Florindo, L.H.** The nonpharmacological sequence method provides a reliable evaluation of baroreflex sensitivity in fish. *J Exp Zoology Part Ecol Integr Physiology* 335, 348–358 (2021).
- Bagshow, R.J.** Evolution of cardiovascular baroreceptor control. *Biol. Revil.* 60, 121-162 (1985).
- Bertelsen, M. F., Buchanan, R., Jensen, H.N., Leite, C.A.C., Abe, A.S., Nielsen, S.S. and Wang, T.** Assessing the influence of mechanical ventilation on blood gases and blood pressure in rattlesnakes. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 42, 386-393 (2015).
- Castro, S.A., Taylor, E.W., Tavares, D., Filogonio, R., Rodrigues, G.J. and Leite, C.A.C.** The role of nitric oxide on the cardiovascular system of South American rattlesnakes (*Crotalus durissus*) (2021).
- Clarke, R. and Harris, J.** The spatial organization of central sensitization of hind limb flexor reflexes in the decerebrated, spinalized rabbit. *European journal of pain* 5, 175-185 (2001).
- Coleman, T. G.** Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 238, 515–520 (1980).

- Crossley, D. A., Wearing, O. H., Platzak, B., Hartzler, L. K., and Hicks, J. W.** Acute and chronic temperature effects on cardiovascular regulation in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *Journal of Comparative Physiology B*, 185, 401–411 (2015).
- Di Rienzo M., Castiglioni, P., Mancina, G., Pedotti, A. and Parati, G.** Advancements in estimating baroreflex function. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 20, 25–32 (2001).
- Duran, L.M., Taylor, E.W., Sanches, P.V.W., Cruz, A.L., Tavares, D., Sartori, M.R., Abe, A.S. and Leite, C.A.C.** Heart rate variability in the tegu lizard, *Salvator merianae*, its neuroanatomical basis and role in the assessment of recovery from experimental manipulation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 240 (2020).
- Filogonio, R., Orsolini, K., Castro, S., Oda, G., Rocha, G., Tavares, D., Abe, A. and Leite, C.** Evaluation of the sequence method as a tool to access spontaneous baroreflex in reptiles. *Journal of Experimental Biology Part A*, 278, 1-8 (2019).
- Filogonio, R., Orsolini, K.F., Oda, G.M., Malte, H. and Leite, C.A.C.** Baroreflex gain and time of pressure decay at different body temperatures in the tegu lizard, *Salvator merianae*. *Plos One*, 15 (2020).
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W., Conlon, J.M. and Wang, T.** Cardiovascular actions of rattlesnake bradykinin ([Val(1), Thr(6)] bradykinin) in the anesthetized South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Am J Physiol-Reg I*, 288, 456–465 (2005a).
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W. and Wang, T.** The role of nitric oxide in the regulation of the systemic and pulmonary vasculature of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*, 175, 201–208 (2005b).
- Grigson, P.S., Kae’Lan, J.M., Roitman, M.F., Norgren, R. and Grill, H.J.** Reward comparison in chronic decerebrate rats. *Am J Physiol*, 273, 479-486 (1997).
- Guyenet, P.G.** The sympathetic control of blood Pressure. *Nature reviews Neuroscience*, 7, 335-346 (2006).
- Hagensen, M. K., Abe, A. S. and Wang, T.** Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 156, 458–462 (2010).
- Hedrick, M.S., McNew, K.A. and Crossley II, D.A.** Reprint of “Baroreflex function in anurans from different environments”. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 186, 61-65 (2015).
- Hettrick, D.A., Pagel, P.S. and Warltier D.C.** Isoflurane and Halothane Produce Similar Alterations in Aortic Distensibility and Characteristic Aortic Impedance. *Anesth Analg*, 83, 1166-1172 (1996).
- J.S., Morrow, D., Michael, C., Andresen, M.C. and Chang, K.S.K.** Isoflurane Depresses Baroreflex Control of Heart Rate in Decerebrate Rats. *Anesthesiology*, 96, 1214–1222 (2002).
- Lee, K., Nam, S.B., Lee, Y.L., Han, D.H., Cho, N.R. and Lee, J.S.** Effect of enflurane on the baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Yonsei Med J.*, 45 (3), 492-500 (2004).
- Leite, C.A.C., Taylor, E.W., Wang, T., Abe, A.S. and de 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*, 216, 1881–1889 (2013).
- Leite, C.A.C., Wang, T., Taylor, E. W., Abe, A.S., Leite, G.S.P.C. and de Andrade, D.O.V.** Loss of the ability to control right-to-left shunt does not influence the metabolic responses to temperature change or long-term fasting in the South American Rattlesnake *Crotalus durissus*. *Physiol Biochem Zool*, 87, 568–575 (2014).

- Ligon, D.B., Peterson, C.C. and Lovern, M.B.** Acute and Persistent Effects of Pre- and Posthatching Thermal Environments on Growth and Metabolism in the Red-Eared Slider Turtle, *Trachemys scripta elegans*. *J. Exp. Zool.*, 317, 227–235 (2012).
- McWilliam, P.N., Yang, T. and Chen, L.X.** Changes in the baroreceptor reflex at the start of muscle contraction in the decerebrate cat. *Journal of Physiology*, 436, 549-558 (1991).
- Meehan, C.F., Mayr, K.A., Manuel, M., Nakanishi, S.T. and Whelan P.J.** Decerebrate mouse model for studies of the spinal cord circuits. *Nature protocols*, 12, 732-747 (2017).
- Millard, R.W. and Moallir, R.** Baroreflex sensitivity in an amphibian, *Rana catesbeiana*, and a reptilian, *Pseudemys scripta elegans*. *The Journal of Experimental Zoology*, 213, 283-288 (1980).
- Misal, U.S., Joshi, S.A. and Shaikh, M.M.** Delayed recovery from anesthesia: A postgraduate educational review. *Anesth Essays Res.*, 10, 164–172 (2016).
- Montano, N., Lombardi, F., Ruscone, T.G., Contini, M., Finocchiaro, M.F., Baselli, G., Porta, A., Cerutti, S. and Malliani, A.** Spectral analysis of sympathetic discharge, R-R interval and systolic arterial pressure in decerebrate cats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 40, 21-32 (1992).
- Mosley, C.A.E., Dyson, D. and Smith, D.A.** The cardiovascular dose-response effects of isoflurane alone and combined with butorphanol in the green iguana. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 31, 64-72 (2004).
- Nagasaki, G., Tanaka, M. and Nishikawa, T.** The Recovery Profile of Baroreflex Control of Heart Rate After Isoflurane or Sevoflurane Anesthesia in Humans. *Anesth Analg.*, 93, 1127–31 (2001).
- Pickering, A.E. and 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*, 155, 260–271 (2006).
- Porges, S.W., Riniolo, T.C., McBride, T. and Campbell, B.** Heart rate and respiration in reptiles: Contrasts between a sit-and-wait predator and an intensive forager. *Brain and Cognition* 52, 88–96 (2003).
- Reid, I. A.** Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. *Physiology*, 11, 270–274 (1996).
- Robertson, D., Diedrich, A. and Chapleau, M.W.** Editorial on arterial baroreflex issue. *Auton Neurosci*, 172, 1-3 (2012).
- Rocha, G.C., Castro, S.A., Taylor, E.W., Tavares, D. and Leite, C.A.C.** A decerebrate preparation of the rattlesnake, *Crotalus durissus* provides as an experimental model for study of autonomic modulation of the cardiovascular system in reptiles. *Physiol and Biochem Zool.*, 94, 269–285 (2021).
- Rooney, B., Levine, G., Gaynor, J., Macdonald, E. and Wimsatt, J.** Sevoflurane Anesthesia in Desert Tortoises (*Gopherus agassizii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 30, 64-69 (1999).
- Sanches, P.V.W., Taylor, E.W., Duran, L.M., Cruz, A.L., Dias, D.P.M. and Leite, C.A.C.** Respiratory sinus arrhythmia is a major component of heart rate variability in undisturbed, remotely monitored rattlesnakes, *Crotalus durissus*. *Journal of Experimental Biology*, 222 (2019).
- Sandblom, E. and Axelsson, M.** Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. *J. Exp. Biol.*, 208, 821–829 (2005).
- Silverman, J., Garnett, N.L., Gisster, S.F., Heckman, C.J., Kulpa-Eddy, J.A., Lemay, M.A., Perry, C.K. and Pinter, M.** Decerebrate Mammalian Preparations: Unalleviated or Fully Alleviated Pain? Contemporary topics in laboratory animal science. *American Association for Laboratory Animal Science*, 44, 34-6 (2005).

- Skals, M., Skovgaard, N., Abe, A.S. and 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. *Journal of Experimental Biology*, 208, 3747-3759 (2005).
- Skovgaard, N., Galli, G.L.J., Abe, A.S., Taylor, E.W. and Wang, T.** The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. *Comp Biochem Phys A*, 142, 205–214 (2005).
- Taylor, E.W., Andrade, D.O.V., Abe, A.S., Leite, C.A.C. and 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.*, 212, 145–151 (2009).
- Uematsu, K., and Todo, T.** Identification of the midbrain locomotor nuclei and their descending pathways in the teleost carp, *Cyprinus carpio*. *Brain Research*, 773, 1–7 (1997).
- Vliet, B.N.V. and West, N.H.** Responses to circulatory pressures, and conduction velocity, of pulmocutaneous baroreceptors in *Bufo marinus*. *Journal of Physiology-London* 388, 41–53 (1987).
- Wang, T., Fernandes, W. and Abe, A.S.** Blood pH and O₂ homeostasis upon CO₂ anesthesia in the rattlesnake (*Crotalus durissus*). *Snake*, 25, 777–784 (1993).
- Wang, T., Taylor, E.W., Reid, S.G. and Milsom, W.K.** Lung deflation stimulates fictive ventilation in decerebrated and unidirectionally ventilated toads. *Respiration Physiology*, 118, 181–191 (1999).
- Wang, T., Joyce, W. and Hicks, J.W.** Similitude in the cardiorespiratory responses to exercise across vertebrates. *Current Opinion in Physiology*, 10, 137–145 (2019).
- Williams, C.J.A., Alstrup, A.K.O., Bertelsen, M.F., Jensen, H.M., Leite, C.A.C. and Wang, T.** Cardiovascular effects of alfaxalone and propofol in the bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49, 92-98 (2018).
- Woods, J.W.** Behaviour of chronic decerebrate rats. *J Neurophysiol*, 27, 635-44 (1964).
- Yi-Ming, W., Shu, H., Miao, C.Y., Shen, F.M., Jiang, Y.Y. and Su, D.F.** Asynchronism of the Recovery of Baroreflex Sensitivity, Blood Pressure, and Consciousness from Anesthesia in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 43, 1-7 (2004).
- Zena, L.A., Gargaglioni, L.H. and Bicego, K.C.** Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 179, 81–88 (2015).
- Zena, L.A., Dantonio, V., Gargaglioni, L.H., Andrade, D.V., Abe, A.S. and Bicego, K.C.** Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. *Journal of Experimental Biology* 219, 725–733 (2016).

CAPÍTULO 2

Recuperação e persistência da monulação autonômica em cascavéis descerebradas

(Crotalus durissus)

Resumo

A preparação da cascavel descerebrada (*Crotalus durissus*) se apresenta como um modelo experimental interessante para o estudo de fisiologia cardiovascular de squamatos. A preparação possibilita instrumentação para registro concomitante de vários parâmetros cardiovasculares sob modulação autonômica adequada. O lento decaimento de funções modulatórias foi apontado como um ponto relevante desta preparação. Contudo, tal suposição foi baseada em dados iniciais e sem a devida validação no tempo. A relevância e confiabilidade do modelo está, dentre outras coisas, relacionada ao tempo em que permanece viável e funcional, após a descerebração. Desta forma, nosso objetivo foi testar sua viabilidade pela análise da permanência de modulações autonômicas em longo prazo. Assim, analisamos a manutenção da estabilidade de parâmetros cardiovasculares em preparação instrumentada ao longo do tempo (dias) e o nível de modulação autonômica pela presença de indexadores de reflexos cardiovasculares complexos, como a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e barorreflexo (BaR). As variáveis cardiovasculares analisadas (frequência cardíaca, pressão arterial média sistêmica e pulmonar, fluxos sanguíneos sistêmico e pulmonar, condutâncias vasculares sistêmica e pulmonar, débito cardíaco e volume sistólico total) foram mantidas na condição de repouso esperada para a espécie por 15 dias após a descerebração. Da mesma forma, o BaR que estava presente e foi equivalente ao relatado para cascavéis em repouso (Ganho operacional, $1.130,0 \pm 229,7 \text{ ms} \cdot \text{kPa}^{-1}$). Além disso, as preparações descerebradas demonstraram reestabelecimento da VFC em repouso, indicada definidas pelo valor de PSD (*Power Spectral Density*, $186.834 \pm 108.520 \text{ ms}^2$). A presença dessas variáveis e o funcionamento das mesmas, em níveis semelhantes à animais intactos, denotam a recuperação e manutenção da modulação autonômica da atividade cardíaca pelo SNA e demonstram que o modelo é apto para ser utilizado em experimentos no estado de repouso e apresenta potencial para testes mais complexos que exijam maiores níveis de regulações das variáveis cardiovasculares.

Palavras-chave: sistema nervoso autônomo, variabilidade da frequência cardíaca, barorreflexo, *Crotalus durissus*, descerebração.

1. Introdução

Reptilia é uma classe polifilética que parece conservar aspectos fundamentais da história dos vertebrados. Compreender os sistemas circulatórios de grupos de répteis é fundamental para investigar várias questões relacionadas às funções do sistema cardiovascular e seus processos evolutivos em vertebrados (Taylor et al., 1999). Espécies de répteis têm sido utilizadas para estudar vários enigmas fisiológicos, tais como: o papel dos desvios cardíacos (Burggren et al., 2020; Leite et al., 2013, 2014; Eme et al., 2009; Taylor et al., 2009); o papel da inervação vascular parassimpática (Filogonio et al., 2020; Taylor et al., 2009; Leite et al., 2013, 2014); a evolução das câmaras cardíacas (Jensen et al., 2010, 2013a); a ontogenia da inervação do coração (Sartori et al., 2012, 2015); o efeito da temperatura no sistema cardiovascular (Baker et al., 1972; Galli et al., 2004; Bícigo et al., 2007; Filogonio et al., 2019); ajustes de sazonalidade (Zena et al., 2016); posicionamento do coração e efeito da ortostase (Armelin et al., 2014); recuperação autonômica pós-instrumentação (Duran et al., 2020; Sanches et al., 2019); dentre outros.

Apesar do grande interesse no sistema cardiovascular dos répteis, as investigações experimentais de alguns processos e mecanismos permanecem limitadas. Parte dos limites se baseiam no desenvolvimento de técnicas de instrumentação e confiabilidade das medidas *in vivo*, quando geradas sob instrumentação mais invasiva. Ou ainda, nos óbvios e corretos aspectos éticos que restringem o acesso à alguns mecanismos na experimentação animal. Desta forma, alguns mecanismos cardiovasculares tiveram sua descrição funcional baseada em preparações experimentais sob anestesia terminal (*open chest*). Este foi o caso do papel de fatores modulatórios como: óxido nítrico (Galli et al., 2005b; Skovgaard et al., 2005), catecolaminas (Galli et al., 2007) e bradicinina (Galli et al., 2005a). Apesar da ótima qualidade desses estudos, o modelo experimental usado supostamente limita as investigações que dependem de uma análise quantitativa das variáveis de interesse ou de modulações autonômicas complexas. As limitações dizem respeito ao conhecido efeito da anestesia nos parâmetros fisiológicos de repouso e nas funções autonômicas. Foi demonstrado que uma diversidade de substâncias anestésicas altera as variáveis fisiológicas, mesmo no melhor cenário experimental (Mosley et al., 2004; Taylor et al., 2009). Por exemplo, foi relatado que o isoflurano deprime o barorreflexo em roedores (Lee et al., 2002; Lee et al., 2004). O uso de óxido nítrico e halotano aumenta a atividade simpática eferente em cães (Bagshaw e Cox, 1982). Estudos com cascavéis indicaram que o uso de anestésicos pentobarbital diminui o tônus vagal e eleva a atividade simpática, gerando efeitos diretos no

sistema cardiovascular (Galli et al., 2005a). Alguns anestésicos, como os inalatórios, parecem ter efeitos menores. Foi observado que diferentes doses de sevoflurano (2,5% e 3,75%) não afetam a frequência cardíaca da tartaruga do deserto, *Gopherus agassizii*. Contudo, elas geram efeitos cardiovasculares já que diminuem as pressões: sistólica, diastólica e ventricular média (Rooney et al., 1999). Da mesma forma, foi observado que o isoflurano (3%) abole a modulação autonômica da frequência cardíaca e mantém algum efeito inibidor autonômico, mesmo algum tempo após o fim do fornecimento anestésico conforme observado em serpentes cascavéis, *C. durissus* (Sanchez et al., 2019) e lagartos teiús, *S. merianae* (Duran et al., 2020).

A despeito do efeito anestésico, a investigação de alguns mecanismos exige instrumentação complexa e/ou profunda e, portanto, dificilmente poderia ser aplicada em procedimentos para monitoramento *in vivo*. Por exemplo, uma investigação recente sobre o papel do desvio cardíaco teve dados complementares obtidos em diferentes grupos experimentais (Filogonio et al., 2016), o que impactou o número de animais utilizados e limitou a correlações de alguns parâmetros. A instrumentação intensa é um aspecto altamente limitante para a experimentação e, mesmo no melhor cenário possível, foi observado que afeta a recuperação autonômica e influencia o reestabelecimento adequado do repouso (Sanchez et al., 2019; Duran et al., 2020).

Recentemente foi apresentado um modelo interessante para estudos de mecanismos cardiovasculares sob modulação autonômica, a preparação da cascavel descerebrada (*C. durissus*). O uso de animais descerebrados potencialmente permite o registro de vários parâmetros concomitantes (como variáveis ventilatórias e cardiovasculares, temperatura, atividade nervosa, etc.), uma vez que a preparação está eutanasiada, sem o córtex cerebral e tálamo. Neste preparo, o sistema nervoso autônomo (SNA) é preservado, assim como todas as funções fisiológicas controladas por ele. Tal abordagem desabilita fundamentalmente qualquer processo com integração central superior assim como, processos levem à percepção de dor e/ou qualquer possível forma/interpretação de consciência. Na verdade, por este fato, por ser um procedimento final irrecuperável, que mantém apenas as funções vegetativas, é que o processo é considerado o momento da eutanásia (Silverman et al., 2005; Castro et al., 2021; Rocha et al., 2021). Após o procedimento neste tipo de preparação, a coleta de dados pode continuar em cursos de tempo variável, que estão relacionados ao tempo de viabilidade da preparação (Silverman et al., 2005; Dobson e Harris, 2012; Woods, 1964). Assim, investigamos a viabilidade da cascavel descerebrada ao longo do tempo, o que é fundamental

para atestar a viabilidade do modelo e compreende a abrangência de seu uso. Para tal, avaliamos como o processo de descerebração afeta a dinâmica de recuperação/inviabilidade da preparação após a descerebração. Assim, analisamos: a manutenção das variáveis cardiovasculares em repouso; presença e magnitude de um reflexo cardiovascular modulado pelo SNA, o barorreflexo; e a presença e progressão de alterações na variabilidade da frequência cardíaca (VFC). A VFC é o resultado final da presença de múltiplos processos autonômicos sobre a frequência cardíaca e assim, sua presença e o nível de variabilidade total tem sido um indicador valioso da modulação do SNA (Task Force, 1996; Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020).

2. Material e métodos

2.1 Animais experimentais

As cascavéis Sul Americanas, *Crotalus durissus*, utilizadas no experimento (n = 8, massa corporal: $852,0 \pm 43,41\text{g}$, média \pm EPM) foram doadas pelo Instituto Butantan e mantidas no Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar. Os animais eram mantidos em compartimentos individuais, em sala climatizada, com temperatura controlada à 28°C, fotoperíodo 12:12; com água *ad libitum* e alimentação com roedores a cada 15 dias. A alimentação era interrompida 15 dias antes de cada experimento. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética (CEUA- UFSCar).

2.2 Descerebração e registro de ECG

O protocolo de registro possui duas fases de instrumentação. Nesta primeira fase, foram realizados os procedimentos de descerebração e implantação de eletrodos de ECG. Utilizamos o procedimento de descerebração previamente descrito por Rocha e colaboradores (2021). Em resumo, para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram inicialmente sedados com aumento de PCO_2 (Wang et al., 1993; Leite et al., 2013, 2014) até que perdessem o controle motor. Isso permitiu manuseio seguro e intubação endotraqueal para ventilação mecânica com 3-5% de anestésico inalatório isoflurano (5 min a 5% para indução e 3% para manutenção da anestesia), 3-5 respirações $\times \text{min}^{-1}$ (volume corrente de

30 ml \times kg⁻¹). Sob anestesia, realizamos uma incisão rostro-caudal (~ 0,5cm) no dorso da cabeça para expor o crânio. Uma pequena abertura medial (~ 2-3 mm) foi perfurada na posição da 6ª escama caudal à cavidade ocular, o que permitiu acesso às meninges logo acima do teto óptico. A artéria subjacente e qualquer eventual vaso colateral foram cuidadosamente cauterizados e as meninges suavemente puncionadas e abertas. Todo o sistema nervoso, rostral a esse ponto, foi cauterizado e removido. A cavidade remanescente foi preenchida com algodão estéril para estabilização do tecido nervoso. Todas as estruturas neurais do cerebelo, tronco encefálico e porção posterior do hipotálamo permaneceram intactas. A incisão na cabeça foi posteriormente suturada. Imagens do procedimento podem ser visualizadas na Figura 1.

A descerebração, como procedimento irreversível que proporciona um estado irrecuperável, é considerada o momento da eutanásia (Silverman et al., 2005; Rocha et al., 2021; Castro et al., 2021) e assim, o estudo das funções autonômicas é executado em uma preparação eutanasiada com tempo de duração finito, mas ainda não conhecido. Todas as diretrizes éticas para a instrumentação animal continuaram sendo respeitadas enquanto a preparação estava em uso.

Durante o mesmo plano anestésico usado para descerebração, foram implantados eletrodos para registro do eletrocardiograma (ECG). Os eletrodos foram implantados bilateralmente em posições ventrais imediatamente anterior e posterior ao coração. Um eletrodo de referência foi posicionado dorsalmente, aproximadamente 10 cm caudal aos demais. Eletrodos e fios foram suturados no dorso da preparação para garantir a estabilidade do sinal. Inicialmente, a análise qualitativa do sinal de ECG foi usada para observar e atestar a viabilidade da preparação durante a progressão do procedimento de descerebração. Após observar evidências claras de ventilação espontânea após cessado o fornecimento anestésico, cada preparação foi transferida para um compartimento experimental individual (25 x 35 x 10 cm) posicionado em uma câmara com temperatura controlada estável, à 30°C temperatura preferencial de cascavéis (Filogonio et al., 2016) onde permaneceram durante o protocolo de registro. O ECG foi registrado diariamente para possibilitar as avaliações do progresso de alteração da VFC após o processo de descerebração. Cada preparação também recebeu tratamento profilático pós-operatório com injeções de antibiótico (Enrofloxaxina 11mg·kg⁻¹) e anti-inflamatório (Flunixinina meglumina 1,1 mg·kg⁻¹) no momento do procedimento e

após 48h, assim como 10 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) via injeção intraperitoneal para manutenção da hidratação.

2.3 Anatomia e histologia

Registros de imagens ao longo do processo foram utilizadas para estudo do procedimento e análise das estruturas remanescentes do SNC. Assim, imagens de fases do procedimento foram registradas com lupa Zeiss (Carl Zeiss Stemi 2000c). Após o final do experimento, as preparações foram dissecadas e amostras do Sistema Nervoso Central (SNC) foram lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) e registradas com lupa Zeiss (Carl Zeiss Stemi 2000c) por meio de câmera acoplada (AxioCam ERc 5s) com software AxioVision RI. 4.8.

Para caracterização anatômica, os tecidos foram fixados em formalina tamponada a 4%, desidratados em série crescente de álcool e incluídos em parafina. As seções (6 µm de espessura) foram coradas com o kit Tricrômio de Masson (EasyPath, EP - 11-20013, Brasil) e as fotografias foram obtidas com microscópio óptico Olympus BX61 (Olympus, Dinamarca) equipado com uma câmera conectada a um computador utilizando o software Olympus Visiopharm Integrator System -newCAST.

Para referência estrutural, utilizamos imagens do SNC de duas cascavéis não descerebradas. Esses animais (Massa media = $898,75 \pm 264,75$ g) passaram pelo mesmo procedimento de dissecação do SNC, registro e descrição.

2.4 Variáveis cardiovasculares

A análise da VFC foi utilizada como bioindicador de modulação autonômica primário (Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). Após observação de recuperação da VFC total, foi realizada uma segunda instrumentação para monitoramento cardiovascular. Para reduzir possíveis efeitos anestésicos sobre o sistema nervoso autônomo (SNA), após a cirurgia, o protocolo de anestesia inalatória foi aplicado com o anestésico inalável isoflurano com ventilação mecânica similar ao descrito anteriormente. Neste processo, para

estabilidade do animal durante o procedimento cirúrgico, foi utilizado bloqueador neuromuscular (Brometo de pancurônio - $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Após indução anestésica, fizemos uma incisão ventrolateral (~ 4,5 cm) do lado direito rostral ao coração, para expor a vasculatura central. A canulação oclusiva da artéria vertebral (PE50) e de um ramo da artéria pulmonar (PE20) proporcionaram acessos ao arco aórtico direito e à artéria pulmonar, respectivamente. Isso permitiu o registro da pressão arterial sistêmica e pulmonar e cálculo da pressão arterial sistêmica média (PAMsis) e pulmonar média (PAMPul). Os cateteres foram preenchidos com solução salina heparinizada (50 UI/ml, NaCl 0,9%). Além disso, sondas de fluxo perivascular foram implantadas sobre o arco aórtico esquerdo e artéria pulmonar, para registrar os fluxos sanguíneos do arco aórtico esquerdo e do circuito pulmonar, respectivamente (\dot{Q}_{Lao} e \dot{Q}_{pul} , 1,5PR - 1,5PR, Transonic Systems). As sondas foram envolvidas com gel de ultrassom estéril para estabilizar a transmissão do sinal. Os cabos destas foram fixados na borda da incisão ventrolateral para estabilidade da posição. Ao final do procedimento, cânulas e sondas foram fixadas com suturas no dorso da preparação. Após a instrumentação, cada preparação foi posicionada em decúbito ventral, e a anestesia cessada até o restabelecimento da ventilação espontânea.

2.5 Protocolo experimental e análise de dados

As presença e nível da VFC total foi utilizada para observar e atestar a presença de modulação autonômica na preparação descerebrada. Sua análise ao longo do tempo, após a descerebração, foi utilizada para avaliar a recuperação pós-cirúrgica e estabilização da modulação autonômica de acordo com a metodologia utilizada em squamatos (Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). Os registros de ECG foram utilizados para obter séries temporais de intervalos cardíacos sucessivos (RRi). As séries de RRi foram utilizadas para análises da VFC nos domínios do tempo e da frequência (software CardioSeries v2.7 - <http://www.danielpenteado.com> – Zena et al., 2016; Troiano et al., 2018). Análises no domínio do tempo foram utilizadas para obter o desvio padrão de RRi (SDNN) e pela raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre RRi adjacentes (RMSSD). A análise no domínio da frequência foi usada para obter o valor da variabilidade total, representada pela densidade espectral (PSD – *power spectral density*) usando a

Transformada rápida de Fourier (256 eventos consecutivos) com sobreposição de 50% após interpolação de 2 Hz (Sanches et al., 2019).

Após observação de estabilidade na VFC, as preparações passaram por nova instrumentação para o registro das variáveis cardiovasculares e análises do barorreflexo em repouso. Os mesmos registros foram feitos com as preparações anestesiadas com isoflurano (~ 2%). O anestésico teve o objetivo de suprimir o SNA para verificar a presença de modulação autonômica nas variáveis cardiovasculares aferidas (frequência cardíaca, pressões arteriais médias sistêmica e pulmonar, fluxos sanguíneos sistêmicos e pulmonar, condutâncias vasculares sistêmica e pulmonar, débito cardíaco e volume sistólico total) no repouso, e no barorreflexo observado.

Os registros das variáveis cardiovasculares foram iniciados 24 horas após a instrumentação. Para isso, os cateteres foram conectados a transdutores de pressão (Baxter Edward PX600). Estes foram calibrados contra uma coluna de mercúrio e acoplados a pré-amplificadores de sinal (Bridge Amp, ADInstruments). As sondas de fluxo foram conectadas a um medidor de fluxo sanguíneo para transdução e amplificação (Transonic Systems). O ECG foi registrado com os eletrodos previamente implantados. Os amplificadores foram conectados a um conversor A/D e continuamente registrados ($1\text{k}\cdot\text{seg}^{-1}$), Powerlab/LabChart, ADInstruments). As variáveis cardiovasculares permaneceram estáveis logo após as conexões. Bloqueador neuromuscular (Brometo de pancurônio - $0,5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) foi utilizado para prevenir movimentos corpóreos eventuais. A injeção não alterou os parâmetros cardiovasculares registrados. O sinal foi registrado por 2h após esta preparação para certificar a linha de base.

As pressões arteriais médias (PAM, mmHg) sistêmica e pulmonar foram calculadas como: $\text{PAM} = 1/3 (\text{Psistólica}) + 2/3 (\text{Pdiastólica})$. A frequência cardíaca (f_H , bpm) foi derivado do sinal de ECG. O fluxo sanguíneo sistêmico (\dot{Q}_{sis} , $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) foi calculado a partir do registro de \dot{Q}_{Lao} usando fatores de correção onde $\dot{Q}_{\text{sis}} = 2,6\cdot\dot{Q}_{\text{Lao}}$ (Filogonio et al., 2014) e $\dot{Q}_{\text{sis}} = 3,3\cdot\dot{Q}_{\text{sis}}$ (Galli et al., 2005b) para cascavéis não anestesiadas e anestesiadas, respectivamente. O débito cardíaco (DC) foi calculado como a soma de \dot{Q}_{sis} e \dot{Q}_{pul} por tempo, e o volume sistólico total (pulmonar + sistêmico) foi calculado como $\dot{Q}_{\text{sis}}\cdot f_H^{-1}$ (Crossley et al., 1998; Galli et al., 2005b). As condutâncias vasculares sistêmica e pulmonar foram calculadas como $G (\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}) = \dot{Q}\cdot P^{-1}$ (Lautt, 1989; O'Leary,

1991). A direção do desvio foi indicada pela razão: $\dot{Q}_{\text{pul}} \cdot \dot{Q}_{\text{sis}}^{-1}$ (Hicks e Comeau, 1994). Assim, o desvio D-E foi identificado para valores de razão <1 enquanto o desvio E-D foi identificado para valores > 1 (Hicks, 1996). Complacência vascular, C ($\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$) foi calculado como $V_{\text{sis}} \cdot \text{PP}$ (onde, PP = pressão de pulso; Chan et al., 2005). O Método da Sequência foi utilizado para analisar a presença e atividade do barorreflexo (f_{H} , PAM, $G_{\text{op}} - \text{ms} \cdot \text{kPa}^{-1}$, BEI, número de sequências barorreflexas e número total de rampas - Filogonio et al., 2019b). Para este, analisamos séries sequenciais de 300 ciclos cardíacos utilizando valores da pressão sistólica e RRi extraído do sinal PAMsis (LabChart - AD Instruments; software CardioSeries) de acordo com Di Rienzo e colaboradores (2001) e Filogonio e colaboradores (2019).

Vinte e quatro horas após o registro dos parâmetros cardiovasculares de repouso, a preparação foi intubada para ventilação mecânica e novamente anestesiada (5% de isoflurano durante 5 minutos para indução e 2% para manutenção da anestesia). Os parâmetros cardiovasculares e do barorreflexo foram registrados e analisados sob o efeito anestesia para identificar alterações decorrentes de modulação autonômica. O barorreflexo e VFC foram utilizados como índices de regulação autonômica. Os parâmetros foram comparados entre preparações estáveis antes e após a anestesia.

Após o término de todos os protocolos experimentais, cada preparação recebeu injeção intravascular de Tiopental ($100 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ - Pearson, Brasil) seguida de solução hipersaturada de KCl.

2.6 Análise estatística

Variações nos valores médios das variáveis de VFC (f_{H} , RRi, PSD, RMSSD, SDNN) foram comparadas ao longo do tempo utilizando ANOVA One-Way e teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis e Dunn de acordo com as distribuições de resíduos ($P < 0,05$; $n = 10$; GraphPad Prism 7.0).

Os valores médios para as variáveis cardiovasculares em repouso (f_{H} , PAMsis, PAMPul, \dot{Q}_{sis} , \dot{Q}_{pul} , DC, V_{stot} , G_{sis} , G_{pul} e a razão $\dot{Q}_{\text{pul}} \cdot \dot{Q}_{\text{sis}}^{-1}$) entre os grupos preparação estável e preparação anestesiada foram comparados com o teste t ou Mann-

Whitney após análise de distribuição (Shapiro-Wilk). O valor de $P < 0,05$ foi considerado em todos os casos ($n = 8$; GraphPad Prism 7.0).

Os valores médios dos parâmetros do barorreflexo (f_H , PAM, G_{op} , índice de eficiência do barorreflexo BEI, número de sequências barorreflexas, número total de rampas) foram testados para distribuição gaussiana (Shapiro-Wilk) e comparados entre preparação estável e grupos anestesiados utilizando teste t , ($P < 0,05$; $n = 8$; GraphPad Prism 7.0).

Valores médios para variáveis cardiovasculares em repouso (f_H , PAMsis, PAMPul, \dot{Q}_{sys} , \dot{Q}_{pul} , DC, V_{stot} , e a razão $\dot{Q}_{pul} \cdot \dot{Q}_{sys}^{-1}$) de dados previamente relatados com a mesma preparação - 24h após a descerebração (Rocha et al., 2021) foram comparados com valores da preparação a longo prazo utilizando One Sample t -test ($P < 0,05$; GraphPad Prism 7.0).

3. Resultados

3.1 Anatomia e histologia

A figura 1 ilustra fases da cirurgia de descerebração destacando-se o uso do método da cauterização que minimiza problemas com a hemorragia. A aplicação do cauterizador ocorre em ponto medial no teto óptico. É esperado que o calor e pequenos pontos de sangramentos dentro do SNC possuam efeito na borda do tecido remanescente. Ao final do procedimento o tecido restante é composto pelo cerebelo e estruturas caudais, como observados na figura 3. A comparação entre o encéfalo das preparações e o de animais intacto permitiu analisar a região do córtex que é destruída no procedimento de descerebração (figura 2 e 3).

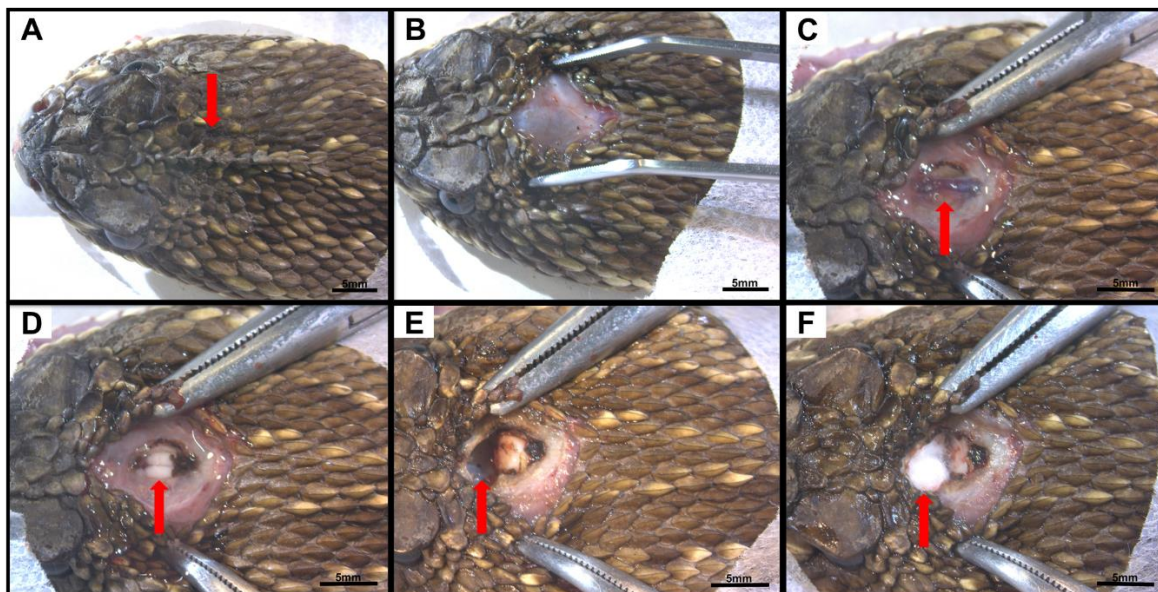


Figura 1. Passos do processo de descerebração em cascavel sul-americana *Crotalus durissus*. Sequências de imagens do dorso da cabeça de cascavel (682,54g) através de campo cirúrgico, onde observa-se: A, indicação da área de incisão (seta vermelha); B, incisão rostro-caudal medial; C, abertura do crânio com visão do vaso central; D, visão do teto óptico após cauterização do vaso e abertura das meninges; E, cavidade remanescente após cauterização e retirada do tecido nervoso; F, cavidade preenchida para estabilização. Escala 5mm.

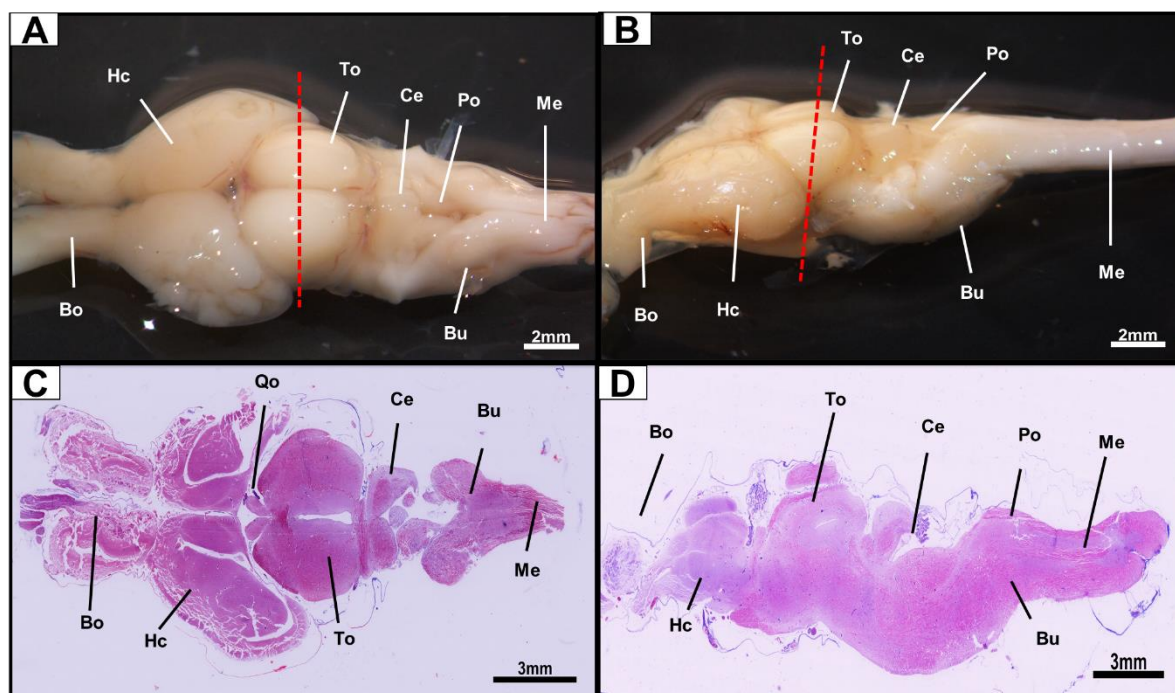


Figura 2. Imagens de encéfalo de cascavel não descerebrada, *Crotalus durissus* ($898,75 \pm 264,75\text{g}$). A - Imagem da superfície do SNC, vista dorsal; B - imagem da superfície do SNC, vista lateral; C - histologia do SNC, secção coronal na região medial; D - histologia do SNC, secção sagital na região medial. Linha tracejada indica área de corte no processo de descerebração. Ce - cerebelo, Hc- hemisférios cerebrais, Bu - bulbo, Bo - bulbos olfatórios, Qo - quiasma óptico, To - teto óptico, Po - ponte, Me - medula espinhal. Coloração Tricrômio de Masson.

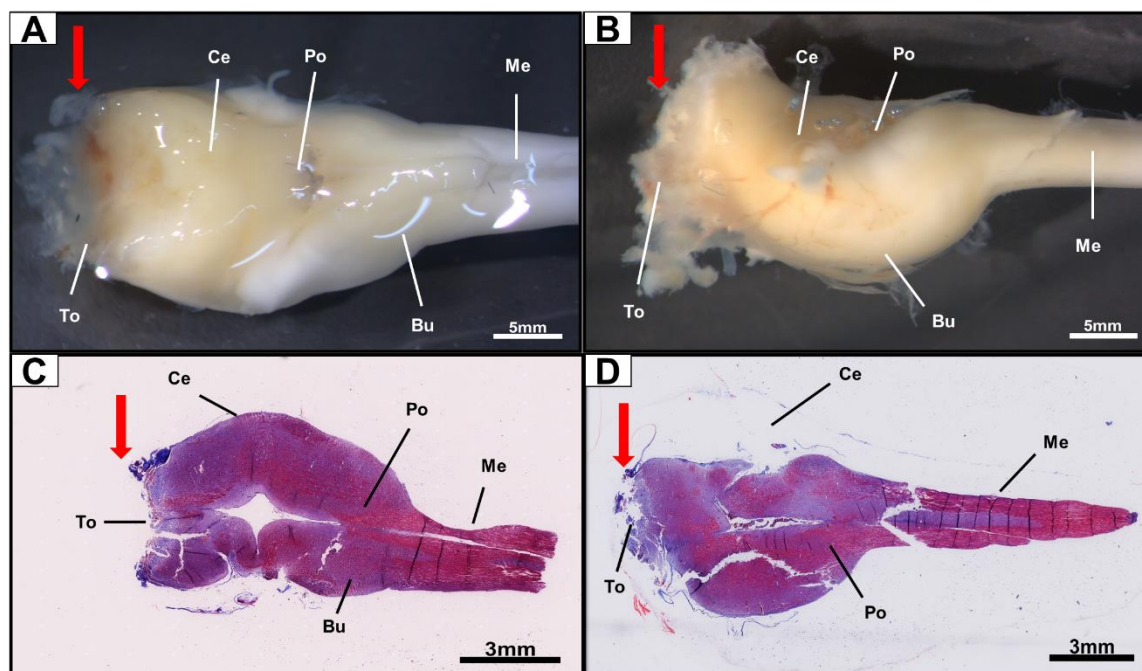


Figura 3. Imagens de encéfalo de cascavel descerebrada, *Crotalus durissus* (682,54). - Imagem da superfície do SNC, vista dorsal; A - imagem da superfície do SNC; B - imagem da superfície do SNC, vista lateral; C - histologia do SNC, secção coronal na região medial; D - histologia do SNC, secção sagital na região medial. Seta vermelha indica uma área da secção para descerebração. Ce - cerebelo, Bu - bulbo, To - teto óptico, Po - ponte, Me - medula espinhal. Coloração Tricrômio de Masson.

3.2 Modulação autonômica após descerebração

A f_H média e VFC alteraram-se ao longo do tempo após o procedimento de descerebração. A f_H média, que estava elevada inicialmente, diminuiu nas primeiras 24h após a cirurgia. A f_H permaneceu estável em torno de aproximadamente 25bpm ao longo dos 15 dias restantes (Fig. 4). A variabilidade de frequência cardíaca total, no entanto, indexada pela densidade espectral PSD (*power spectral density*), permaneceu em valores muito baixos durante os 6 dias seguintes. O PSD aumentou no 7º dia e permaneceu elevado e estável até o 15º dia variando entre $1 \cdot 10^5$ e $3 \cdot 10^5$ ms^2 . Em paralelo à recuperação de valores mais elevados de PSD, ocorre a esperada recuperação da dispersão deste sinal (Fig. 4). O perfil de recuperação do PSD foi corroborado pelas alterações observadas no domínio do tempo, RMSSD e SDNN, que indicam recuperação no 7º dia e estabilização após este momento (Tabela 1).

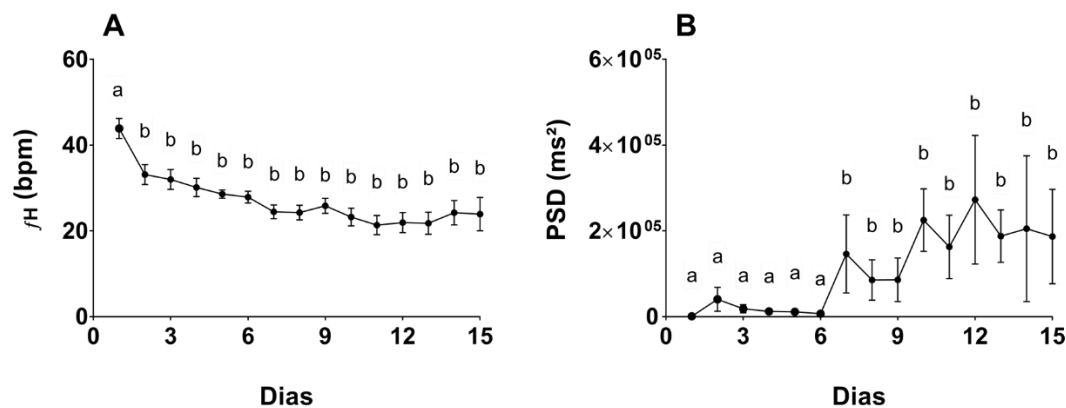


Figura 4. Variação da frequência cardíaca média (f_H - Painel A) e densidade espectral (PSD - Painel B) ao longo do tempo, após procedimento de descerebração em cascavéis, *Crotalus durissus*, a 30°C. Círculos são valores médios \pm EPM. O tempo zero é a primeira hora após a cirurgia. Letras diferentes indicam médias diferentes (Kruskal-Wallis - Dunns's, $P < 0,05$, $n = 10$).

Tabela 1. Parâmetros de VFC ao longo do tempo após descerebração em cascavel, *C. durissus*, a 30°C.

| Tempo após descerebração | RRi (s) | f_H (bpm) | PSD (ms^2) | RMSSD (ms) | SDNN (s) |
|--------------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| Primeira hora | $1,40 \pm 0,07^a$ | $43,88 \pm 2,32^a$ | $769,8 \pm 297,7^a$ | $22,02 \pm 6,73^a$ | $160,9 \pm 120,5^a$ |
| 5 dias | $2,16 \pm 0,07^{ab}$ | $28,59 \pm 0,96^b$ | 11.382 ± 4.914^{ab} | $47,31 \pm 9,29^{ab}$ | $361,2 \pm 232,2^{ab}$ |
| 7 dias | $2,56 \pm 0,18^b$ | $24,44 \pm 1,60^b$ | 146.164 ± 90.882^b | $355,9 \pm 172,1^b$ | $495,4 \pm 183,6^b$ |
| 10 dias | $2,70 \pm 0,16^b$ | $23,23 \pm 2,06^b$ | 225.135 ± 72.838^b | $410,6 \pm 127,8^b$ | $635,2 \pm 236,8^b$ |
| 15 dias | $2,77 \pm 0,28^b$ | $23,92 \pm 3,88^b$ | 186.834 ± 108.520^b | $368,2 \pm 151,1^b$ | $722,6 \pm 333,8^b$ |

Análises de VFC (valores são médias \pm EPM): RRi – intervalo de tempo entre batimentos cardíacos; f_H - frequência cardíaca; PSD - densidade espectral; RMSSD - Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre intervalos NN adjacentes; SDNN - Desvio padrão de todos os intervalos NN. Letras diferentes denotam valores diferentes ao longo do tempo. (ANOVA One-Way - Tukey / Kruskal-Wallis - Dunns's; $P < 0,05$; $n = 10$).

3.3 Parâmetros cardiovasculares em repouso em animais descerebrados

Os valores médios das variáveis cardiovasculares medidas nas preparações descerebradas não anestesiadas em repouso são apresentados na Tabela 2. Os valores de \dot{Q}_{sys} e \dot{Q}_{pul} na preparação de longo prazo foram menores e maiores, respectivamente, que os valores registrados 24h após descerebração para animais não anestesiados e,

consequentemente, a direção do desvio intracardíaco foi diferente entre esses dois grupos (Tabela 4).

Da mesma forma, a comparação com dados publicados anteriormente de serpentes em repouso não anestesiadas, em geral, indicou que as variáveis cardiovasculares foram semelhantes ao que foi relatado para animais em repouso (Tabela 4).

Tabela 2. Parâmetros cardiovasculares de preparações de cascavel (*Crotalus durissus*), descerebradas estáveis, a 25°C, com e sem anestesia inalatória (2% de isoflurano) e 24h após descerebração.

| Parâmetros cardiovasculares | Sem anestesia (15 dias) | 2% Iso (15 dias) | Rocha et al. (2021) Sem anestesia (24h) |
|---|--------------------------------|-------------------------|--|
| PAM _{sis} (kPa) | 5,02 ± 0,39 | 3,46 ± 0,58* | 4,50 ± 0,27 |
| Q̇ _{sis} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) | 18,82 ± 2,96 | 22,62 ± 8,16 | 29,80 ± 1,3 [†] |
| G _{sis} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹ ·kPa ⁻¹) | 5,46 ± 0,99 | 4,94 ± 0,85 | - |
| PAM _{pul} (kPa) | 2,73 ± 0,29 | 2,66 ± 0,22 | 3,21 ± 0,33 |
| Q̇ _{pul} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) | 17,04 ± 2,99 | 20,78 ± 3,62 | 7,10 ± 1,0 [†] |
| G _{pul} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹ ·kPa ⁻¹) | 6,69 ± 1,33 | 8,71 ± 1,91 | - |
| V _{stot} (ml·kg ⁻¹) | 1,00 ± 0,14 | 1,27 ± 0,25 | 1,00 ± 0,22 |
| f _H (beats·min ⁻¹) | 35,1 ± 2,02 | 33,89 ± 2,84 | 36,60 ± 0,7 |
| DC (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) | 34,23 ± 5,90 | 43,47 ± 9,65 | 36,90 ± 1,2 |
| Q̇ _{pul} · Q̇ _{sis} ⁻¹ | 1,16 ± 0,28 | 1,29 ± 0,24 | 0,24 ± 0,09 [†] |

Os valores são médias ± EPM: PAM_{sis} - pressão arterial média sistêmica; Q̇_{sys} - fluxo sistêmico; G_{sys} - condutância sistêmica; PAM_{pul} - pressão arterial média pulmonar; Q̇_{pul} - fluxo pulmonar; G_{pul} - condutância pulmonar; f_H - frequência cardíaca; V_{stot} - volume sistólico total; DC - débito cardíaco e Q̇_{pul} · Q̇_{sys}⁻¹ - direção do shunt, * indica diferenças entre preparações descerebradas anestesiadas e não anestesiadas (teste t / Mann-Whitney; P < 0,05; n = 8); indica [†] diferenças entre os grupos de preparação descerebrados não anestesiados de Rocha e colaboradores (2021), e o presente trabalho (t-test uma amostra; P < 0,05).

3.4 Modulação cardiovascular autonômica oferece suporte ao barorreflexo

Os animais descerebrados apresentaram clara atividade barorreflexa (Tabela 3). A preparação apresentava oscilações de pressão arterial normal, observadas como número de rampas de pressão. Parte delas foi seguida por oscilações compensatórias da frequência cardíaca, configurando sequências barorreflexas à uma proporção similar ao animal não descerebrado (rampas, sequencias e BEI – Tabela 3). A preparação manteve a PAM estável por possuir um ganho compensatório médio (G_{op}) similar ao de um animal não descerebrado (Tabela 3).

Tabela 3. Barorreflexo em grupos experimentais de cascavéis descerebradas, *Crotalus durissus*: preparação estável e preparação anestesiada (2% de isoflurano).

| Parâmetros Barorreflexos | Sem anestesia | 2% Iso |
|---|----------------------|---------------|
| f_H (beats·min ⁻¹) | 34,19 ± 1,54 | 35,46 ± 2,47 |
| PAM (kPa) | 5,62 ± 0,41 | 3,68 ± 0,64* |
| C (ml·kg ⁻¹ ·kPa ⁻¹) | 0,81 ± 0,16 | 1,69 ± 0,34* |
| G_{op} (ms·kPa ⁻¹) | 1.130,0 ± 229,7 | 1.230 ± 263,4 |
| BEI | 0,21 ± 0,02 | 0,21 ± 0,03 |
| Número de sequências barorreflexas | 16,00 ± 2,05 | 13,88 ± 1,55 |
| Número total de rampas | 74,75 ± 2,13 | 73,00 ± 5,45 |

Os valores são médias ± EPM: frequência cardíaca (f_H), pressão arterial média (PAM), complacência vascular (C), ganho operacional do barorreflexo (G_{op}), índice de eficiência do barorreflexo (BEI), número de sequências barorreflexas, número total de rampas. * denota diferenças entre os grupos de preparação de descerebrados anestesiados e não anestesiados (teste t; P <0,05; n = 8).

3.5 O efeito da anestesia sobre os parâmetros cardiovasculares

O nível de anestesia utilizado não causou grandes alterações nas variáveis cardiovasculares. A única variável fortemente afetada pelo protocolo anestésico utilizado (2% - Iso) foi a pressão arterial sistêmica (Tabela 2).

Após a primeira cirurgia, a presença de anestesia manteve os valores de VFC, RMSSD, SDNN e RRi atenuados até o 7º dia de recuperação. A influência da f_H ocorreu apenas 24 horas após o procedimento (Tabela 1). As preparações anestesiadas apresentaram VFC extremamente baixas com um PSD médio de $39,90 \pm 30,81$.

Os valores da PAM foram atenuados sob anestesia, no entanto, os valores médios de G_{op} , f_H , BEI, número de sequências barorreflexas e número total de rampas não foram diferentes. Isso está de acordo com a maior condutância e complacência vascular observada naquele grupo (Tabela 3).

Os parâmetros cardiovasculares de *Crotalus durissus* intactas com e sem a presença de anestésicos, relatados na literatura estão inseridos na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros cardiovasculares de estudos prévios em cascavel (*Crotalus durissus*), com e sem anestesia.

| Parâmetros cardiovasculares | Não-anestesiado | | | | | | anestesiado | | | | | | |
|---|--------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| | Tavares et al., (present work) | Rocha et al., (2021) | Taylor et al. (2009) | Filogonio et al. (2016) | Sanches et al., (2019) | Filogonio et al. (2019) – Media±SD | Tavares et al., (present work) | Rocha et al., (2021) | Galli et al. (2005a) | Galli et al. (2005b) | Skals et al. (2005) | Galli et al. (2007) | Sanches et al., (2019) |
| PSD (ms ²) | 186.834 ± 108,520 | - | - | - | 197.044 ± 111,242 | - | 39,90 ± 30,81 | - | - | - | - | - | 900 ± 101 |
| RMSSD (ms) | 368,2 ± 151,1 | - | - | - | 270,4 ± 126,84 | - | 18,30 ± 15,12 | - | - | - | - | - | 8,42±2,18 |
| G _{op} (ms·kPa ⁻¹) | 1.013,1 ± 231,1 | - | - | - | - | 2.811,9 ± 1.599,7 | 2,268 ± 429,8 | - | - | - | - | - | - |
| PAM _{sis} (kPa) | 5,02 ± 0,39 | 4,50 ± 0,27 | - | 4,4 ± 0,15 | - | - | 3,46 ± 0,58 | 2,93 ± 0,23 | 4,1 ± 0,7 | - | 4,4 ± 0,4 | 2,7 ± 0,3 | - |
| Q _{sis} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) | 18,82 ± 2,96 | 29,80 ± 1,3 ^a | 24,1 ± 2,8 | - | - | - | 22,62 ± 8,16 | 24,8 ± 2 | 95,2 ± 19,0 | 31,1 ± 2,6 | 128,2 ± 41,2 | 46,1 ± 6,9 | - |
| G _{sis} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹ ·kPa ⁻¹) | 5,46 ± 0,99 | - | - | - | - | - | 4,94 ± 0,85 | - | 23,5 ± 5,2 | - | - | 18,4 ± 3,7 | - |
| PAM _{pul} (kPa) | 2,73 ± 0,29 | 3,21 ± 0,33 | - | 2,3 ± 0,6 | - | - | 2,66 ± 0,22 | 2,33 ± 0,37 | 3,1 ± 0,1 | - | - | 2,4 ± 0,2 | - |
| Q _{pul} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) | 17,04 ± 2,99 | 7,10 ± 1,0 ^a | 33,6 ± 4,2 | - | - | - | 20,78 ± 3,62 | 7,6 ± 0,6 ^b | 56,3 ± 13,5 | - | 63,8 ± 20,1 | 24,6 ± 6,1 | - |
| G _{pul} (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹ ·kPa ⁻¹) | 6,69 ± 1,33 | - | - | - | - | - | 8,71 ± 1,91 | - | 19,6 ± 5,9 | - | - | 11,2 ± 3,0 | - |
| V _{stot} (ml·kg ⁻¹) | 1,00 ± 0,14 | 1,00 ± 0,22 | 2,35 ± 0,30 | 1,3 ± 0,1 | - | - | 1,27 ± 0,25 | 0,99 ± 0,22 | - | - | 3,7 ± 0,7 | 1,4 ± 0,3 | - |
| f _H (beats·min ⁻¹) | 35,1 ± 2,02 | 36,60 ± 0,7 | 28,2 ± 2,4 | - | 29,97 ± 6,0 | - | 33,89 ± 2,84 | 32,50 ± 1,0 | 43,4 ± 4,2 | - | 50,9 ± 2,8 | 45,1 ± 3,0 | 39,9 ± 1,5 |
| DC (ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) | 34,23 ± 5,90 | 36,90 ± 1,2 | - | - | - | - | 43,47 ± 9,65 | 32,4 ± 1 | - | - | - | - | - |
| Q _{pul} · Q _{sis} ⁻¹ | 1,16 ± 0,28 | 0,24 ± 0,09 ^a | 1,20 ± 0,14 | - | - | - | 1,29 ± 0,24 | 0,31 ± 0,12 ^b | - | - | 2,6 ± 0,8 | 0,6 ± 0,1 | - |

Os valores são médias ± SEM. PSD - densidade espectral de potência, PAM_{sis} - pressão arterial média sistêmica; Q_{sis} - fluxo sistêmico; G_{sis} - condutância sistêmica; PAM_{pul} - pressão arterial média pulmonar; Q_{pul} - fluxo pulmonar; G_{pul} - condutância pulmonar; V_{stot} - curso total; f_H - volume da frequência cardíaca; DC - débito cardíaco e Q_{pul} · Q_{sis}⁻¹ - direção do shunt. a denota diferenças entre os grupos de preparação descerebrados não anestesiados de Rocha et al. e o presente trabalho; b denota diferenças entre os grupos de preparação descerebrados anestesiados de Rocha et al. e o presente trabalho (teste t de uma amostra; P <0,05).

4. Discussão

Preparação descerebrada

O método usado para descerebração foi baseado em estudos anteriores (Rocha et al., 2021; Castro et al., 2021). Com base nos presentes dados, observamos que a preparação permanece estável ao longo de, ao menos, 15 dias após o procedimento preparatório. Ela é capaz de recuperar a capacidade da modulação autonômica e manter os parâmetros cardiovasculares no nível de repouso. Da mesma forma, não foi observado perda ou decréscimo de função modulatória autonômica para a manutenção da pressão arterial e para os processos que resultam na VFC até o final deste período.

O uso de preparações descerebradas é comum em vertebrados e tem sido descrito para várias espécies como ratos, gatos, coelhos, peixes e sapos em diferentes finalidades (Faber et al., 1982; Pickering e Paton, 1996; Uematsu e Todo., 1997; Wang et al., 1999). Essa abordagem experimental é necessária quando questões relevantes não podem ser tratadas adequadamente por experimentos *in vivo*. Especificamente, a descerebração envolve estudos do controle ou monitoramento de função profunda específica (por exemplo, função cerebral, reflexos posturais, nocicepção, ventilação, ingestão – Pickering e Paton, 1996; Hayashi, 2003; Darling e Ritter, 2009; Matsukawa, 2016), ou envolvem instrumentação profunda para investigar questões mecânicas que não dependem da interação animal x ambiente (por exemplo, registro de atividade nervosa relacionada às interações cardiorrespiratórias – Barrett e Taylor, 1985; Wang et al., 1999). Observamos que o termo descerebração pode descrever procedimento bem diferentes. Ele já foi utilizado para nomear procedimentos de ablação de parte diferentes do SNC como a remoção de hemisférios cerebrais (Fedde et al., 1977), ou de todo o telencéfalo (Stehouwer, 1987; Uematsu e Todo, 1997). Ele foi utilizado para descrever parte do procedimento para registro de tecido nervoso *in situ*, no tronco cerebral isolado, ou registro *in vitro* de fatias nervosas e/ou outra preparação segmentada (Barrett e Taylor, 1985; Funk e Greer, 2013; Moraes et al., 2014). Tais procedimentos são descritos atualmente como registros *ex vivo* ou *in vitro*. Atualmente, apesar de variações no procedimento, de forma geral, o método consiste minimamente na inativação do córtex tálamo, e o sistema límbico (Mosley, 2011; Perry e Nevarez, 2018) em um processo irreversível de perda de função do SNC que é, portanto, identificado como o momento da eutanásia (Silverman et al., 2005; Rocha et al, 2021; Castro et al., 2021).

O encéfalo de cascavéis possui formato alongado e com macroestrutura bem definidas e similares a outros squamatos, o que possibilitou sua identificação (fig. 3). Embora não haja referência na literatura para a descrição anatômica e histológica desta espécie, utilizamos a referência anatômica de outras serpentes e outros répteis (Warner, 1945; Allemand et al., 2007; Naumann et al., 2015) para escolha do nível de secção e do tecido a ser inviabilizado, como pode ser visto nas figuras 3 e 4. O nível de secção pode ser diferente a depender das características da espécie e da função a ser estudada. A descerebração pode ainda envolver inviabilização de tecido nervoso por aspiração do mesmo, secção, cauterização ou lesão química (Dobson e Harris, 2012; Stehouwer, 1987). O uso da cauterização foi interessante neste caso, pois um dos desafios do procedimento foi impedir casos de sangramentos ao longo do processo. O sangramento pode causar problemas por diversos motivos. Uma hemorragia grave pode causar problemas pela perda de sangue em si. Ela pode causar isquemia no tecido nervoso pela inviabilização dos vasos lesionados e não ocluídos, ou por gerar coágulos nos vasos atingidos. Casos de hemorragia no tecido nervoso, em especial, podem ocasionar a formação de coágulos no tecido remanescente, inviabilizando sinapses e assim, prejudicando vias de transmissão nervosas e ou centros funcionais (Woolf, 1984; Tankovic-Capin et al., 1998). A cauterização, apesar de causar dano físico ao tecido imediatamente adjacente à secção reduziu sangramentos ao mínimo, eliminando uma das principais limitações do procedimento.

Por este ser o momento da eutanásia, uma preparação descerebrada, após o procedimento, estará progredindo à inviabilização funcional. A retirada de parte do SNC invariavelmente, causará perda progressiva de funções que, eventualmente, resultarão em sua inutilização. A duração da viabilidade da preparação é um dos principais desafios para esta abordagem experimental (Clarke e Harris, 2001; Marchenko et al., 2002; Smith et al., 2002; Silverman et al., 2005; Dobson e Harrss, 2012). Normalmente, uma preparação descerebrada mantém apenas parte das funções do animal e, portanto, só é viável por um curto período de tempo – geralmente minutos ou horas (por exemplo, Wang et al., 1999; Reid et al., 2003; Wang et al., 2004; Zoccal et al., 2018). De fato, espera-se que o decréscimo progressivo na estabilidade da preparação comece no momento em que sua integridade fisiológica é prejudicada e esse é um dos principais motivos das limitações de protocolos experimentais. Portanto, um bom modelo experimental deve ser validado tanto para o nível/magnitude das variáveis de interesse e capacidade de respostas funcionais, quanto para sua estabilidade ao longo do tempo. Também argumentamos que validar o nível adequado

de modulação autonômica deve ser um ponto de interesse durante o desenvolvimento da preparação e da técnica, embora tal aspecto seja geralmente negligenciado.

Nosso preparo crônico manteve uma faixa de parâmetros cardiovasculares em repouso ao longo de 15 dias, apresentando valores de variáveis cardiovasculares semelhantes aos observados por Rocha et al., (2021), 24 horas após a cirurgia. Embora tenhamos observado diferenças nos valores de fluxo sanguíneo, os demais valores cardiovasculares foram semelhantes ao que tem sido relatado na literatura para cascavéis acordadas (Taylor et al., 2009; Filogonio et al., 2016; Filogonio et al., 2019; Sanches et al., 2019). Apesar de tal semelhança, verificamos que apenas 2 dos 6 estudos (nos referimos apenas a artigos que apresentaram valores tabelados), foram realizados com cascavel recuperada/não anestesiada (Galli et al., 2005a; Galli et al., 2005b; Skals et al., 2005; Galli et al., 2007; Taylor et al., 2009; Filogonio et al., 2016). Além disso, nossa preparação também manteve a modulação autonômica sem mostrar sinais detectáveis de deterioração da função. Sugerimos que tal resultado interessante foi a combinação oportuna entre as técnicas de descerebração utilizadas, que foi capaz de manter processos autonômicos importantes; com o baixo custo metabólico, característico da espécie escolhida. Essa combinação resultou em uma preparação estável e responsiva com longa duração.

O tempo de duração de uma preparação descerebrada varia muito. Alguns estudos que avaliaram parâmetros cardiovasculares ou comportamentais em mamíferos realizaram a coleta de dados entre 15 minutos (Ghali, 2019) a 2 horas após a cirurgia (McMahon e McWilliam, 1922; Montano et al., 1992). Este tempo pode ser estendido até 15 dias de recuperação (ratos - Grigson et al., 1997). Woods (1964) avaliou cronicamente as respostas comportamentais em 36 ratos descerebrados, com nove animais permanecendo viáveis por até 98 dias. Os autores relataram que a alimentação e a manutenção da temperatura foram os principais problemas identificados para a integridade da preparação, embora os principais reflexos permanecessem inalterados. Questões como manutenção da temperatura corporal e alimentação frequente não são problemas para cascavéis como animais ectotérmicos com comportamento alimentar senta e espera (Leite et al., 2014; Whitford et al., 2019). No entanto, usamos injeção i.p. de solução salina para garantir hidratação adequada.

Portanto, fomos capazes de estender a esperada deterioração da preparação ao longo do tempo. A perda de função não foi detectada pelas variáveis cardiovasculares registradas ao longo dos 15 dias de monitoramento. Isso valida tal preparação para protocolos

experimentais mais longos e assim, abre oportunidades para diversas abordagens investigativas. Estudos que se limitam a animais acordados, como os ajustes cardiovasculares progressivos para suportar alta demanda metabólica, como alteração de temperatura, incremento metabólico pós-prandial, limitação de suporte relacionada à alteração ambiental, como aquecimento ou estudos sobre as vias de nocicepção, e sobre a interferência farmacológica crônica são exemplos do possível uso do modelo do animal descerebrado.

Recuperação de VFC

Analizamos a presença e a magnitude de variáveis da VFC como índices de recuperação da modulação autonômica. A VFC é o resultado final de múltiplos processos e reflexos modulatórios autonômicos sobre a frequência cardíaca instantânea (Task Force, 1996). A VFC tem sido utilizada para apontar a recuperação autonômica em répteis (Campbell et al., 2006; Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). Nestes casos, a densidade do espectro da variabilidade cardíaca no domínio da frequência foi usada como indicador de VFC total e utilizado para análise quantitativa do procedimento de recuperação.

Embora o coração de vertebrados seja miogênico, a f_H instantânea é controlada pelo sistema nervoso autônomo (Task Force, 1996; Wang et al., 1999). A modulação parassimpática é predominante para esses ajustes finos entre batimentos (Taylor et al., 2014) e é responsável pela maior parte da VFC em todos os vertebrados estudados até o momento. Nos grupos não mamíferos ela gera quase que a totalidade da VFC (Taylor et al., 2014; Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). A arritmia sinusal respiratória, como uma variabilidade modulatória parassimpática, só é observada em ectotermos em repouso. O adequado equilíbrio entre SNA simpático e parassimpático favorecendo a modulação colinérgica é necessário para isso (Monteiro et al., 2018; Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). Portanto, o PSD, cujo valor foi de $186,834 \pm 108,520$, se manteve estável após o 7º dia até o fim dos registros, isto indica que há o restabelecimento da modulação autonômica sobre o coração e também, que há equilíbrio entre as modulações parassimpática e simpática semelhante ao equilíbrio de repouso das serpentes intactas. Estas possuem PSD médio em torno de $197,044 \pm 111,242 \text{ ms}^2$, valor muito similar ao observado no presente trabalho (Sanches et al., 2019).

A f_H média foi recuperada e manteve-se estável a partir de 24 horas após a descerebração. O PSD, contudo, demorou 7 dias para o mesmo. A discrepância entre a recuperação do PSD e da f_H média já foi relatada recentemente em répteis (Sanches et al., 2019; Duran et al., 2020). A f_H média e PSD se recuperaram em momentos diferentes em lagartos teiú (Duran et al., 2020) e cascavéis (Sanches et al., 2019) após instrumentação invasiva para implantação de dispositivo de telemetria. Nesses experimentos, o PSD levou dias para se recuperar e estabilizar, enquanto o f_H média voltou aos valores basais estáveis após 24h. Ambos parâmetros foram recuperados juntos em curto período de tempo após instrumentações simples, com implantação de eletrodos de ECG em peixes pulmonados (Monteiro et al., 2018). Assim, o tempo de recuperação destas variáveis pode estar relacionado ao quão invasivo é o procedimento indicando que procedimentos mais profundos teriam efeitos mais longos sobre a modulação autonômica (Monteiro et al., 2018; Duran et al., 2020). É importante considerar que aspectos como dor, desconforto, alerta, assim como as condições de acomodação experimental podem alterar a modulação autonômica e influenciar a recuperação do PSD. A f_H média, contudo, está relacionada diretamente ao débito cardíaco e assim, a taxa metabólica média do animal. Desta forma, em condições minimamente estáveis, deve retornar à níveis basais junto com o metabolismo. Uma mesma f_H média pode ser desenvolvida sob diferentes níveis de tônus autonômico, enquanto a VFC variará em níveis de equilíbrio distintos. A modulação autonômica para VFC (afirmada pela recuperação do PSD) depende de uma interação autonômica fina, que inclui ajustes gerados por muitas interações centrais e reflexos periféricos e tal equilíbrio é, provavelmente, mais difícil de ser recuperado após mudanças.

É interessante que o processo de descerebração não prejudique a recuperação do PSD e das demais variáveis que indicam a VFC total (RMSSD, SDNN e RRi). Esse fato indica que, apesar de ser afetada pelo input central, a modulação autonômica para VFC não é dependente da modulação central sobre o sistema autonômico em animais em repouso. Além disso, este resultado indica que a preparação utilizada é capaz de recobrar e refinar sua modulação autonômica quando devidamente recuperada.

Ajustes barorreflexo

O barorreflexo está presente e trabalhando em um nível observado no repouso em cascavéis acordadas. A análise do barorreflexo foi realizada pelo método da sequência, uma vez que permite adquirir dados sem o uso de drogas (Filogonio et al., 2019b). Além disso, o

método de sequência permite a avaliação de mudanças espontâneas na pressão arterial de forma que é possível caracterizar essas respostas sob comportamentos espontâneos e sem a necessidade de intervenções potencialmente estressantes no animal (Filogonio et al., 2019b; Di Rienzo et al., 2001).

Com o método de sequência, recentemente, o G_{op} foi registrado em algumas espécies de squamatos. Sua média e desvio padrão em cascavel, iguana verde e lagarto teiú foram de $2.811,9 \pm 1.599,7$, $642,2 \pm 306,8$ e $2.210,2 \pm 2.084,2$, respectivamente (Filogonio et al., 2019b). Estes valores foram relativamente semelhantes aos encontrados na preparação descerebrada, $1.013,1 \pm 653,5$.

O BEI varia próximo à 0,3 em vertebrados (Di Rienzo, 2001; Filogonio et al., 2019). O valor do BEI na cascavel descerebrada foi próximo a este, 0,21, e parece ser semelhante aos valores apresentados por Filogonio e colaboradores (0,20 – Filogonio et al., 2019). Este valor indica que, em cerca de 20% dos casos, o barorreflexo é capaz de superar as demais modulações concomitantes e pode recrutar ajustes. O número de rampas do barorreflexo, que indicaria a atividade do barorreflexo frente à oscilação natural do sinal da pressão arterial, também é semelhante ao da cascavel intacta (Filogonio et al., 2019).

O barorreflexo é complexo e envolve ajustes cardíacos (analisados pelo barorreflexo) e vasculares. Como ambos os ramos do barorreflexo são necessários para a manutenção da pressão arterial, podemos indicar com segurança que o SNA tem ampla capacidade de modulação do sistema cardiovascular na preparação descerebrada. Assim, como estavam sob modulação adequada, os valores da pressão arterial e da frequência cardíaca permaneceram constantes ao longo da duração do protocolo.

Os efeitos da anestesia

A alternativa inicial viável para enfrentar tais problemas de recuperação de instrumentação seria o uso de animais anestesiados para aquisição de dados. No entanto, tal abordagem pode enviesar os resultados. A anestesia acarreta alteração autonômica que, por sua vez, modifica as funções cardiovasculares e prejudica a coordenação das respostas. Por exemplo, foi relatado que a anestesia com isoflurano e enflurano atenuam as respostas cardiovasculares, PAM ou f_H (Lee et al, 2002; Lee et al., 2004; Mosley et al., 2004). O uso

da presente preparação descerebrada revelou novos aspectos da modulação cardiovascular, especialmente no que diz respeito à modulação do circuito pulmonar (Castro et al., 2021) que não foram detectados pelos animais anestesiados (Galli et al., 2005b; Galli et al., 2007).

Como o anestésico causa depressão do SNA, ele pode afetar as respostas reflexas de controle de f_H e PAM médias. Estudando cães, Seagard e colaboradores (1983) avaliaram as respostas nos níveis do arco barorreflexo sob efeito do isoflurano e afirmaram que a ação anestésica afeta as vias nervosas aferentes e eferentes, o SNC, os gânglios periféricos e o próprio coração. Isoflurano e enflurano induziram depressão do barorreflexo em ratos, diminuindo a PAM e f_H (Lee et al, 2002; Lee et al., 2004). Embora o isoflurano venha sendo utilizado atualmente em répteis, ainda não temos informações detalhadas sobre seus efeitos em diferentes grupos de répteis. A preparação descerebrada anestesiada apresentou atenuação nos valores de PAM induzida pelo isoflurano, porém nenhuma alteração na f_H , conforme demonstrado por Rooney et al., (1999) em tartarugas do deserto (*Gopherus agassizii*) submetidas a sevoflurano. Jakobsen e colaboradores (2017) observaram aumento de f_H em *Python regius* submetidas a três regimes diferentes de isoflurano, mas nenhuma alteração significativa nos valores de PAM. Em iguanas verdes, foi observado que maiores concentrações de isoflurano também diminuem a PAM e aumentam a f_H (Mosley et al., 2004). Segundo esses autores, os efeitos anestésicos podem ser específicos para cada espécie. Essa seria uma possível explicação para o resultado do G_{op} maior que do o esperado nos animais anestesiados, visto que em outros estudos o anestésico normalmente suprimia o barorreflexo (Lee et al, 2002; Lee et al., 2004).

O ganho barorreflexo não foi reduzido sob anestesia e este é um resultado que deve ser interpretado com cautela. Não se espera que a anestesia mantenha inalterada qualquer modulação de base neural. Em primeiro lugar, esse resultado indica que o ramo cardíaco do barorreflexo estava ativo. Indica também que foi menos afetado pelo nível de anestésico utilizado (2%), conforme evidenciado anteriormente pela manutenção da f_H média. Portanto, em cascavéis, baixos níveis de anestesia com isoflurano, manteriam parte das modulações cardíacas, ao mesmo tempo em que afetariam o controle autonômico dos leitos vasculares. Portanto, ainda é possível observar o barorreflexo, que é calculado sobre as alterações cardíacas.

Embora o G_{op} nos animais anestesiados tenha sido igual à preparação, o mecanismo barorreflexo não foi suficiente para controlar a PAM nesses animais. Portanto, sugerimos

que a presença de isoflurano adiciona um aspecto confuso para a interpretação dos dados cardiovasculares, embora tenha causado alterações relativamente pequenas.

Apesar da preparação ter um valor de G_{op} inalterado sob anestesia, o valor de PSD de $39,90 \text{ ms}^2$ pode ser interpretado como ausente. Ele é aproximadamente 4.700 vezes mais baixo que o valor esperado para um animal recuperado ($186.834,00 \text{ ms}^2$). Isto reafirma que a anestesia deprime partes do sistema autônomo. Este resultado indica que deve haver muita cautela ao interpretar dados funcionais obtidos em animais anestesiados.

5. Considerações finais

Acompanhamos as alterações da f_H média e VFC por 15 dias após a descerebração e identificamos a recuperação da modulação autonômica ao longo do tempo e sua manutenção em níveis adequados estáveis até o final das medições. A cascavel descerebrada apresentou capacidade regulatória do barorreflexo, indicando modulação autonômica dos parâmetros cardíacos e vasculares. Em répteis, este é o único modelo que permite registros cardiovasculares que continua fornecendo dados confiáveis equivalentes a um animal acordado em repouso no intervalo de tempo avaliado.

Esta preparação pode ser útil para estudos cardiovasculares em répteis squamatos, uma vez que possibilita o registro simultâneo de múltiplas variáveis, permitindo a correlação adequada de parâmetros; reduz o número de animais utilizados; permite escapar do efeito de viés anestésico; e também, permite a investigação de processos inacessíveis em preparações *in vivo*.

6. Referências

- Albrook, S.M., Bennion, G.R. and Ledsoe, J.R.** The Effects of Decerebration on the reflex response to pulmonary vein distension. *J. Physiol*, 226, 793-803 (1972).
- Allemande, R., Boistel, R., Daghfous, G., Blanchet, Z., Cornette, R., Bardet, N., Vincent, P., Houssaye, A.** Comparative morphology of snake (Squamata) endocasts: evidence of phylogenetic and ecological signals. *Journal of Anatomy*, 231, 849-868 (2017).
- Armelin, V.A, Braga, V.H.S., Abe, A.S., Rantin, F.T. and Florindo, L.H.** Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake *Python molurus*. *J Comp Physiol B*, 184, 903–912 (2014).

- Baker, L.A., Weathers, D.W.W. and White, F.N.** Temperature induced peripheral blood flow changes in lizards. *J Comp Physiol*, 80, 312–323 (1972).
- Bicego, K.C., Barros, R.C.H. and Branco, L.G.S.** Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comp Biochem Phys A*, 147, 616–639 (2007).
- Bagshaw, R.J. and Cox, R.H.** Nitrous oxide and the Baroreceptor Reflexes in the Dog. *Acta anaesth. Scand*, 26, 31-38 (1982).
- Barrett, D. and Taylor, E.** The characteristics of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the dogfish. *Journal of Experimental Biology*, 117, 459–470 (1985).
- Berson, D.M. and Hartline, P.H.** A Tecto-Rotundo-Telencephalic Pathway in the Rattlesnake: Evidence for a Forebrain Representation of the Infrared Sense. *The Journal of Neuroscience*, 8, 1074-1088 (1988).
- Brown, J.D. and Pinsky, C.** A decerebration technique for studies on the cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol*, 48, 154-156 (1970).
- Burggren, W., Filogonio, R. and Wang T.** Cardiovascular shunting in vertebrates: a practical integration of competing hypotheses. *Biological reviews*, 95, 449-471 (2020).
- Campbell, H.A., Leite, C.A.C., Wang, T., Skals, M., Abe, A.S., Egginton, S., Rantin, F.T., Bishop, C.M. and Taylor, E.W.** Evidence for a respiratory component, similar to mammalian respiratory sinus arrhythmia, in the heart rate variability signal from the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *J Exp Biol*, 209, 2628–2636 (2006).
- Chan, C.T., Jain, V., Picton, P., Pierratos, A. and Floras, J.S.** Nocturnal hemodialysis increases arterial baroreflex sensitivity and compliance and normalizes blood pressure of hypertensive patients with end-stage renal disease. *Kidney International*, 68, 338–344 (2005).
- Clarke, R.W., Ford, T.W. and Taylor, J.S.** Adrenergic and opioidergic modulation of a spinal reflex in the decerebrated rabbit. *Journal of Physiology*, 404, 407-417 (1988).
- Clarke, R. and Harris, J.** The spatial organization of central sensitization of hind limb flexor reflexes in the decerebrated, spinalized rabbit. *European journal of pain*, 5, 175-185 (2001).
- Crossley, D., Altimiras, J. and Wang, T.** Hypoxia elicits an increase in pulmonary vasculature resistance in anaesthetised turtles (*Trachemys scripta*). *Journal of experimental biology*, 201, 3367-3375 (1998).
- Cowley Jr., A.W.** Long-Term Control of Arterial Blood Pressure. *Physiological reviews*, 72, 231-300 (1992).
- Darling, R.A. and Ritter, S.** 2-Deoxy-D-glucose, but not mercaptoacetate, increases food intake in decerebrate rats. *American Journal of Physiology*, 297, 382-386 (2009).
- Almeida, A.T.R., Al-Izki, S., Denton, M.E. and Kirkwood, P.A.** Patterns of expiratory and inspiratory activation for thoracic motoneurons in the anaesthetized and the decerebrate rat. *J Physiol*, 588, 2707–2729 (2010).
- Di Rienzo, M., Castiglioni, P., Mancina, G., Pedotti, A. and Parati, G.** Advancements in estimating baroreflex function. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 20, 25–32 (2001).
- Dobson, K.L. and Harris, J.** A detailed surgical method for mechanical decerebration of the rat. *Exp Physiol*, 97, 693–698 (2012).
- Duran, L.M., Taylor, E.W., Sanches, P.V.W., Cruz, A.L., Tavares, D., Sartori, M.R., Abe, A.S. and Leite, C.A.C.** Heart rate variability in the tegu lizard, *Salvator merianae*, its neuroanatomical basis and role in the assessment of recovery from experimental manipulation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 240 (2020).
- Elegbe, E.O., Hopp, F.A., Bosnjak, Z.J., von Colditz, J.H., Kalbfleisch, J.H. and Kampine, J.P.** Effects of isoflurane on the baroreceptor reflex. *Anesthesiology*, 59, 511-520 (1983).

- Eme, J., Gwalthney, J., Blank, J.M., Owerkowicz, T., Barron, G. and Hicks, J.W.** Surgical removal of right-to-left cardiac shunt in the American alligator (*Alligator mississippiensis*) causes ventricular enlargement but does not alter apnea or metabolism during diving. *J Exp Biol*, 212, 3553–3563 (2009).
- Faber, J.E., Harris, P.D. and Wiegman, D.L.** Anesthetic depression of microcirculation, central hemodynamics, and respiration in decerebrate rats. *Am J Physiol*, 243, 837-43 (1982).
- Filogonio, R., Taylor, E.W., Carreira, L.B.T., Leite, G.A.P.C., Abe, A.S. and Leite, C.A.C.** Systemic Blood Flow Relations in Conscious South American Rattlesnakes. *South American Journal of Herpetology*, 9, 171–176 (2014).
- Filogonio, R., Wang, T., Taylor, E.W., Abe, A.S. and 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*, 186, 1059–1066 (2016).
- Filogonio, R., Wang, T., Abe, A., Leite, C.A.C.** Cooling and Warming Rates are Unaffected by Autonomic Vascular Control in the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus*). *South American Journal of Herpetology*, 14, 242–249 (2019).
- Filogonio, R., Orsolini, K., Castro, S., Oda, G., Rocha, G., Tavares, D., Abe, A. and Leite, C.** Evaluation of the sequence method as a tool to access spontaneous baroreflex in reptiles. *Journal of Experimental Biology Part A*, 278, 1-8 (2019).
- Filogonio, R., Sartori, M.R., Morgensen, S., Tavares, D., Campos, R., Abe, A.S., Taylor, E.W., Rodrigues, G.J., De Nucci, G., Simonsen, U., Leite, C.A.C. and Wang T.** The cholinergic regulation along the pulmonary arterial tree of the South American rattlesnake: vascular reactivity, muscarinic receptors, and vagal innervation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 319, 156-170 (2020).
- Funk, G. and Greer, J.** The rhythmic, transverse medullary slice preparation in respiratory neurobiology: contributions and caveats. *Respiratory physiology & neurobiology*, 186, 236-53 (2013).
- Galli, G.L.J., Taylor, E.W. and Wang, T.** The cardiovascular responses of the freshwater turtle *Trachemys scripta* to warming and cooling. *J Exp Biol*, 207, 1471–1478 (2004).
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W., Conlon, J.M. and Wang, T.** Cardiovascular actions of rattlesnake bradykinin ([Val(1), Thr(6)] bradykinin) in the anesthetized South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Am J Physiol-Reg I*, 288, 456–465 (2005a).
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W. and Wang, T.** The role of nitric oxide in the regulation of the systemic and pulmonary vasculature of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*, 175, 201–208 (2005b).
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W. and Wang, T.** The adrenergic regulation of the cardiovascular system in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. *Comp Biochem Phys A*, 148, 510–520 (2007).
- Ghali, M.G.Z.** Dynamic changes in arterial pressure following high cervical transection in the decerebrate rat. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 44, 399-410 (2019).
- Grigson, P.S., Kae’Lan, J.M., Roitman, M.F., Norgren, R. and Grill, H.J.** Reward comparison in chronic decerebrate rats. *Am J Physiol*, 273, 479-486 (1997).
- Gruberg, E.R., Kicliter, E., Newman, E.A., Kass, L. and Hartline, P.H.** Connections of the Tectum of the Rattlesnake *Crotalus viridis*: An HRP Study. *J. Comp. Neur*, 188, 31-42 (1979).
- Guyenet, P.G.** The sympathetic control of blood Pressure. *Nature reviews Neuroscience*, 7, 335-346 (2006).

- Hayashi, N.** Exercise pressor reflex in decerebrate and anesthetized rats. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, 2026-2033 (2003).
- Heard, D.J.** Reptile anesthesia. *Analgesia and anesthesia*, 4, 1094-9194 (2001).
- Hicks, J.W. and Comeau, S.** Vagal regulation of intracardiac shunting in the Turtle *Pseudemys scripta*. *J. Exp. Biol.*, 186, 109-126 (1994).
- Hicks, J.W. and Krosniunas, E.** Physiological states and intracardiac shunting in non-crocodylian reptiles. *Exp Biol Online*, 1, 35-57 (1996).
- Hicks, J.W., Ishimatsu, A., Molloy, S., Erskin, A. and Heisler, N.** The mechanism of cardiac shunting in reptiles: A new synthesis. *The Journal of Experimental Biology*, 199, 1435-1446 (1996).
- Hicks, J.W. and Wang, T.** Functional Role of Cardiac Shunts in Reptiles. *The Journal of Experimental biology*, 275, 204-216 (1996).
- Hicks, W.** The Physiological and Evolutionary Significance of Cardiovascular Shunting Patterns in Reptiles. *News Physiol Sci*, 17, 241-245 (2002).
- Ioannou, C.V., Stergiopoulos, N., Georgakarakos, E., Chatzimichali, E., Katsamouris, A.N. and Morel, D.R.** Effects of Isoflurane Anesthesia on Aortic Compliance and Systemic Hemodynamics in Compliant and Noncompliant Aortas. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 27, 282-1288 (2013).
- Jakobsen, S.L., Williams, C.J.A., Wang, T., and Bertelsen, M.F.** The influence of mechanical ventilation on physiological parameters in ball pythons (*Python regius*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 207, 30-35 (2017).
- Jensen, B., Abe, A.S., Andrade, D.V., Nyengaard, J.R. and Wang, T.** The Heart of the South American Rattlesnake, *Crotalus durissus*. *Journal of morphology*, 271, 1066-1077 (2010).
- Jensen, B., van den Berg, G., van den Doel, R., Oostra, R.J., Wang, T. and Moorman, A.F.M.** Development of the Hearts of Lizards and Snakes and Perspectives to Cardiac Evolution. *PLoS ONE* 8, (2013a).
- Jensen, B., Wang, T., Christoffels, V.M. and Moorman, A.F.M.** Biochimica et Biophysica Acta. *BBA-Mol Cell Res*, 1833, 783-794 (2013b).
- Lautt, W.W.** Resistance or conductance for expression of arterial vascular tone. *Microvasc. Res.*, 37, 230-236 (1989).
- J.S., D., Michael, C., Andresen, M.C. and Chang, K.S.K.** Isoflurane Depresses Baroreflex Control of Heart Rate in Decerebrate Rats. *Anesthesiology*, 96, 1214-22 (2002).
- Lee, K., Nam, S.B., Lee, Y.L., Han, D.H., Cho, N.R. and Lee, J.S.** Effect of enflurane on the baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Yonsei Med J.*, 45, 492-500 (2004).
- Leite, C.A.C., Taylor, E.W., Wang, T., Abe, A.S. and 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*, 216, 1881-1889 (2013).
- Leite, C.A.C., Wang, T., Taylor, E.W., Abe, A.S., Leite, G.S.P.C. and Andrade, D.O.V.** Loss of the ability to control right-to-left shunt does not influence the metabolic responses to temperature change or long-term fasting in the South American Rattlesnake *Crotalus durissus*. *Physiol Biochem Zool*, 87, 568-575 (2014).
- Lillywhite, H.B. and Donald, J.A.** Neural Regulation of Arterial Blood Pressure in Snakes. *Physiological Zoology*, 67, 1260-1283 (1994).
- Marchenko, V., Granata, A. and Cohen, M.** Respiratory cycle timing and fast inspiratory discharge rhythms in the adult decerebrate rat. *American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, 283, 931-940 (2002).

- Matsukawa, K., Ishii, K., Asahara, R. and Idesako, M.** Central command does not suppress baroreflex control of cardiac sympathetic nerve activity at the onset of spontaneous motor activity in the decerebrate cat. *J Appl Physiol*, 121, 932-943 (2016).
- McMahon, S.E. and McWilliam, P.N.** Changes in R-R interval at the start of muscle contraction in the decerebrate cat. *Journal of Physiology*, 447, 549-562 (1992).
- Monteiro, D.A., Taylor, E.W., Sartori, M.R., Cruz, A.L., Rantin, F.T. and Leite, C.A.C.** Cardiorespiratory interactions previously identified as mammalian are present in the primitive lungfish. *Science advances*, 4 (2018).
- Montano, N., Lombardi, F., Ruscone, T.G., Contini, M., Finocchiaro, M.F., Baselli, G., Porta, A., Cerutti, S. and Malliani, A.** Spectral analysis of sympathetic discharge, R-R interval and systolic arterial pressure in decerebrate cats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 40, 21-32 (1992).
- Mosley, C.A.R., Dyson, D. and Smith, D.A.** The cardiovascular dose-response effects of isoflurane alone and combined with butorphanol in the green iguana. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 31, 64-72 (2004).
- Mosley, C.** Pain and Nociception in Reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 14, 45-60 (2011).
- Moraes, D., Bonagamba, L., Costa, K., Costa-Silva, J., Zoccal, D. and Machado, B.** Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *Journal of Physiology*, 592, 2013–2033 (2014).
- Naumann, R.K., Ondracek, J.M., Reiter, J., Shein-Idelson, M., Tosches, M.A., Yamawaki, T.M., and Laurent, G.** The reptilian brain. *Current Biology Magazine*, 25, 301-327 (2015).
- O'Leary, D.S.** Regional vascular resistance vs. conductance: which index for baroreflex responses? *Am. J. Physiol.*, 260, 632-637 (1991).
- Perry, S.M. and Nevarez, J.G.** Pain and Its Control in Reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 21, 1-16 (2018).
- Pickering, A.E. and 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*, 155, 260–271 (2006).
- Reid, S., Sundin, L., Florindo, L., Rantin, F. and Milsom, W.** Effects of afferent input on the breathing pattern continuum in the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 136, 39–53 (2003).
- Robertson, D., Diedrich, A. and Chapleau, M.W.** Editorial on arterial baroreflex issue. *Auton Neurosci*, 172, 1-3 (2012).
- Rocha, G.C., Castro, S.A., Taylor, E.W. and Leite, C.A.C.** A decerebrate preparation of the rattlesnake, *Crotalus durissus*, provides an experimental model for study of autonomic modulation of the cardiovascular system in reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 94, 269-285 (2021).
- Rooney, B., Levine, G., Gaynor, J., Macdonald, E. and Wimsatt, J.** Sevoflurane Anesthesia in Desert Tortoises (*Gopherus agassizii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30, 64-69 (1999).
- Sanches, P.V.W., Taylor, E.W., Duran, L.M., Cruz, A.L., Dias, D.P.M., Leite, C.A.C.** Respiratory sinus arrhythmia is a major component of heart rate variability in undisturbed, remotely monitored rattlesnakes, *Crotalus durissus*. *Journal of Experimental Biology* 222 (2019).
- Sartori, M.R., Taylor, E.W. and Abe, A.S.** Nitrogen excretion during embryonic development of the green iguana, *Iguana iguana* (Reptilia; Squamata). *Comp Biochem Phys A*, 163, 210–214 (2012).

- Sartori, M.R., Leite, C.A.C., Abe, A.S., Crossley, D.A. and Taylor, E.W.** The progressive onset of cholinergic and adrenergic control of heart rate during development in the green iguana, *Iguana iguana*. *Comp Biochem Phys A*, 188, 1–8 (2015).
- Silverman, J., Garnett, N.L., Giszter, S.F., Heckman, C.J., Kulpa-Eddy, J.A., Lemay, M.A., Perry, C.K. and Pinter, M.** Decerebrate Mammalian Preparations: Unalleviated or Fully Alleviated Pain? Contemporary topics in laboratory animal science. *American Association for Laboratory Animal Science*, 44, 34-6 (2005).
- Skals, M., Skovgaard, N., Abe, A.S. and 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. *Journal of Experimental Biology*, 208, 3747-3759 (2005).
- Skovgaard, N., Galli, G.L.J., Abe, A.S., Taylor, E.W. and Wang, T.** The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. *Comp Biochem Phys A*, 142, 205–214 (2005).
- Smith, J., Paton, J. and Andrews, P.** An arterially perfused decerebrate preparation of *Suncus Murinus* (House Musk Shrew) for the study of emesis and swallowing. *Experimental Physiology*, 87, 563-574 (2002).
- Smith, S.A., Mitchell, J.H. and Garry, M.G.** Electrically induced static exercise elicits a pressor response in the decerebrate rat. *Journal of Physiology*, 537, 961–970 (2001).
- Stehouwer, D.J.** Effect of Tectotomy and Decerebration on Spontaneous and Elicited Behavior of Tadpoles and Juvenile Frogs. *Behavioral Neuroscience*, 101, 378-384 (1987).
- Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology.** Heart rate variability standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur. Heart J.*, 17, 354–381 (1996).
- Taylor, E.W., Jordan, D. and Coote, J.H.** Central Control of the Cardiovascular and Respiratory Systems and Their Interactions in Vertebrates. *Physiological reviews* 79 (1999).
- Taylor, E.W., Andrade, D.O.V., Abe, A.S., Leite, C.A.C. and 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*, 212, 145–151 (2009).
- Taylor, E., Leite, C.A.C., Sartori, M., Wang, T., Abe, A. and Crossley, D.** The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 217, 690–703 (2014).
- Thrasher, T.N.** Baroreceptors, baroreceptor unloading, and the long-term control of blood Pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288, 819-27 (2005).
- Tian, G.F. and Duffin, J.** Connections from upper cervical inspiratory neurons to phrenic and intercostal motoneurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. *Exp Brain Res*, 110,196-204 (1996).
- Troiano, N., Armelin, V., Braga, V., Abe, A., Rantin, F. and Florindo, L.** The autonomic control of upright posture tachycardia in the arboreal lizard *Iguana iguana*. *Journal of Experimental Zoology*, 329, 130–139 (2018).
- Trolin, G.** Effects of pentobarbitone and decerebration on the clonidine-induced circulatory changes. *European Journal of Pharmacology*, 34, 1-7 (1975).
- Tsuchimochi, H., McCord, J.L., Hayes, S.G., Koba, S. and Kaufman, M.P.** Chronic femoral artery occlusion augments exercise pressor reflex in decerebrated rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299, 106-13 (2010).
- Uematsu, K. and Todo, T.** Identification of the midbrain locomotor nuclei and their descending pathways in the teleost carp, *Cyprinus carpio*. *Brain Research*, 773, 1–7 (1997).

- Wang, T., Fernandes, W. and Abe, A.S.** Blood pH and O₂ homeostasis upon CO₂ anesthesia in the rattlesnake (*Crotalus durissus*). *Snake*, 25, 777–784 (1993).
- Wang, T., Taylor, E.W., Reid, S.G. and Milsom, W.K.** Lung deflation stimulates fictive ventilation in decerebrated and unidirectionally ventilated toads. *Respiration Physiology*, 118, 181–191 (1999).
- Wang, T., Warburton, S., Abe, A. and Taylor, T.** Vagal control of heart rate and cardiac shunts in reptiles: Relation to metabolic state. *Experimental Physiology*, 86, 777–784 (2001).
- Wang, T., Taylor, E.W., Reid, S.G. and Milsom, W.K.** Interactive effects of mechano- and chemo-receptor inputs on cardiorespiratory outputs in the toad. *Resp Physiol Neurobi*, 140, 63–76 (2004).
- Warner, F.J.** The Diencephalon and Midbrain of the American Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Zool. Soc. Lond.*, 116 (1945).
- Whitford, M.D., Freymiller, G.A. and Higham, T.E.** Determinants of predation success: How to survive an attack from a rattlesnake. *Functional ecology*, 33, 1099–1109 (2019).
- Woods, J.W.** Behaviour of chronic decerebrate rats. *J Neurophysiol*, 27, 635–44 (1964).
- Zena, L.A., Dantonio, V., Gargaglioni, L.H., Andrade, D.O.V., Abe, A.S. and Bicego, K.C.** Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. *J Exp Biol*, 219, 725–733 (2016).
- Zena, L., Leite, C.A.C., Longhini, L., Dias, D., Silva, G., Hartzler, L., Gargaglioni, L. and Bicego, K.** Analysis of the respiratory component of heart rate variability in the Cururu toad *Rhinella schneideri*. *Scientific Reports*, 7 (2017).
- Zoccal, D., Amarante, M., Flor, K.** Disinhibition of Bötzing Complex Abolishes Active Expiration Induced by Sustained Hypoxia in Rats. *The FASEB Journal*, 32, 893–893 (2018).

CAPÍTULO 3

**Modulação cardiovascular em cascavéis (*Crotalus durissus*) descerebradas:
viabilidade da preparação para protocolos longos**

Resumo

Recentemente, foi sugerido que o modelo da cascavel descerebrada poderia ser útil para estudos de longo prazo. A preparação descerebrada proposta tem parte do encéfalo inativado e permite graus de instrumentação mais elevados, livre de possíveis efeitos indesejáveis de anestésicos sobre sistema nervoso autônomo (SNA). A validação do modelo permite inferir a capacidade de recuperação e regulação do SNA, bem como seu limite para realizar modulações complexas dias após a cirurgia. Para investigar tal questão, espécimes de *Crotalus durissus* foram descerebradas e passaram por longo protocolo de recuperação, 15 dias, em repouso a 30°C. Posteriormente, as preparações passaram por instrumentação para registro de variáveis cardiovasculares e foram submetidas à desafios autonômicos para análise de modulação hemodinâmica relacionadas às alterações de retorno venoso e perfusão cefálica, além da estimulação química de quimiorreceptores de O₂. As mesmas medidas também foram realizadas após anestesia com isoflurano 2%. A alteração de retorno venoso desencadeou variações nas pressões arteriais sistêmicas (PAMsis) e pulmonares (PAMPul) com mecanismos compensatórios nas complacências vasculares e conseqüentemente nos fluxos sanguíneos em ambos os circuitos sistêmico e pulmonar, com acentuado desvio de sangue para o circuito pulmonar. A alteração de perfusão cefálica resultou em diminuição do débito cardíaco (DC) e PAMsis, que foram compensadas, provavelmente, através do barorreflexo e reflexo de Cushing. O estímulo aos quimiorreceptores de O₂ causou aumento na condutância e fluxo pulmonar e pronunciado desvio sanguíneo para o circuito pulmonar. Após o fim dos desafios, todos os parâmetros retornaram para seus estados basais. A anestesia com 2% de isoflurano atenuou as respostas demonstrando a natureza autonômica da modulação cardiovascular observada. As preparações foram capazes de realizar regulações complexas que envolveram respostas primárias e secundárias compensatórias frente às manobras realizadas. A preservação das respostas credita confiabilidade para uso do modelo em experimentação de longa duração.

Palavras-chave: répteis, *head lift*, *tail lift*, ortostase, quimiorreceptor, SNA, cianeto, descerebração.

1. Introdução

Os répteis constituem uma classe de vertebrados que ocupam posição estratégica na cadeia evolutiva de forma que estes animais são interessantes para investigações sobre mecanismos, adaptações e interações de diferentes sistemas fisiológicos. Muitas das informações básicas sobre a função cardiovascular de répteis foram obtidas com o uso de abordagens *in situ* para o registro de múltiplos parâmetros fisiológicos. Neste procedimento, o monitoramento é realizado em animais sob anestesia terminal (Wang et al., 2003; Galli et al., 2005; Keen et al., 2016, Willians et al., 2021). Contudo, o uso de anestésico pode trazer efeitos indesejados, atenuando ou exacerbando alguns dos parâmetros fisiológicos de interesse. Da mesma forma, pode haver alteração ou bloqueio de mecanismos modulatórios autonômicos (Lee et al., 2002, Lee et al., 2004, Mosley et al., 2004, Yu et al., 2004 Ioannou et al., 2013, Ghali e Ghali, 2021). Tais efeitos possuem impacto relevante no estudo de mecanismos e função cardiovascular.

O uso da descerebração como procedimento em experimentação animal é antigo e já foi utilizado em diversas espécies, como gatos (Tenney e Ou, 1977; Whelan, 1996), cães (Nielsen et al., 1986; Tonkovic-Capin et al., 1998), ratos (Woods, 1964; Smith et al., 2001; Tsuchimochi et al., 2010), coelhos (Blake e Korner, 1982; Clarke e Harris, 2001), sapos (Wang et al., 1999; Gargaglioni et al., 2007), tartarugas (Takeda et al., 1986; Sarrafizadeh et al., 1996) e peixes (Reid et al., 2003; Burleson e Silva, 2011). Esta técnica, originalmente, visa a inviabilização de áreas específicas do SNC para a investigação de sua função. Contudo, seu uso pode ser indicado para prover preparações eutanasiadas, em procedimentos de grande invasividade, sem anestesia (Silverman et al., 2005). Outra vantagem emergente de tais preparações é que a possibilidade de executar múltiplos registros fisiológicos, mesmo que sob instrumentação profunda, aumenta a possibilidade de interação e confiabilidade nos dados e pode reduzir consideravelmente o número de espécimes utilizadas, atendendo diretrizes éticas e o princípio dos 3Rs (Graham e Prescott, 2015).

Na presente investigação, a descerebração foi planejada de forma a preservar os núcleos do SNA e assim, manter a capacidade de modulação autonômica para ajustes cardiovasculares. Para avaliar a presença de tais ajustes, utilizamos desafios que provocam alterações dinâmicas transitórias na regulação do sistema cardiovascular e fornecem uma visão global sobre sua capacidade de modulação para manutenção da estabilidade funcional (Lillywhite, 1987; Taylor et al., 1999; Armelin et al., 2019). O modelo foi testado,

inicialmente, 24h após a descerebração (Rocha et al., 2021) e apresentou respostas cardiovasculares complexas a tais testes. Contudo, ele aparenta constância e estabilidade e assim, esta pode ser uma boa preparação para protocolos mais longos e duradouros. Para tal uso, ele precisa ser testado garantindo que ele seja capaz de manter o funcionamento dos sistemas fisiológicos em nível estável ao longo do tempo.

Os testes autonômicos propostos visam à estimulação de proprioceptores cardiovasculares com potencial de iniciar modulações complexas que envolve o trabalho cardíaco e de múltiplos segmentos vasculares, como barorreflexo, receptores de baixa pressão, receptores de perfusão cefálica (Cushing) e/ou quimiorreceptores (Lillywhite e Gallagher, 1985; Leite et al., 2007, Belão et al., 2015; Armelin et al., 2014, 2019; Troiano et al., 2018). Esses mecanismos tem o potencial de desencadear uma série de ajustes na frequência cardíaca, alterações no volume sistólico, força de contração, e consequentemente do débito cardíaco; pressão arterial, complacência, condutância periférica, modulação do retorno venoso e também, ajustes de desvio sanguíneo (Rocha et al., 2021). Parte destes, apesar de terem sido relatados anteriormente, nunca foram propriamente descritos em répteis. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o modelo de cascavel descerebrada é capaz de manter os ajustes autonômicos cardiovasculares complexos ao longo tempo após a descerebração.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais experimentais

As cascavéis Sul Americanas, *Crotalus durissus*, (n = 8, massa = 852,0 ± 43,41g, média ± EPM) utilizadas foram doadas pelo Instituto Butantan e mantidas no Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar, até o momento dos experimentos. Os animais foram mantidos em caixas individuais em sala com temperatura controlada, 28°C e fotoperíodo 12:12, com água *ad libitum*, e alimentados com roedores a cada 15 dias. A alimentação foi interrompida 15 dias antes de cada experimento e o projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA- UFSCar).

2.2 Cirurgias de descerebração e instrumentação

O procedimento de descerebração realizado foi previamente descrito por Rocha e colaboradores (2021). Para procedimentos cirúrgicos, os animais foram inicialmente sedados com aumento de PCO_2 (Wang et al., 1993; Leite et al., 2013, 2014) até perda de seu controle motor, permitindo manuseio seguro e intubação endotraqueal para ventilação mecânica com 3-5% do anestésico inalável isoflurano. Sob anestesia, uma pequena abertura medial (~ 2-3 mm) foi feita no crânio. A artéria subjacente e qualquer eventual vaso colateral foram cuidadosamente cauterizados e as meninges suavemente puncionadas e abertas. Todo tecido nervoso compreendendo o teto óptico e suas estruturas rostrais foram cauterizados e removidas. As estruturas neurais do cerebelo, tronco encefálico e porção posterior do hipotálamo permaneceram intactas. A incisão na cabeça foi posteriormente suturada. Ao fim do procedimento as preparações receberam tratamento profilático com injeção intraperitoneal de antibiótico (Enrofloxacin 11 $mg \cdot kg^{-1}$) e anti-inflamatório (Flunixin meglumina 1,1 $mg \cdot kg^{-1}$). A descerebração, como procedimento irreversível que proporciona um estado irrecuperável, foi considerada o momento da eutanásia (Silverman et al., 2005; Rocha et al., 2021; Castro et al., 2021). Todas as diretrizes éticas para a instrumentação animal continuaram sendo respeitadas enquanto a preparação estava em uso.

Após 15 dias de recuperação (tempo previamente determinado por protocolos anteriores), realizou-se a segunda cirurgia para implantação de cânulas e sondas de fluxo que nos permitiu registrar os parâmetros cardiovasculares de interesse. Durante o segundo procedimento cirúrgico, para minimizar a exposição à possíveis efeitos causados pelo anestésico sobre o sistema nervoso autônomo (SNA), a anestesia inalatória foi reduzida (5-1%) e associada à bloqueio neuromuscular (Brometo de pancurônio - 0,5 $mg \cdot kg^{-1}$).

Após a anestesia, foi realizada incisão ventrolateral (~ 4,5 cm) do lado direito, rostral ao coração, para expor a vasculatura central. Canulações oclusivas da artéria vertebral (cânula de polietileno, PE50) e de um ramo da artéria pulmonar (PE20) proporcionaram acesso ao arco aórtico direito e à artéria pulmonar, respectivamente, e permitiram assim, o registro da pressão arterial pulmonar média (PAMPul) e sistêmica (PAMsis). Os cateteres foram preenchidos com solução salina (0,9%) heparinizada (50 UI/ml). Além disso, sondas de fluxo perivascular foram fixadas no arco aórtico esquerdo e artéria pulmonar, para registro do fluxo sanguíneo do arco aórtico esquerdo e do circuito pulmonar, respectivamente (\dot{Q}_{Lao} e \dot{Q}_{pul} , 1,5PR - 1,5PR, Transonic Systems). As sondas foram envolvidas com gel de ultrassom para permitir e estabilizar a transmissão do sinal e fixadas

na borda da incisão ventrolateral para estabilidade da posição. Ao final do procedimento, cânulas e sondas foram externalizadas (através da incisão) e fixadas com sutura no dorso da preparação. Após a instrumentação, cada preparação foi posicionada em decúbito ventral e a anestesia foi retirada. As preparações receberam anestésico local (lidocaína 2%) nos pontos de incisão, além tratamento profilático com injeção intraperitoneal de antibiótico (Enrofloxacin 11 mg·kg⁻¹) e anti-inflamatório (Flunixin meglumina 1,1 mg·kg⁻¹).

2.3 Protocolo experimental

Os registros das variáveis cardiovasculares começaram 24 horas após a cirurgia de instrumentação. Para isso, os cateteres foram conectados à transdutores de pressão (Baxter Edward PX600) e acoplados à pré-amplificadores de sinal (Bridge Amp, ADInstruments). Os transdutores de pressão foram calibrados contra uma coluna de mercúrio. As sondas de fluxo foram conectadas à um medidor de fluxo sanguíneo de canal duplo para transdução e amplificação (Transonic Systems). Todos os sinais foram continuamente (1k·seg⁻¹) processados em um conversor analógico-digital e registrados (software Powerlab/LabChart®, ADInstruments). Para evitar que movimentos eventuais alterassem os registros e/ou posicionamento de sondas, as preparações receberam injeção intravascular de bloqueador de placa motora (Brometo de pancurônio - 0,5 mg·kg⁻¹) e permaneciam na ventilação mecânica (3-5 respirações × min⁻¹). A dose de pancurônio não alterou os parâmetros cardiovasculares aferidos.

Manobras de posicionamento foram utilizados para gerar os desafios ao sistema cardiovascular. Estes se basearam em alterações hemodinâmicas decorrentes de variações posturais dentro do escopo fisiológico da espécie. As manobras envolveram levantamento da porção rostral do corpo (da cabeça até a porção anterior ao coração - *Head Lift*, HL), e a porção posterior do corpo (da cauda até o ponto médio do comprimento corpóreo - *Tail Lift*, TL). A manobra HL causa impacto na perfusão da porção rostral do corpo do animal, notoriamente na perfusão cefálica e foi realizada levantando a cabeça juntamente com primeiro terço do corpo, anterior a posição do coração, 15-20 cm da posição horizontal. Esta posição foi mantida por 3 minutos. Após isto, o animal retornava à posição inicial. A estabilização dos parâmetros foi seguida pela segunda manobra. O TL provoca aumento imediato no retorno venoso. A porção final do corpo foi levantada 20-30 cm da posição

horizontal por 3 minutos, com retorno a posição inicial de repouso até estabilização dos parâmetros.

As manobras foram seguidas pelo estímulo químico aos quimiorreceptores de O₂. Para tal, utilizamos injeção de cianeto de sódio (NaCN), substância utilizada de forma recorrente para estimular quimiorreceptores periféricos sensíveis ao O₂ em diversos grupos de vertebrados (Ishii e Kusakabe, 1985; Leite et al., 2007; Taylor et al., 2010; Belão et al., 2015). As injeções foram aplicadas através da cânula da artéria vertebral em três concentrações (10, 50 e 100 µg·kg⁻¹) diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). Uma injeção de solução salina foi utilizada como controle. Foi aguardado que todos parâmetros retornassem à linha de base antes de cada nova dose. Os registros das variáveis ocorreram continuamente ao longo de todo protocolo. Após 24 horas, o protocolo experimental foi repetido com os animais anestesiados com isoflurano. Após o término de todos os protocolos experimentais, as preparações receberam injeções intravenosas de Tiopental (100 ml·kg⁻¹ - Pearson, Brasil) seguido de solução hiper saturada de KCl.

2.4 Análise de dados e estatística

Para os cálculos das pressões arteriais médias sistêmica e pulmonar ($PAM = 1/3 P_{sistólica} + 2/3 P_{diastólica} \cdot f_H$) foi utilizado o sinal derivado de PAM_{sis} e PAM_{pul}. O fluxo sanguíneo sistêmico (\dot{Q}_{sis}) foi calculado a partir do registro de \dot{Q}_{Lao} usando os fatores de correção $\dot{Q}_{sis} = 2,6 \cdot \dot{Q}_{Lao}$ (Filogonio et al., 2014) e $\dot{Q}_{sis} = 3,3 \cdot \dot{Q}_{sis}$ (Galli et al., 2005) para cascavéis em repouso e anestesiadas, respectivamente. O débito cardíaco (DC) foi calculado como a soma de \dot{Q}_{sis} e \dot{Q}_{pul} . O volume sistólico total (pulmonar + sistêmico) foi calculado como $\dot{Q}_{sis} \cdot f_H^{-1}$ (Crossley et al., 1998; Galli et al., 2005). As condutâncias vasculares sistêmica e pulmonar foram calculadas como $G = \dot{Q} \cdot P^{-1}$ (Lautt, 1989; O'Leary, 1991). A direção do desvio foi indicada pela razão: $\dot{Q}_{pul} \cdot \dot{Q}_{sis}^{-1}$ (Hicks e Comeau, 1994). Esse índice indica desvio D-E quando os valores de razão são <1 e desvio E-D quando os valores são > 1 (Hicks et al., 1996).

Para a análise estatística foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em relação ao desafio ortostático, analisamos 5 pontos ao longo do tempo, período de repouso, HL/TL on (início da manobra), resposta secundária, HL/TL off (retorno à posição

horizontal) e recuperação (2 minutos após o fim da manobra). Para avaliar as alterações cardiovasculares causadas pelas manobras e pelo cianeto, assim como possíveis interferências da anestesia, foi utilizado a ANOVA Two-Way seguida do teste Sidak ($P < 0,05$; $n = 8$; GraphPad Prism 7.0).

3. Resultados

3.1 Redução da perfusão cefálica

Ao início de HL, as preparações não anestesiadas apresentaram duas respostas ao longo dos 3 minutos (Figuras 1 e 2). A resposta primária aconteceu imediatamente após mudança de posição sendo observada entre os primeiros 10 a 20 segundos. Ao longo do tempo, em torno de 70 a 100 segundos, observamos uma resposta secundária, compensatória e mais proeminente do que a resposta inicial. A f_H ($37,08 \pm 3,04$ bpm) foi a mais afetada pela manobra com queda ($33,73 \pm 3,28$ bpm) seguida de aumento ($39,44 \pm 3,12$ bpm). Ao final da manobra houve nova redução de f_H ($36,61 \pm 3,57$ bpm). A PAMsis ($4,96 \pm 0,37$ kPa) se elevou como resposta secundária ($5,71 \pm 0,43$ kPa), o oposto do que ocorreu com o \dot{Q}_{sis} ($17,94 \pm 3,54$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) e Gsis ($3,91 \pm 0,89$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹) que diminuíram nessa mesma resposta secundária ($15,21 \pm 2,78$ ml·min⁻¹·kg⁻¹ e $2,74 \pm 0,50$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹, respectivamente). PAMPul ($2,61 \pm 0,30$ kPa) também apresentou maior elevação na resposta secundária ($2,95 \pm 0,38$ kPa), o oposto de Gpul ($9,16 \pm 1,89$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹) que diminuiu nesse mesmo momento ($6,59 \pm 1,10$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹), o que não foi acompanhada pelo \dot{Q}_{pul} que não se alterou ao longo da manobra. DC ($40,49 \pm 4,92$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) se elevou na resposta secundária ($50,1 \pm 6,33$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) em relação ao início da manobra (HL on $33,2 \pm 4,77$ ml·min⁻¹·kg⁻¹), mas nenhum dos momentos foram diferentes do repouso. Vstot e a taxa de desvio também não sofreram alteração durante a manobra.

Nas preparações anestesiadas, a maioria dos parâmetros não sofreu alteração. \dot{Q}_{sis} ($22,58 \pm 8,00$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) se elevou no início de HL ($29,23 \pm 8,92$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) e caiu na resposta secundária ($20,24 \pm 6,37$ ml·min⁻¹·kg⁻¹). Padrão semelhante foi observado em Gsis ($4,33 \pm 0,95$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹), DC ($42,92 \pm 9,92$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) e Vstot ($1,18 \pm 0,24$ ml·kg⁻¹). As principais diferenças neste parâmetros ocorreram entre seus valores no início ($6,35 \pm 1,49$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹; $49,98 \pm 10,59$ ml·min⁻¹·kg⁻¹; $1,39 \pm 0,24$ ml·kg⁻¹) e final

da manobra ($3,35 \pm 0,77 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$; $35,31 \pm 7,29 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$; $0,99 \pm 0,17 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$). As variáveis f_H , Gsis, Gpul, DC e V_{tot} responderam de forma diferente entre preparações não anestesiadas e anestesiadas (Figuras 1 e 2).

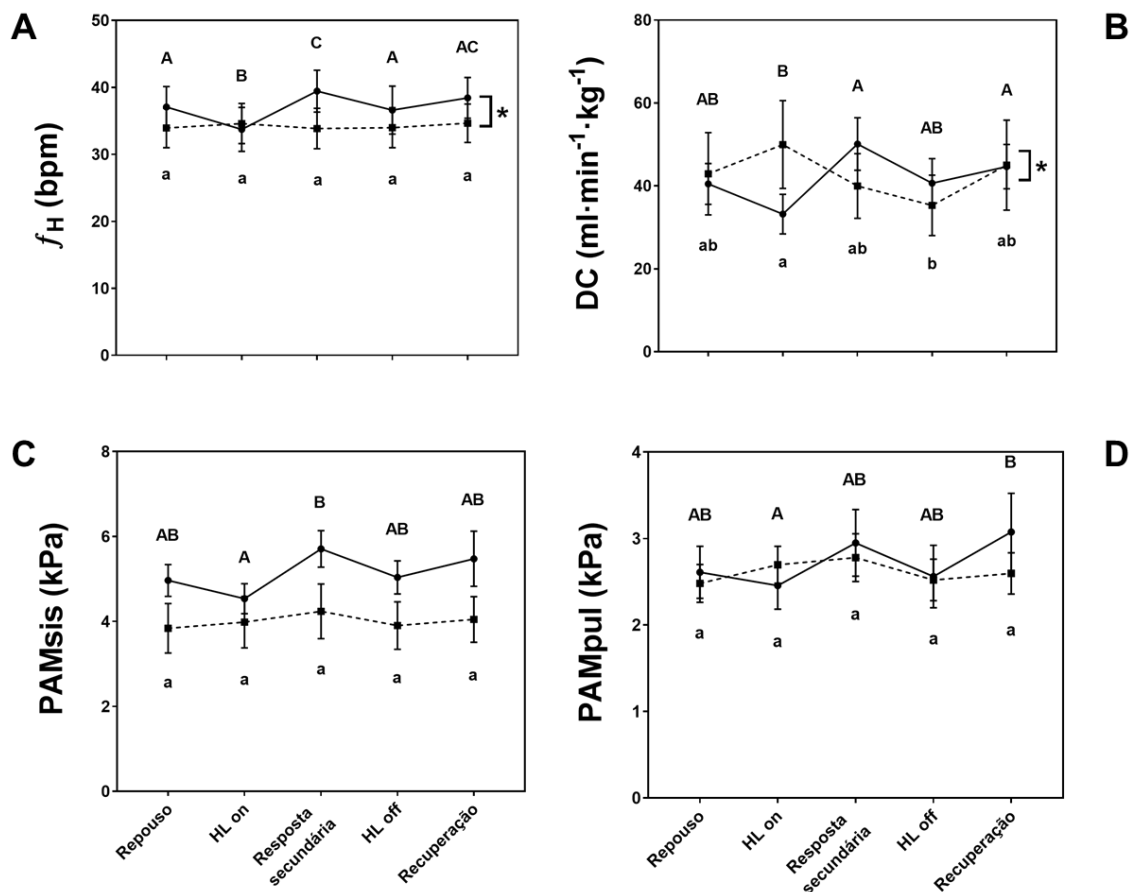


Figura 1. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra *Head Lift*. A) f_H – frequência cardíaca; B) DC – débito cardíaco; C) PAMsis – pressão arterial média sistêmica; D) PAMPul – pressão arterial média pulmonar. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n = 8$).

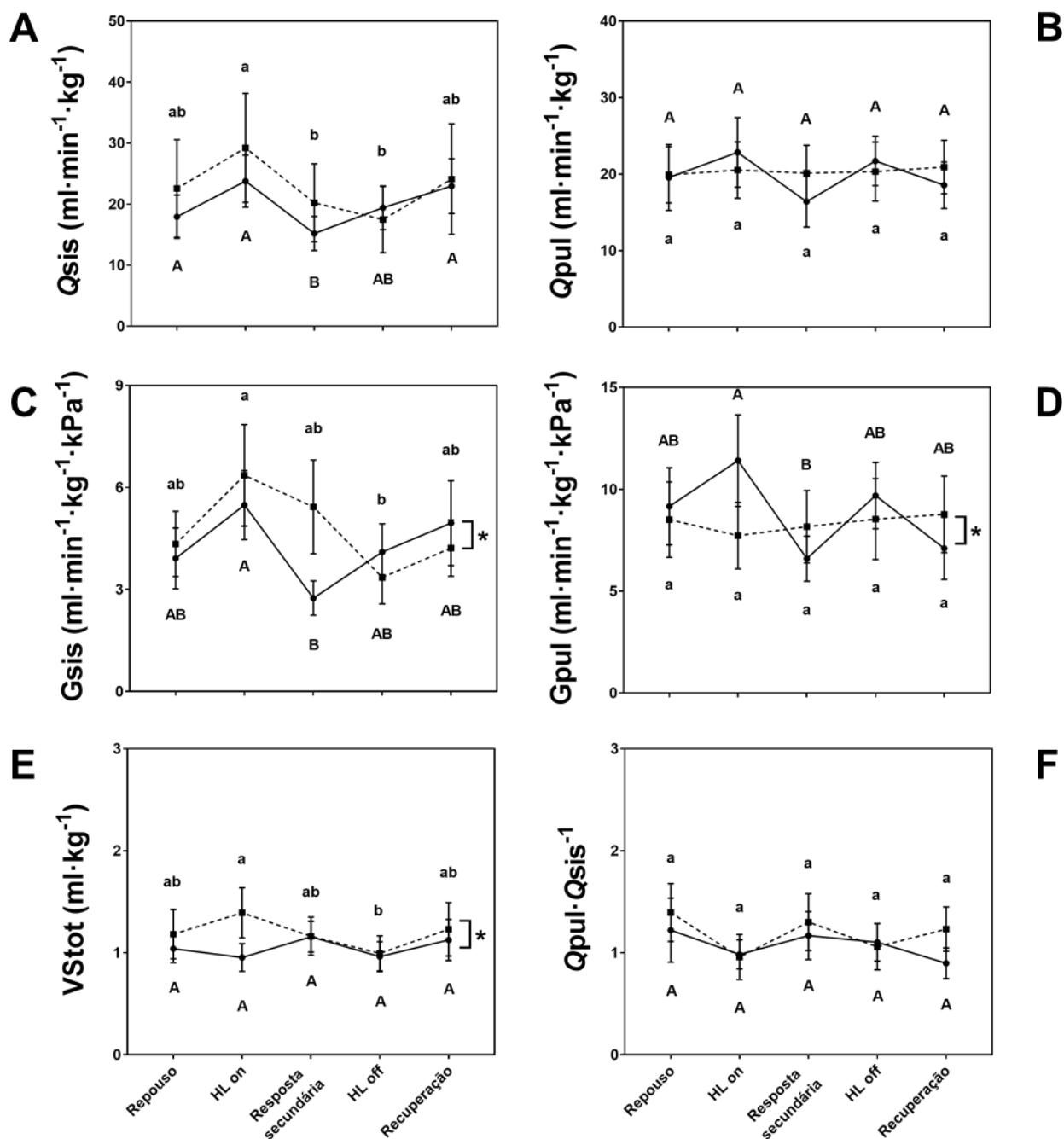


Figura 2. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra *Head Lift*. A) \dot{Q}_{sis} – fluxo sanguíneo sistêmico; B) \dot{Q}_{pul} – fluxo sanguíneo pulmonar; C) G_{sis} – condutância sistêmica; D) G_{pul} – condutância pulmonar; E) V_{stot} – volume sistólico total e F) $\dot{Q}_{\text{pul}} \cdot \dot{Q}_{\text{sis}}^{-1}$ – taxa de desvio sanguíneo. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).

3.2 Aumento de retorno venoso

Ao início de TL, houve uma resposta imediata (primeiros 10 segundos) e posteriormente, uma resposta secundária (por volta dos 70 segundos). A resposta mais pronunciada foi observada no início da manobra (Figuras 3 e 4). Nas preparações não anestesiadas, a f_H ($35,7 \pm 1,79$ bpm) se mostrou menos alterada neste desafio com queda somente no início de TL ($32,35 \pm 2,45$ bpm). PAMsis ($5,10 \pm 0,32$ kPa) e \dot{Q} sis ($18,62 \pm 2,59$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) apresentaram padrão de respostas opostas com elevação da pressão e diminuição do fluxo em TL ($5,51 \pm 0,35$ kPa; $13,36 \pm 2,35$ ml·min⁻¹·kg⁻¹, respectivamente). PAMPul ($2,41 \pm 0,31$ kPa) assim como a sistêmica, aumentou no início da manobra ($2,65 \pm 0,32$ kPa) acompanhado do \dot{Q} pul ($18,72 \pm 4,18$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) que apresentou a mesmo padrão de resposta ($25,42 \pm 4,94$ ml·min⁻¹·kg⁻¹). As condutâncias, Gsis ($4,72 \pm 0,67$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹) e Gpul ($7,28 \pm 1,50$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹), apresentaram respostas opostas com diminuição ($2,82 \pm 0,49$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹) e aumento ($11,08 \pm 2,19$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹), respectivamente, no início da manobra. DC ($37,28 \pm 4,75$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) diminuiu na resposta secundária ($35,29 \pm 5,02$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) em relação à inicial ($41,08 \pm 5,44$ ml·min⁻¹·kg⁻¹). Vstot ($1,05 \pm 0,12$ ml·kg⁻¹) e taxa de desvio ($1,02 \pm 0,26$) apresentaram aumento no momento inicial de resposta ($1,26 \pm 0,15$ ml·kg⁻¹; $1,79 \pm 0,49$).

As preparações anestesiadas igualmente ao HL, apresentaram menor variação de respostas. A principal alteração foi na PAMsis ($4,08 \pm 0,49$ kPa) que apresentou maior diferença com aumento no início de TL ($4,48 \pm 0,54$ kPa) e queda ao final da manobra ($3,91 \pm 0,19$ kPa). Esse perfil de resposta também foi observado em PAMPul ($2,81 \pm 0,24$ kPa, no início; e $2,50 \pm 0,20$ kPa, ao final) e \dot{Q} pul ($23,37 \pm 3,47$ ml·min⁻¹·kg⁻¹, no início; e $18,43 \pm 3,36$ ml·min⁻¹·kg⁻¹, ao final). O desvio foi maior no início ($1,71 \pm 0,28$) que no fim da manobra ($1,21 \pm 0,26$). As variáveis f_H , PAMsis, \dot{Q} pul, Gpul, DC e Vstot diferem entre preparações não anestesiadas e anestesiadas (Figuras 3 e 4).

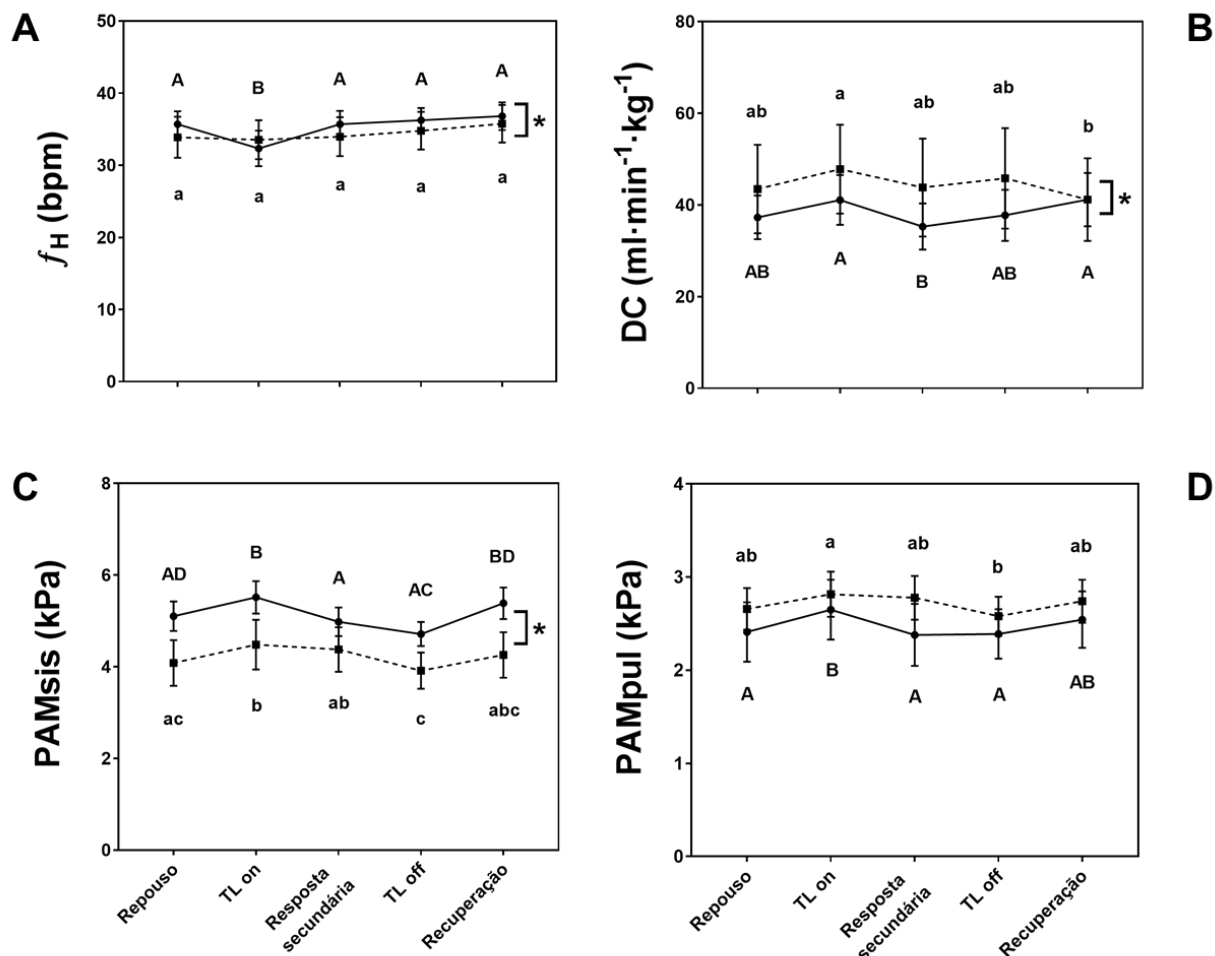


Figura 3. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra *Tail Lift*. A) f_H – frequência cardíaca; B) DC – débito cardíaco; C) PAMsis – pressão arterial média sistêmica; D) PAMPul – pressão arterial média pulmonar. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n = 8$).

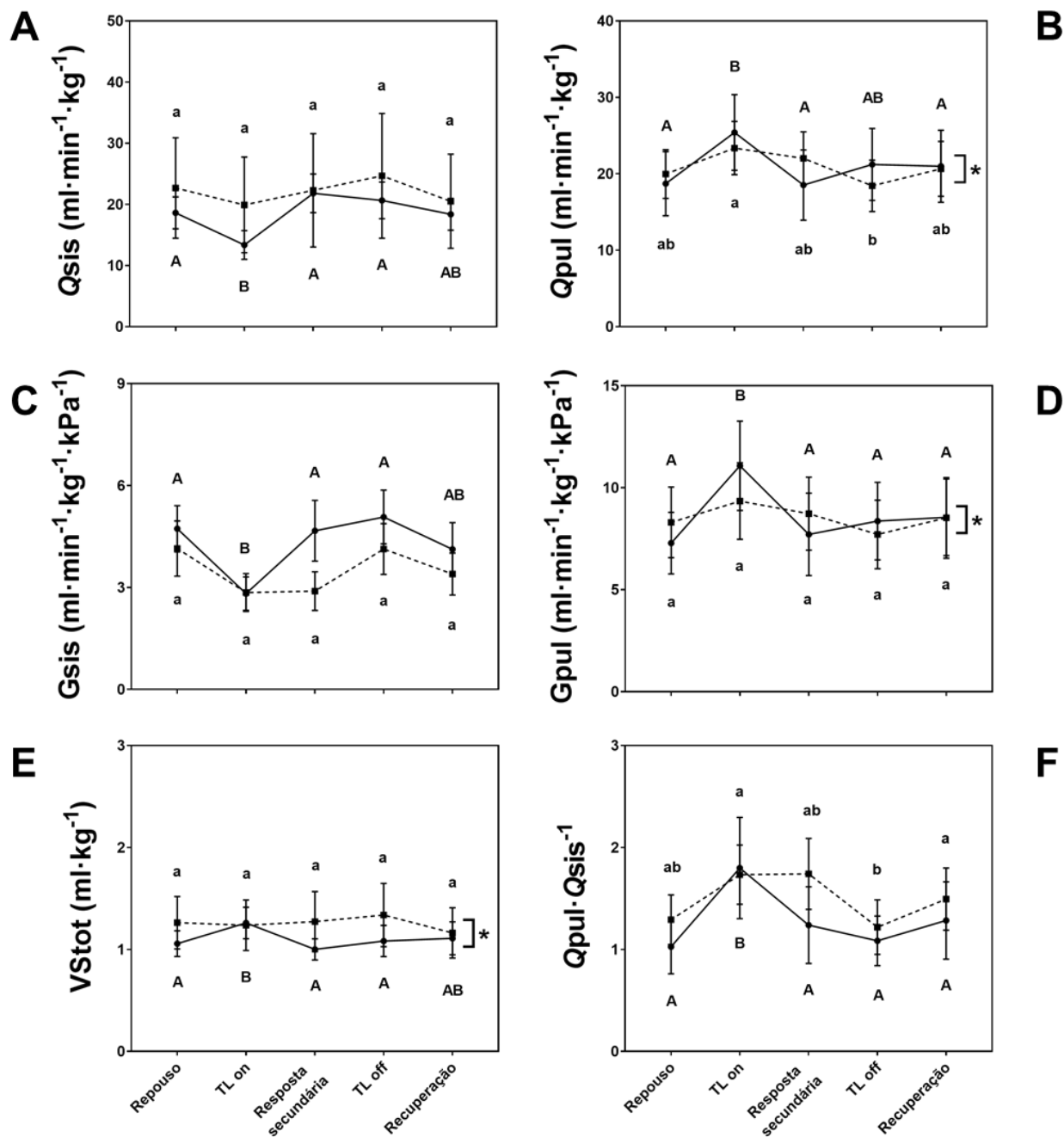


Figura 4. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano na manobra Tail Lift. A) \dot{Q}_{sis} – fluxo sanguíneo sistêmico; B) \dot{Q}_{pul} – fluxo sanguíneo pulmonar; C) G_{sis} – condutância sistêmica; D) G_{pul} – condutância pulmonar; E) V_{stot} – volume sistólico total e F) $\dot{Q}_{pul} \cdot \dot{Q}_{sis}^{-1}$ – taxa de desvio sanguíneo. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n = 8$).

3.3 Estímulos de quimiorreceptores

O efeito do NaCN observado nos parâmetros cardiovasculares está representado abaixo nas figuras 5 e 6.

Nas preparações não anestesiadas, a f_H e os parâmetros relacionados à perfusão do circuito sistêmico, PAMsis, \dot{Q}_{sis} e Gsis, não apresentaram alterações em relação ao repouso (Figuras 5 e 6). Houve alterações no circuito pulmonar com alterações em PAMpul ($2,50 \pm 0,29$ kPa), \dot{Q}_{pul} ($18,45 \pm 3,77$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) e Gpul ($8,05 \pm 1,24$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹), que aumentaram após as injeções de $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($3,10 \pm 0,27$ kPa; $36,17 \pm 5,52$ ml·min⁻¹·kg⁻¹; $12,71 \pm 1,67$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹, respectivamente) e $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($3,15 \pm 0,28$ kPa; $36,95 \pm 4,74$ ml·min⁻¹·kg⁻¹; $12,71 \pm 1,41$ ml·min⁻¹·kg⁻¹·kPa⁻¹, respectivamente) assim como DC (salina, $36,61 \pm 3,91$ ml·min⁻¹·kg⁻¹; $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $55,4 \pm 4,62$ ml·min⁻¹·kg⁻¹; $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $57,69 \pm 5,06$ ml·min⁻¹·kg⁻¹) e taxa de desvio (salina, $1,09 \pm 0,23$; $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2,63 \pm 0,95$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2,97 \pm 0,96$). Vstot ($1,01 \pm 0,11$ ml·kg⁻¹) aumentou somente após a administração do maior estímulo ($1,61 \pm 0,25$ ml·kg⁻¹).

A anestesia praticamente aboliu as respostas. Houve alteração de PAMpul ($2,24 \pm 0,19$ kPa), que aumentou nas concentrações de 50 ($2,55 \pm 0,24$ kPa) e $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($2,72 \pm 0,34$ kPa). O perfil de resposta de PAMpul, \dot{Q}_{pul} , Gpul, DC, Vstot e desvio sanguíneo diferiram entre preparações não anestesiadas e anestesiadas (Figuras 5 e 6).

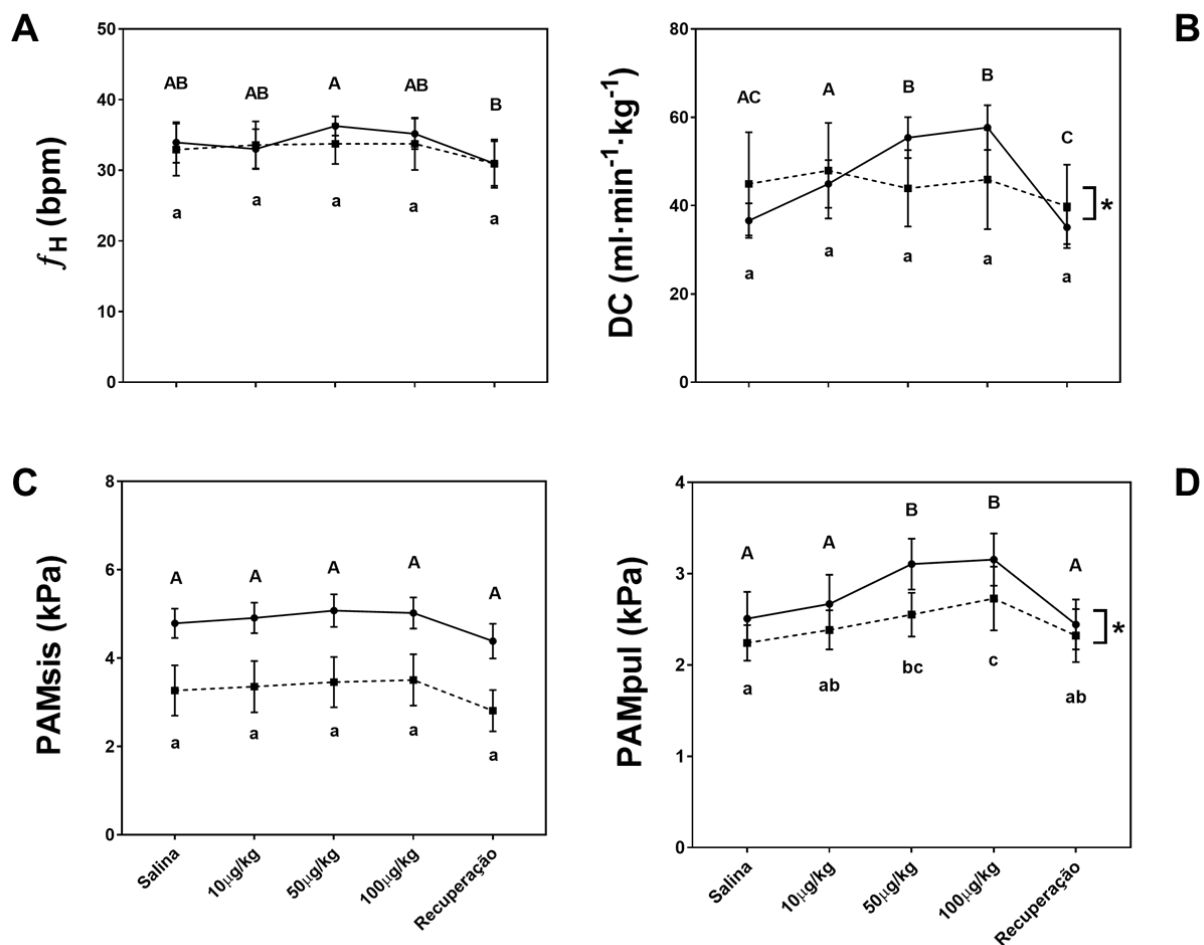


Figura 5. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano perante desafio de quimiorrecepção ao NaCN. A) f_H – frequência cardíaca; B) DC – débito cardíaco; C) PAMsis – pressão arterial média sistêmica; D) PAMpul – pressão arterial média pulmonar. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n = 8$).

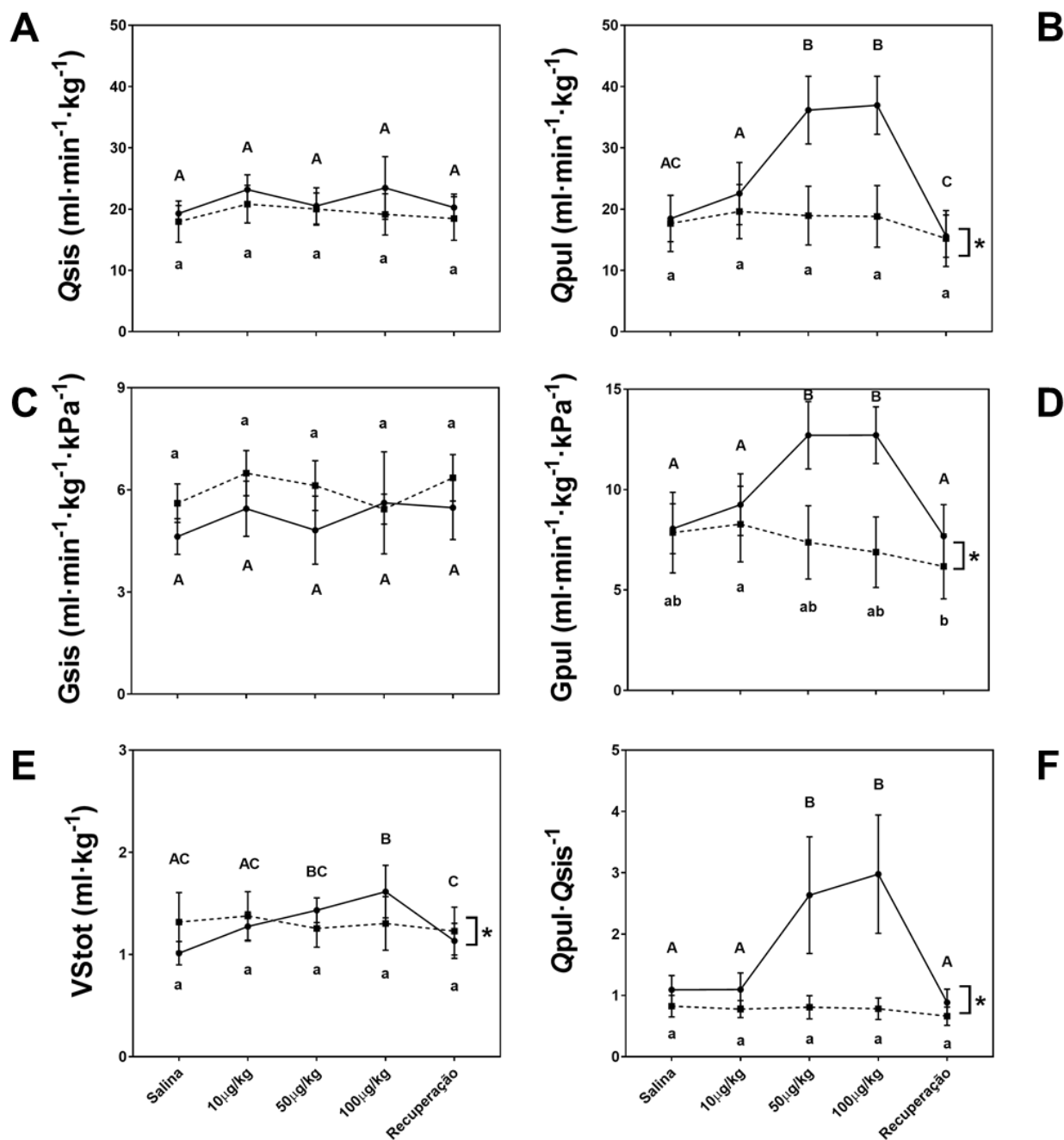


Figura 6. Variáveis cardiovasculares de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*) descerebrada com e sem presença de anestésico isoflurano perante desafio de quimiorrecepção ao NaCN. A) \dot{Q}_{sis} – fluxo sanguíneo sistêmico; B) \dot{Q}_{pul} – fluxo sanguíneo pulmonar; C) G_{sis} – condutância sistêmica; D) G_{pul} – condutância pulmonar; E) V_{stot} – volume sistólico total e F) $\dot{Q}_{pul} \cdot \dot{Q}_{sis}$ – taxa de desvio sanguíneo. Linha contínua e letras maiúsculas – preparação descerebrada sem anestesia. Linha pontilhada e letras minúsculas – preparação descerebrada sob anestesia. Letras diferentes denotam diferença estatística. Asterisco denotam diferença entre preparações com e sem anestesia (Two-Way ANOVA/Sidak, $p < 0,05$, $n=8$).

4. Discussão

O sistema nervoso autônomo é responsável por modular os parâmetros cardiovasculares para dar suporte as atividades e funções do organismo. Centros especializados que atuam captando possíveis alterações, como barorreceptores ou receptores de baixa pressão, trabalham para detectar alterações hemodinâmicas. Na natureza, os animais se deparam com diversas situações que exigem regulações autonômicas instantâneas para manter a homeostasia e adequação do suporte cardiovascular. Testes de alterações posturais de elevação da cabeça e da cauda realizadas no presente trabalho, utilizam a alteração hemodinâmica decorrente a ação da gravidade sobre o sangue para respectivamente, reduzir o fluxo sanguíneo para cabeça e órgãos rostrais ou facilitando o retorno venoso (Lillywhite et al., 1996; Armelin et al., 2019; Rocha et al., 2021).

No presente trabalho observamos que o modelo foi capaz de responder às manobras e realizar ajustes cardiovasculares para reestabelecimento das pressões arteriais, bem como modulação vasculares e alteração do desvio sanguíneo. Tanto em HL como em TL, foi possível observar respostas primárias e secundárias em diversos parâmetros. O último desafio utilizou o NaCN para estimular quimiorreceptores de O₂, mimetizando uma condição de hipoxemia (Leite et al., 2007; Belão et al., 2015). A manobra resultou em aumento do desvio sanguíneo para circuito pulmonar com magnitude dose-dependente. A anestesia causou atenuação das respostas e inalteração de parâmetros validando a natureza autonômica dos ajustes cardiovasculares observados. As respostas observadas foram obtidas com animais descerebrados por 15 dias, indicando persistência dos processos modulatórios e validando esta preparação para estudo de longa duração.

Redução da perfusão cefálica

A alteração da posição com o levantamento da cabeça, apesar de parecer um movimento simples, incorre na necessidade de ajustes compensatórios muito importantes. Esta posição tende a diminuir a perfusão tecidual nas áreas acima da linha do coração e afetam diretamente a oxigenação do encéfalo. Em casos artificiais, com verticalização corpórea total, a postura pode ocasionar queda imediata no débito cardíaco e pressão arterial em um fenômeno chamado de hipotensão ortostática (Lillywhite, 1996; Armelin et al., 2014). Contudo, este é um caso extremo, no qual há aumento do gradiente de pressão

hidrostática nas partes inferiores do corpo e conseqüentemente, aumento no volume de sangue nessas áreas e diminuição do retorno venoso (Lillywhite, 1987).

Em nosso experimento não há redução de retorno venoso, mas limitação de perfusão rostral. No caso, pudemos observar ajuste para promover maior perfusão sistêmica na resposta inicial ao HL (nas preparações não anestesiadas), com aumento relativo (à segunda fase da resposta) de DC, G_{sys} e Q_{sys} , mesmo contra redução relativa da f_H . Vanloon e colaboradores (1993) afirmam que a isquemia cerebral é fator desencadeante de ativação simpática e produção de catecolaminas, fator relacionado com o reflexo de Cushing (Paton et al., 2009; Schmidt et al., 2018). Esses fatores podem ter contribuído com a resposta para priorização da perfusão sistêmica (Altimiras et al, 1997; Taylor et al., 2014).

A queda nos valores da f_H logo no início da manobra é oposta ao encontrado em testes ortostáticos, no qual há alteração do retorno venoso, conforme relatado para pítón, jiboia e iguana (Armelin et al., 2014, 2019; Troiano et al., 2018). Indicamos que a elevação secundária da f_H com elevação de PAM, que junta à redução de G_{sis} e G_{pul} provê condições para desvio de fluxo sanguíneo para a região cefálica. Tal ajuste indicaria diversos aspectos relevantes. Ele estaria relacionado a um forte e ativo reflexo de Cushing e, primeiro, indicaria sua existência em répteis. Tal reflexo nunca foi descrito neste grupo. Além disto, os proprioceptores relevantes para tal reflexo teriam que estar localizados nas áreas remanescentes do SNC do animal descerebrado. Por fim, com base nos resultados, indicamos que os ajustes vasculares seriam fundamentais para tal ajuste de fluxo sanguíneo para a região cefálica. HL não afetou o fluxo pulmonar. Sua estabilização, a despeito do aumento relativo da perfusão sistêmica, indica participação compensatória do shunt neste ajuste. E assim como esperado, ao final da manobra todos os parâmetros retornaram a níveis semelhantes ao repouso.

A anestesia abole a resposta da maioria dos parâmetros cardiovasculares analisados. Anestésicos inalatórios como isoflurano, enflurano e halotano alteram a distensibilidade de vasos, com aumento da complacência vascular e vasodilatação (Akata et al., 1995; Hettrick et al., 1996; Ioannou et al., 2013). Os parâmetros de f_H , DC, V_{stot} e as condutâncias sistêmica e pulmonar foram afetados pela presença da anestesia quando comparados às preparações não anestesiadas, o que indica que o controle da resistência vascular periférica e retorno venoso podem ser mais afetados sob efeito de anestesia.

Aumento do retorno venoso

Diferentes atividades que geram aumento do metabolismo, tais como atividade física e/ou digestão, geram respostas rápidas em parâmetros cardiovasculares que garantem um aporte maior de sangue e, conseqüentemente, de O_2 para os tecidos em maior atividade. O excedente de sangue para tais manobras é retirado da seção venosa, onde está a maior parte do volume vascular (Secor e White, 2010; Bovo et al., 2015; Leite et al., 2013, 2014; Enok et al., 2016; Wang et al., 2019). TL aumenta o retorno venoso e com maior enchimento cardíaco, há maior volume de ejeção sistólica, débito cardíaco resultando em elevação na pressão arterial. Mesmo sem modulação, o coração é capaz de gerar mais força contrátil através de Frank-Starling. Além disso, o alongamento do tecido atrial e nodal sinoatrial e miocárdio, provocando aumento de despolarização do marcapasso cardíaco elevando a frequência cardíaca (Guyton et al., 1955; Gelman, 2008; Berlin e Bakker, 2014; Joyce e Wang, 2020). Estes ajustes fazem com que um eventual aumento de retorno venoso seja imediatamente bombeado para a seção arterial, por aumento no DC. No presente trabalho, observamos imediato aumento de PAMsis, PAMPul e Vstot após elevação da cauda. Em resposta à elevação da PAMsis, houve diminuição da f_H , provavelmente por resposta barorreflexa.

O aumento do bombeamento cardíaco foi primariamente desviado para o circuito pulmonar, com menor resistência, aumentando \dot{Q}_{pul} e o desvio E-D. As respostas vasculares compuseram o ajuste secundário com redução de Gsis. Contudo, nosso protocolo não permite diferenciar reduções de Gsys modulada autonomicamente de reduções decorrentes do efeito da gravidade por estarmos artificialmente elevando a porção caudal da preparação. Achados semelhantes foram observados em estudos prévios com atividade induzida em répteis (Hicks e Krosniunas, 1996; Frappel et al., 2002; Krosniunas e Hicks, 2003; Filogonio, et al., 2016). A condutância sistêmica é alterada pelo tônus vascular periférico e este é regulado pelo sistema nervoso autônomo e sinalizadores locais (Joyce e Wang, 2020). Acreditamos que tais fatores contribuam para a resposta secundária da f_H que volta a se elevar e retorna para seu valor de repouso e assim permanece até o fim da manobra. Assim como em HL, ao final da manobra de TL os parâmetros cardiovasculares retornaram aos valores iniciais de repouso.

As preparações anestesiadas não apresentaram as mesmas regulações perante a manobra do TL. Na maioria dos parâmetros as alterações causadas pelo início do TL se

mantiveram assim até o término do desafio que pode ter sido originadas somente pelo acúmulo de sangue em consequência da inclinação. A PAMsis foi a mais afetada nas preparações anestesiadas indicando que a alteração no bombeamento é composta de efeitos locais e que os ajustes observados na preparação sem anestesia possuem componentes autonômicos.

Estímulos de quimiorreceptores

Os quimiorreceptores de O₂ periféricos são compostos pelas células Glomus que atuam detectando alteração na pressão parcial de O₂ no sangue. Em mamíferos, eles estão localizados nas artérias carótida comum e aorta. Em répteis estariam localizadas ao redor da carótida e algumas de suas ramificações (Marshall, 1994; Milson e Burleson, 2007; Taylor et al., 2010). O NaCN tem sido utilizado como agente ativador de quimiorreceptores de O₂ em diversos vertebrados (Franchini e Krieger, 1993; Leite et al., 2007, Nůsková et al., 2010; Belão et al., 2015; Reichert et al., 2015). Marshall (1994) relata que as respostas ao cianeto podem ser difíceis de compreender. Estudos com diversos mamíferos (cães, gatos, coelhos, focas, macacos e humanos) demonstram que existem dois padrões de respostas, uma bradicardia inicial seguida de taquicardia. Contudo, essas respostas podem variar de acordo com a concentração do NaCN, local de injeção ou ainda com a utilização de ventilação artificial. Apesar de possuir interpretação confusa, em muitos casos, seu efeito na estimulação de quimiorreceptores é claro.

Em nossas preparações, a estimulação pelo NaCN não causou efeitos na perfusão sistêmica e G_{sis} e \dot{Q} _{sis} forma mantidas inalteradas. Por outro lado, houve efeito acentuado no DC e perfusão do circuito pulmonar, após as injeções de 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Este resultado indica ajuste cardiovascular fino ao direcionar fluxo, preferencialmente, à captação de O₂. O aumento na G_{pul} com consequente elevação no fluxo pulmonar e aumento no desvio sanguíneo E-D podem ter contribuído para aumento na PAMP_{pul} também observada nessas concentrações. Resultados semelhantes ao aumento do \dot{Q} _{pul} e desvio D-E em resposta à hipóxia foram reportados e discutido por outros autores (Burggren, 1977, 2020; West et al., 1992; Wang e Hicks, 1996). É interessante que tenha havido alterações importantes no circuito pulmonar enquanto o sistêmico permaneceu estável. Isto indica uma regulação de desvio sanguíneo para aumento em resposta a desoxigenação sanguínea. Apesar da relação entre aumento metabólico e desvio sanguíneo ter sido demonstrado diversas vezes, ajustes

de desvio em resposta a quimiorreceptores de O₂ nunca haviam sido demonstrados. Além disto, este ajuste reforça a presença de uma modulação ativa para o desvio sanguíneo e o possível papel da artéria pulmonar neste processo. A possibilidade de os padrões de desvio serem resultados secundários de ajustes de resistência periférica nos circuitos sistêmico e pulmonar perde relevância.

As preparações anestesiadas apresentaram aumento na PAMPul. Sem a alteração de outros parâmetros, a elevação da pressão pulmonar em si não parece indicar modulação direcional com relevância fisiológica. Assim, mais uma vez, a presença de anestésico impediu a realização de ajustes cardiovasculares perante a manobra.

5. Considerações finais

A utilização de animais anestesiados na pesquisa é bastante recorrente e se faz necessário em casos que haja necessidade de registros simultâneos de diferentes parâmetros. Contudo, muitos estudos indicam que o uso de anestésicos pode alterar, atenuar ou mesmo, abolir a modulação de parâmetros cardiovasculares (Rooney et al., 1999; Lee et al., 2002, Lee et al., 2004, Galli et al., 2005). A preparação descerebrada permite cirurgias de instrumentação profundas com implante de diferentes instrumentos e, conseqüentemente, o registro de diversas variáveis ao mesmo tempo, sem a necessidade da utilização de anestésicos durante os protocolos, uma vez que a preparação já está eutanasiada.

Os protocolos adotados no presente trabalho forneceram respostas satisfatórias na defesa do uso da preparação descerebrada em biologia experimental. As variáveis cardiovasculares desencadearam respostas imediatas frente a HL e TL, mostrando capacidade de ajuste e resolução rápida do sistema nervoso autônomo, visto que as respostas primárias para os dois desafios foram de aproximadamente 10 segundos. As respostas vasculares sistêmica e pulmonar embora sofram bastante alteração no início dos desafios utilizados, apresentaram capacidade de adaptação e ajuste para, juntamente com as PAMsis e PAMPul, devolver o equilíbrio para os fluxos sanguíneos, DC e Vstot. Estudos aprofundados sobre a participação vascular podem nos fornecer informações detalhadas sobre a participação desse ramo nos ajustes hemodinâmicos.

6. Referências

- Akata, T., Nakashima, M., Kodama, K., Boyle, W.A., Takahashi, S.** Effects of volatile anesthetics on acetylcholine-induced relaxation in the rabbit mesenteric resistance artery *Anesthesiology*, 82, 188-204 (1995).
- Altimiras, J., Aissaoui, A., Tort, L. and Axelsson, M.** Cholinergic and Adrenergic Tones in the Control of Heart Rate in Teleosts. How Should They be Calculated? *Comparative Biochemistry Physiology*, 118, 131–139 (1997).
- Armelin, V.A., Braga, V.H.S., Abe, A.S., Rantin, F.T. and Florindo, L.H.** Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake *Python molurus*. *J Comp Physiol B* 184, 903–912 (2014).
- Armelin, V.A., Braga, V.H.S., Guagnoni, I.N., Crestani, A.M., Abe, A.S. and Florindo, L.H.** Autonomic control of cardiovascular adjustments associated with orthostasis in the scansorial snake *Boa constrictor*. *J Exp Biol.*, 222 (2019).
- Belão, T.C., Zeraik, V.M., Florindo, L.H., Kalinin, A.L., Leite, C.A.C. and Rantin, F.T.** Control of cardiorespiratory function in response to hypoxia in an air-breathing fish, the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.*, 187, 130-140 (2015).
- Berlin, D.A. and Bakker, J.** Understanding venous return. *Intensive Care Med*, 40, 1564–1566 (2014).
- Blake, D.W. and Korner, P.I.** Effects of ketamine and Althesin anesthesia on baroreceptor – heart rate reflex and hemodynamics of intact and pontine rabbits. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 5, 145-154 (1982).
- Bovo, R.P., Fuga, A., Micheli-Campbell, M.A., Carvalho, J.E. and Andrade, D.V.** Blood oxygen affinity increases during digestion in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 186, 75–82 (2015).
- Burggren, W.** The Pulmonary Circulation of the Chelonian Reptile: Morphology, Haemodynamics and Pharmacology. *J Comp. Physiol.*, 116, 303-323 (1977).
- Burggren, W., Filogonio, R. and Wang, T.** Cardiovascular shunting in vertebrates: a practical integration of competing hypotheses. *Biol. Rev.* 95, 449–471 (2020).
- Burleson, M.L. and Silva, P.E.** Cross Tolerance to Environmental Stressors: Effects of Hypoxic Acclimation on Cardiovascular Responses of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) to a Thermal Challenge. *Therm Biol.*, 36, 250–254 (2011).
- Castro, S.A., Taylor, E.W., Tavares, D., Filogonio, R., Rodrigues, G.J. and Leite, C.A.C.** The role of nitric oxide on the cardiovascular system of South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) *Physiological and Biochemical Zoology* (2021).
- Clarke, R. and Harris, J.** The spatial organization of central sensitization of hind limb flexor reflexes in the decerebrated, spinalized rabbit. *European journal of pain*, 5, 175-185 (2001).
- Crossley, D., Altimiras, J. and Wang, T.** Hypoxia elicits an increase in pulmonary vasculature resistance in anaesthetised turtles (*Trachemys scripta*). *Journal of experimental biology* 201, 3367-3375 (1998).
- Enok, S., Leite, G.S.P.C., Leite, C.A.C., Gesser, H., Hedrick, M.S. and Wang, T.** Improved cardiac filling facilitates the postprandial elevation of stroke volume in *Python regius*. *J Exp Biol*, 219, 3009–3018 (2016).
- Filogonio, R., Wang, T., Taylor, E.W., Abe, A.S. and 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*, 186, 1059–1066 (2016).
- Franchini, K.G. and Krieger, E.M.** Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 42, 63-70 (1993).

- Frappell, P.B., Schultz, T. and Christian, K.** Oxygen transfer during aerobic exercise in a varanid lizard *Varanus mertensi* is limited by the circulation. *J Exp Biol*, 205, 2725–2736 (2002).
- Galli, G.L.J., Skovgaard, N., Abe, A.S., Taylor, E.W., Conlon, J.M. and Wang, T.** Cardiovascular actions of rattlesnake bradykinin ([Val(1), Thr(6)] bradykinin) in the anesthetized South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Am J Physiol-Reg I*, 288, 456–465 (2005).
- Gargaglioni, L.H., Meier, J.Y., Branco, L.G.S. and Milsom, W.K.** Role of midbrain in the control of breathing in anuran amphibians. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, 447–457 (2007).
- Gelman, S.** Venous Function and Central Venous Pressure. *Anesthesiology*, 108, 735–748 (2008).
- Ghali, G.Z. and Ghali, M.G.Z.** Effects of isoflurane on hemodynamic variables and phrenic nerve discharge in the supracollicularly decerebrate rat. *International Journal of Neuroscience*, 131, 489–503 (2021).
- Graham, M.L. and Prescott, M.J.** The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *European Journal of Pharmacology*, 759, 19–29 (2015).
- Guyenet, P.G.** The sympathetic control of blood Pressure. *Nature reviews Neuroscience*, 7, 335–346 (2006).
- Guyton, A.C., Lindsey, A.W. and Kaufmann, B.N.** Effect of Mean Circulatory Filling Pressure and Other Peripheral Circulatory Factors on Cardiac Output. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 180, 463–468 (1955).
- Hedrick, M.S., Palioca, W.B. and Hillman, S.S.** Effects of Temperature and Physical Activity on Blood Flow Shunts and Intracardiac Mixing in the Toad *Bufo marinus*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72, 509–519 (1999).
- Hettrick, D.A., Pagel, P.S. and Warltier, D.C.** soflurane and Halothane Produce Similar Alterations in Aortic Distensibility and Characteristic Aortic Impedance. *Anesth Analg*, 83, 1166–1172 (1996).
- Hicks, J.W. and Krosniunas, E.** Physiological states and intracardiac shunting in non-crocodilian reptiles. *Exp Biol Online*, 1, 35–57 (1996).
- Hicks, J.W., Ishimatsu, A., Molloy, S., Erskin, A. and Heisler, N.** The mechanism of cardiac shunting in reptiles: A new synthesis. *The Journal of Experimental Biology*, 199, 1435–1446 (1996).
- Ioannou, C.V., Stergiopoulos, N., Georgakarakos, E., Chatzimichali, E., Katsamouris, A.N. and Morel, D.R.** Effects of Isoflurane Anesthesia on Aortic Compliance and Systemic Hemodynamics in Compliant and Noncompliant Aortas. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 27, 1282–1288 (2013).
- Joyce, W. and Wang, T.** What determines systemic blood flow in vertebrates? *Journal of Experimental Biology* 223, (2020).
- Kaufmann, H., Norcliffe-Kaufmann, L. and Palma, J.A.** Baroreflex Dysfunction. *N Engl J Med*, 382, 163–178 (2020).
- Keen, A.N., Shiels, H.A. and Crossley, D.A.** Cardiovascular function, compliance, and connective tissue remodeling in the turtle, *Trachemys scripta*, following thermal acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 311, 133–143 (2016).
- Krosniunas, E.H. and Hicks, J.W.** Cardiac output and shunt during voluntary activity at different temperatures in the turtle, *Trachemys scripta*. *Physiol Biochem Zool*, 76, 679–694 (2003).
- Lautt, W.W.** Resistance or conductance for expression of arterial vascular tone. *Microvasc. Res.*, 37, 230–236 (1989).

- Lee, K., Nam, S.B., Lee, Y.L., Han, D.H., Cho, N.R. and Lee, J.S.** Effect of enflurane on the baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Yonsei Med J.*, 45, 492-500 (2004).
- Leite, C.A.C., Florindo, L.H., Kalinin, A.L., Milsom, W.K. and Rantin, F.T.** Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *J Comp Physiol A*, 193, 1001-1011 (2007).
- Leite, C.A.C., Taylor, E.W., Wang, T., Abe, A.S. and de 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*, 216, 1881–1889 (2013).
- Leite, C.A.C., Wang, T., Taylor, E. W., Abe, A.S., Leite, G.S.P.C. and de Andrade, D.O.V.** Loss of the ability to control right-to-left shunt does not influence the metabolic responses to temperature change or long-term fasting in the South American Rattlesnake *Crotalus durissus*. *Physiol Biochem Zool*, 87, 568–575 (2014).
- Lillywhite, H.B.** Circulatory Adaptations of Snakes to Gravity. *Amer Zool.*, 27, 81-95 (1987).
- Lillywhite, H.B and Gallagher, K.P.** Hemodynamic Adjustments to Head-Up Posture in the Partly Arboreal Snake, *Elaphe obsoleta*. *The Journal of Experimental Zoology*, 235, 325-334 (1985).
- Lillywhite, H.B., Ballard, R.E. and Hargens, R.** Cardiovascular responses of semi-arboreal snakes to chronic, intermittent hypergravity. *J Comp Physiol B*, 166, 241-253 (1996).
- Marshall, J.M.** Peripheral Chemoreceptors and Cardiovascular Regulation. *Physiological Reviews*, 74, 543-594 (1994).
- Milsoma, W.K. and Bursleson, M.L.** Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 157, 4–11 (2007).
- Munns, S.L., Hartzler, L.K., Bennett, A.F. and Hicks, J.W.** Elevated intra-abdominal pressure limits venous return during exercise in *Varanus exanthematicus*. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 4111-4120 (2004).
- Nielsen, A.M., Bisgard, G.E. and Mitchell, G.S.** Phrenic nerve response to hypoxia and CO₂ in decerebrate dogs. *Respiration Physiology*, 65, 267-283 (1986).
- Nůsková, H., Vrbacký, M., Drahota, Z. and Houšťek, J.** Cyanide inhibition and pyruvate-induced recovery of cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr*, 42, 395–403 (2010).
- O’Leary, D.S.** Regional vascular resistance vs. conductance: which index for baroreflex responses? *Am. J. Physiol.*, 260, 632-637 (1991).
- Paton, J.F.R., Dickinson, C.J. and Mitchell, G.** Harvey Cushing and the regulation of blood pressure in giraffe, rat and man: introducing ‘Cushing’s mechanism. *Exp Physiol*, 94, 11–17 (2009).
- Reichert, M.N., Brink, D.L. and Milsom, W.L.** Evidence for a carotid body homolog in the lizard *Tupinambis merianae*. *The Journal of Experimental Biology*, 218, 228-237 (2015).
- Reid, S., Sundin, L., Florindo, L., Rantin, F. and Milsom, W.** Effects of afferent input on the breathing pattern continuum in the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Respiratory Physiology & Neurobiology* 136, 39–53 (2003).
- Rocha, G.C., Castro, S.A., Taylor, E.W., Tavares, D. and Leite, C.A.C.** A decerebrate preparation of the rattlesnake, *Crotalus durissus* provides as an experimental model for study of autonomic modulation of the cardiovascular system in reptiles. *Physiol and Biochem Zool.*, 94, 269–285 (2021).

- Rooney, B., Levine, G., Gaynor, J., Macdonald, E. and Wimsatt, J.** Sevoflurane Anesthesia in Desert Tortoises (*Gopherus agassizii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 30, 64-69 (1999).
- Sarrafizadeh, R., Keifer, J. and Houk, J.C.** Somatosensory and movement-related properties of red nucleus: a single unit study in the turtle. *Exp Brain Res*, 108, 1-17 (1996).
- Schmidt, E.A., Despas, F., Traon, A.P., Czosnyka, Z., Pickard, J.D., Rahmouni, K., Pathak, A. and Senard, J.M.** Intracranial Pressure Is a Determinant of Sympathetic Activity. *Front. Physiol.*, 9 (2018).
- Secor, S.M., Hicks, J.W. and Bennett, A.F.** Ventilatory and cardiovascular responses of a python (*Python molurus*) to exercise and digestion. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 2447–2454 (2000).
- Secor, S.M. and White, S.E.** Prioritizing blood flow: cardiovascular performance in response to the competing demands of locomotion and digestion for the Burmese python, *Python molurus*. *The Journal of Experimental Biology*, 213, 78-88 (2010).
- Silverman, J., Garnett, N.L., Giszter, S.F., Heckman, C.J., Kulpa-Eddy, J.A., Lemay, M.A., Perry, C.K. and Pinter, M.** Decerebrate Mammalian Preparations: Unalleviated or Fully Alleviated Pain? Contemporary topics in laboratory animal science. *American Association for Laboratory Animal Science*, 44, 34-6 (2005).
- Smith, S.A., Mitchell, J.H. and Garry, M.G.** Electrically induced static exercise elicits a pressor response in the decerebrate rat. *Journal of Physiology*, 537, 961–970 (2001).
- Takeda, R., Remmers, J.E., Baker, J.P., Madden, K.P. and Farber, J.P.** Postsynaptic potentials of bulbar respiratory on the turtle. *Respiration Physiology*, 64, 149-160 (1986).
- Taylor, E.W., Jordan D. and Coote J.H.** Central Control of the Cardiovascular and Respiratory Systems and Their Interactions in Vertebrates. *Physiological reviews*, 79, (1999).
- Taylor, E.W., Leite, C.A.C., McKenzie, D.J. and Wang, T.** Control of respiration in fish, amphibians and reptiles. *Braz J Med Biol Res*, 43, 409-424 (2010).
- Taylor, E.W., Leite, C.A.C., Sartori, M.R., Wang, T., Abe, A.S. and Crossley II, D.A.** The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. *The Journal of Experimental Biology*, 217, 690-703 (2014).
- Tenney, S.M. and Ou, L.C.** Ventilatory response of decorticate and decerebrate cats to hypoxia and CO₂ *Respiration Physiology*, 29, 81-92 (1977).
- Tonkovic-Capin, M., Krolo, M., Stuth, E.A.E., Hopp, F.A. and Zuperku, E.J.** Improved method of canine decerebration. *J. Appl. Physiol*, 851, 747-750 (1998).
- Troiano, N.M., Armelin, V.A., Braga, V.H.S., Abe, A.S., Rantin, F.T. and Florindo, L.H.** The autonomic control of upright posture tachycardia in the arboreal lizard *Iguana iguana*. *J Exp Zool.*, 329, 130– 139 (2018).
- Tsuchimochi, H., McCord, J.L., Hayes, S.G., Koba, S. and Kaufman, M.P.** Chronic femoral artery occlusion augments exercise pressor reflex in decerebrated rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299, 106-13 (2010).
- van Loon, J., Shivalkar, B., Plets, C., Govhn, J., Tjandra-Maga, T.B. and Flameng, A.W.** Catecholamine response to a gradual increase of intracranial Pressure. *J Neurosurg*, 79, 705-709 (1993).
- Wang, T., Fernandes, W. and Abe, A.S.** Blood pH and O₂ homeostasis upon CO₂ anesthesia in the rattlesnake (*Crotalus durissus*). *Snake*, 25, 777–784 (1993).
- Wang, T., and Hicks, J.W.** The interaction of pulmonary ventilation and the right-left shunt on arterial oxygen levels. *The Journal of Experimental Biology*, 199, 2121–2129 (1996).

- Wang, T., Taylor, E.W., Reid, S.G. and Milsom, W.K.** Lung deflation stimulates fictive ventilation in decerebrated and unidirectionally ventilated toads. *Respiration Physiology*, 118, 181–191 (1999).
- Wang, T., Taylor, E.W., Andrade, D. and Abe, A.S.** Autonomic control of heart rate during forced activity and digestion in the snake *Boa constrictor*. *The Journal of Experimental Biology*, 204, 3553–3560 (2001).
- Wang, T., Altimiras, J., Klein, W. and Axelsson, M.** Ventricular haemodynamics in *Python molurus*: separation of pulmonary and systemic pressures. *The Journal of Experimental Biology*, 206, 4241–4245 (2003).
- Wang, T., Joyce, W. and Hicks, J.W.** Similitude in the cardiorespiratory responses to exercise across vertebrates. *Current Opinion in Physiology*, 10, 137–145 (2019).
- West, N.H., Butler, P.J. and Bevan, R.M.** Pulmonary Blood Flow at Rest and during Swimming in the Green Turtle, *Chelonia mydas*. *Physiological Zoology*, 65, 287–310, (1992).
- Whelan, P.J.** Control of locomotion on the decerebrate cat. *Progress in Neurobiology* V, 49, 481–515 (1996).
- Williams, C.J.A., Hansen, K., Williams, N., Jakobsen, S.R., Pedersen, C.C.E., Bertelsen, M.F. and Wang, T.** The influence of assisted ventilation and recumbency on cardiorespiratory physiology in the anesthetized freshwater turtle *Trachemys scripta scripta*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 260 (2021).
- Woods, J.W.** Behaviour of chronic decerebrate rats. *J Neurophysiol*, 27, 635–44 (1964).
- Yu, J., Ogawa, K., Tokinaga, Y., Iwahashi, S. and Hatano, Y.** The vascular relaxing effects of sevoflurane and isoflurane are more important in hypertensive than in normotensive rats. *Can J Anesth*, 51, 979–985 (2004).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral desta tese foi investigar um potencial modelo animal para uso em pesquisas mecanísticas acerca da modulação cardiovascular. Os resultados obtidos nos permitem concluir que o modelo mantém as modulações do sistema cardiovascular sendo capaz de ajustes complexos, rápidos e direcionados. O controle do SNA sobre a Variabilidade da Frequência Cardíaca e o barorreflexo ocorre a partir de informações aferentes, e por meio de uma complexa interação de estímulos, respostas das vias simpática e parassimpática são formuladas e modificam a f_H e pressão arterial média, adaptando-as às necessidades de cada momento. As preparações descerebradas apresentaram mudanças nos padrões da VFC e barorreflexo ao longo dos dias subsequentes à cirurgia, com aumento progressivo nos parâmetros representativos, o PSD e Ganho barorreflexo, com perfil de recuperação a valores semelhantes aos animais intactos. Alta VFC e G_{op} são sinais de boa recuperação e funcionalidade, caracterizando uma preparação com mecanismos autonômicos eficientes e representativos de um animal intacto.

Os resultados de desafio hemodinâmicos foram igualmente satisfatórios. As manobras de head e tail lift desencadearam ajustes cardiovasculares dinâmicos e complexos para manutenção cardiovascular. Assim também aconteceu com a estimulação dos quimiorreceptores periféricos através do NaCN, cujas preparações responderam para modular o fluxo sanguíneo para o circuito pulmonar. A capacidade de modular o desvio intracardíaco para sua participação rápida em ajustes hemodinâmicos nunca havia sido relatada. Observamos ainda, que as preparações submetidas ao anestésico isoflurano tiveram as respostas cardiovasculares limitadas ou abolidas, indicando a necessidade de cautela na interpretação de dados gerados em animais anestesiados.

Por fim, concluímos que o modelo é apto para utilização em pesquisas dos mecanismos fisiológicos e tem potencial para estudos futuros que necessitem de longa duração, como estudos de fármacos, hormônios, desidratação, modulações metabólicas, estimulação de nervos, etc. Entre as vantagens que a preparação pode fornecer listamos a suspensão do uso de anestesia, a possibilidade de multi-instrumentação, permitindo a coleta de diversos parâmetros ao mesmo tempo e, conseqüentemente, o uso de menor número de animais.