

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP**

**Efeito da temperatura sobre as interações cardiotorrespiratórias em sapos
*Rhinella schneideri***

Lucas Aparecido Zena

Araraquara, SP, 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP**

**Efeito da temperatura sobre as interações cardiotorrespiratórias em sapos
*Rhinella schneideri***

Lucas Aparecido Zena
Orientadora: Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, associação ampla entre a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Araraquara, SP, 2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Z54e Zena, Lucas Aparecido
Efeito da temperatura sobre as interações
cardiorrespiratórias em sapos *Rhinella schneideri* /
Lucas Aparecido Zena. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
93 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Barorreceptores. 2. Quimiorreceptores. 3.
Ventilação pulmonar. 4. Hiperóxia. 5. Bloqueio
autônomo. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Lucas Aparecido Zena, realizada em 26/10/2016:

Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego
UNESP

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco
USP

Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho
UNIFESP

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

AGRADECIMENTOS

A minha família, por me ensinar os valores e a disciplina necessária para enfrentar os desafios que a vida pessoal e profissional nos reserva.

À professora Dra. Kênia Bicego pela paciência e confiança em meu trabalho, por me dar a oportunidade e a liberdade para explorar caminhos desafiadores da ciência.

À professora Dra. Lynn Hartzler pela paciência e dedicação ao longo do processo aprendizagem que tive durante o intercâmbio nos EUA.

À professora Dra. Luciane Gargaglioni, pela colaboração diária durante a minha formação nestes anos.

Aos professores doutores, Carlos Crestani, Patrícia Maria de Paula e Dane Crossley por participarem ativamente da minha formação ao longo do doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP, pela oportunidade.

À UNESP de Jaboticabal, pela estrutura proporcionada e pela minha formação como profissional.

Ao Fernando, que sempre esteve presente com toda a sua alegria para me ajudar nos desafios encontrados ao longo do doutorado.

A todos os colegas de laboratório, pela ajuda, convivência, aprendizado, paciência e boas risadas: Carol, Camila, Vivian, Débora, Lara, Giulliana, Caroline, Gabriela, Jolene, Kassia, Mariane, Luis Gustavo, Danuzia, Elisa, Lays, Leonardo, Carlos, Victor e Jaime.

Ao Euclides, Gabriela, Renata e Raquel, pelo auxílio diário no laboratório e cuidado com os animais.

Aos companheiros do laboratório da Profa. Dra. Lynn Hartzler, Joe e Lauren pelos bons momentos e ensinamentos durante o intercâmbio.

Aos amigos Brent, Sue e Daniella pelo companheirismo e bons momentos compartilhados durante meu intercâmbio.

Aos amigos, Eliane, Alessandra, Rafael, Felipe, Drão, Miriam, Gilda, Marco, Marcelo, Marcos, Leandro, Ednilson, Érica, Angélica, Natália, Ruither, Marquinhos, Paulinho, Sandrinha, Bruno e Giovanni.

Aos amigos que proporcionaram momentos de alegria e fizeram a caminhada durante o doutorado sempre mais divertida, Carol, Letícia, Giulliana e Breno. Obrigado pelas reuniões semanais de terapia e comilança.

À FAPESP (#2012/17379-0), ao CNPq e Capes (Ciência sem Fronteiras, CNPq-SWE # 209933/2013-5) pelo apoio financeiro concedido durante o doutorado.

E a Deus, por me conduzir até aqui.

RESUMO

Para um adequado suprimento sanguíneo de modo a atender as diferentes demandas metabólicas, os vertebrados regulam a pressão arterial (PA) mantendo adequada perfusão dos órgãos evitando assim eventos isquêmicos ou outros danos teciduais, como edema. O controle efetivo da PA a curto prazo em anfíbios anuros se dá por ajustes da frequência cardíaca (FC), resistência vascular periférica e também por ajustes da frequência de pulsação dos corações linfáticos. Além disso, a ventilação pulmonar nos anuros está diretamente associada à homeostase do volume sanguíneo por meio da facilitação do transporte de fluido linfático de volta ao sistema cardiovascular, que se dá por meio da alteração de pressão e volume dos sacos linfáticos. Isso parece sugerir a existência de uma possível interação entre a regulação barorreflexa e o controle da respiração nos anfíbios anuros, como já observado para os mamíferos. No presente estudo utilizamos de um método farmacológico (fenilefrina e nitroprussiato de sódio: infusão em rampa e injeção *in bolus*) para investigar a sensibilidade barorreflexa em diferentes temperaturas no sapo cururu *Rhinella schneideri*. Também avaliamos o papel do barorreflexo arterial na modulação da ventilação pulmonar nesta mesma espécie. A regulação barorreflexa no sapo *R. schneideri* apresentou dependência térmica, além de afetar consideravelmente a ventilação dos sapos. A hipotensão e hipertensão resultaram em aumentos e reduções da FC, respectivamente, bem como na ventilação pulmonar, que se deu prioritariamente por meio de ajustes na frequência respiratória. Ao contrário dos dados da literatura, os anfíbios anuros parecem defender prioritariamente eventos de hipotensão ao invés da hipertensão, independente da temperatura testada. É importante salientar que os anuros apresentam alta taxa de filtração transcápicular, e que durante eventos de PA elevada, um aumento na formação de fluido transcápicular pulmonar seria recrutado por um eficiente sistema linfático, característico dos anuros. Portanto, apesar da função da ventilação pulmonar em corresponder à disponibilidade de O₂ em diferentes demandas metabólicas (*e.g.* temperatura), também parece apresentar participação na regulação da PA, possivelmente devido a uma interação entre o barorreflexo e as áreas respiratórias no sistema nervoso central.

Palavras-chave: barorreceptores; quimiorreceptores; ventilação pulmonar; hiperóxia; bloqueio autonômico; anfíbios anuros; temperatura

ABSTRACT

For adequate blood supply to match metabolic demand, vertebrates regulate blood pressure (BP) in order to maintain adequate perfusion of target organs avoiding ischemia and tissue damage like edema. Effective short-term BP regulation in anuran amphibians occurs through adjustments in heart rate (HR), peripheral vascular resistance, and changing pulsatile frequency of lymph hearts. In addition, pulmonary ventilation in anurans is directly linked to blood volume homeostasis by facilitating lymph fluid movement back into the cardiovascular system which takes place by changing pressure and volume within anurans' lymphatic sacs. It is apparent that an interaction between baroreflex regulation and breathing control exists in anuran amphibians. In the present study I used pharmacological methods (phenylephrine and sodium nitroprusside; infusion ramp and *in bolus* methods) to investigate baroreflex sensitivity at different temperatures in the cururu toad *Rhinella schneideri*. I evaluated the degree to which arterial baroreflex plays a role in pulmonary ventilation in the cururu toad. Baroreflex regulation in the toad *R. schneideri* was temperature dependent and influenced the toad's ventilation. Hypotension and hypertension resulted in increases and decreases in HR, respectively, as well as increases and decreases in pulmonary ventilation mainly through adjustments in breathing frequency. In contrast to data from the literature, anuran amphibians seem to defend lower BP events primarily rather than hypertension independent of temperature. Anurans exhibit higher rates of transcapillary fluid filtration which means during hypertension fluid filtration is increased and excess interstitial fluid formation will be reclaimed by an efficient lymphatic system. Therefore, besides pulmonary ventilation's role in matching O₂ delivery to demand (e.g. temperatures) in anurans, it also plays a role in BP regulation possibly owing to an interaction between baroreflex control and respiratory areas in the brain.

Keywords: baroreceptors; chemoreceptors; pulmonary ventilation; hyperoxia; full autonomic blockade; anuran amphibians; temperature

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FC	frequência cardíaca
FE	fenilefrina
FR	frequência respiratória
Ganho ₅₀	ganho máximo
Ganho ₅₀ normalizado	ganho máximo normalizado
NPS	nitroprussiato de sódio
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial media
PAM ₅₀	pressão arterial no ponto médio
PAP	pressão arterial pulsátil
Q ₁₀	efeito da temperatura
SNC	sistema nervoso central
T _b :	temperatura corporal
V _T	volume corrente
\dot{V}_E	ventilação total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1	Controle da pressão arterial pelos barorreceptores.....	9
1.2	Controle da pressão arterial: barorreflexo nos anfíbios	12
1.3	Controle da pressão arterial: efeito da temperatura sobre o barorreflexo em vertebrados..	14
1.4	Controle da pressão arterial: hipotensão versus hipertensão	16
	Capítulo I.....	23
	Efeito da temperatura sobre o controle barorreflexo da frequência cardíaca no sapo cururu, <i>Rhinella schneideri</i>	23
	RESUMO	24
	ABSTRACT	25
	LISTA DE ABREVIACÕES	26
1	INTRODUÇÃO	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1	Animais.....	29
2.2	Procedimentos Cirúrgicos.....	29
2.3	Fármacos.....	30
2.4	Medidas da pressão arterial (PA).....	30
2.5	Avaliação do barorreflexo	30
2.6	Protocolos experimentais	31
2.7	Análise do barorreflexo.....	31
2.8	Análise dos dados e estatística	32
3	RESULTADOS	33
3.1	Efeito da temperatura sobre os parâmetros cardiovasculares	35
3.2	Efeito da temperatura sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela fenilefrina (FE) ..	35
3.3	Efeito da temperatura sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo nitroprussiato de sódio (NPS)	36
3.4	Controle do barorreflexo da FC: Efeitos da temperatura	37
3.5	Efeito do bloqueio autonômico total sobre as respostas barorreflexas à FE e ao NPS	40
4	DISCUSSÃO	42
4.1	Crítica ao método.....	42
4.2	Efeito da temperatura sobre a atividade barorreflexa no sapo <i>R. schneideri</i>	43
	Capítulo II	49
	A regulação barorreflexa afeta a ventilação no sapo cururu, <i>Rhinella schneideri</i>	49

RESUMO	50
ABSTRACT	51
LISTA DE ABREVIACOES	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 <i>Animais</i>	55
2.2 <i>Procedimentos cirúrgicos</i>	55
2.3 <i>Fármacos</i>	56
2.4 <i>Medidas da pressão arterial (PA) e da ventilação (VE)</i>	56
2.5 <i>Protocolo experimental</i>	57
2.6 <i>Análise do barorreflexo</i>	58
2.7 <i>Análise dos dados e estatística</i>	59
3 RESULTADOS	61
3.1 <i>Efeito da temperatura sobre as influências da pressão arterial (PA) nas variáveis cardiorrespiratórias</i>	62
3.2 <i>Efeito da temperatura sobre as relações entre pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e ventilação (VE)</i>	65
3.3 <i>Efeitos do bloqueio colinérgico e adrenérgico nos parâmetros cardiorrespiratórios</i>	71
3.4 <i>Efeitos da hipotensão induzida pelo nitroprussiato de sódio sobre a ventilação em condições de normóxia e hiperóxia</i>	72
4 DISCUSSÃO.....	73
4.1 <i>Homeostase da pressão arterial (PA) em anfíbios anuros</i>	73
4.2 <i>Efeitos da temperatura nas respostas reflexas cardiorrespiratórias</i>	76
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
Apêndices	89
Apêndice A.....	90
Apêndice B	91
Apêndice C	92
Apêndice D.....	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Controle da pressão arterial pelos barorreceptores

Os vertebrados apresentam capacidade de regulação da pressão arterial sistêmica (PA) de forma a manter adequada perfusão tecidual, satisfazendo a liberação de oxigênio e nutrientes de acordo com a demanda metabólica. A manutenção da PA sem grandes oscilações é importante também para evitar lesões ou edemas devido a aumentada pressão capilar (HAGENSEN, et al., 2010; VAN VLIET, et al., 1994). Assim, a regulação da PA é mediada por mecanismos neurais, cujas respostas de curto (minutos) prazo incluem em geral as alterações rápidas da frequência cardíaca (FC) e de resistência vascular periférica; e os mecanismos classificados como de longo prazo (horas a dias ou semanas), que abrangem a regulação endócrina do volume sanguíneo (LOEWY e SPYER, 1990). Sendo assim, a regulação reflexa da PA a curto prazo envolve predominantemente a ação de barorreceptores que ativam respostas autonômicas de ajustes cardiovasculares de maneira que a PA média, ao longo de 24 horas, seja estreitamente regulada apesar das variações que podem ocorrer com os diferentes comportamentos de um organismo (GUYENET, 2006).

Os mamíferos representam o grupo em que mais se conhece a respeito da regulação barorreflexa. Os componentes deste sistema incluem as aferências sensoriais (mecanorreceptores), o componente eferente visceral (sistema nervoso autônomo) e um componente neural central que integra as informações advindas das aferências sensoriais de modo a tamponar as alterações cardiovasculares por meio dos efetores (Figura 1).

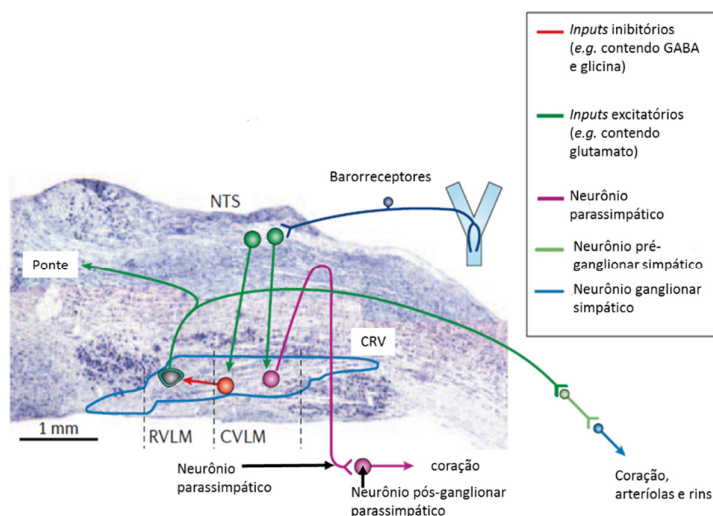


Figura1: Diagrama das vias centrais envolvidas na regulação barorreflexa no rato associadas aos seus respectivos neurotransmissores. CVLM, Bulbo ventro-lateral caudal; RVLV, Bulbo ventro-lateral rostral;

NTS, núcleo do trato solitário; CRV, coluna respiratória ventral. Em repouso, a maioria das aferências barorreceptoras enviam sinais tônicos e excitatórios aos neurônios do NTS onde grande número de aferências periféricas fazem suas sinapses iniciais. Projeções eferentes do NTS estimulam o sistema nervoso simpático e parassimpático que afetam a pressão arterial (PA). Assim, aumentos de PA e consequentemente maior estimulação dos barorreceptores, resultam em aumentada estimulação de projeções do NTS para o CVLM, cujos neurônios inibem o RVLM reduzindo assim a influência simpática sobre o coração, vasos sanguíneos, adrenais e rins; ao mesmo tempo em que projeções do NTS estimulam neurônios do núcleo ambíguo (NA) que por sua vez apresentam influência parassimpática por meio do vago sobre o coração, contribuindo com a redução da FC. Resposta oposta pode ser esperada quando da redução de PA, em que existe um aumento do tônus simpático para a vascularização e aumento de FC por desinibição do RVLM quando o CVLM deixa de ser estimulado pelo NTS, além de reduzido tônus parassimpático sobre o coração pela redução da estimulação advinda das projeções do NTS para o NA (O'DONAUGHY, et al., 2002; SCHREIHOFFER e GUYENET, 2002). Figura adaptada de GUYENET (2006).

Os dois ramos eferentes do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, estão sob controle dos barorreceptores arteriais, fibras sensíveis ao estiramento encontradas nos seios carotídeos, próximos à bifurcação das artérias carótidas comuns e, no arco aórtico (JACOB, et al., 2005). Alterações nos disparos nervosos das aferências barorreceptoras transmitidas ao sistema nervoso central (SNC) resultam em ajustes reflexos que se opõem às alterações de PA. O controle neural da regulação barorreflexa se dá pela atuação dos neurônios parassimpáticos que inervam o coração e neurônios simpáticos que inervam os vasos sanguíneos, o coração, os rins e a medula das adrenais. Assim, as eferências barorreflexas são responsáveis pela inibição das flutuações da PA, cujo aumento é capaz de acentuar uma resposta parassimpática enquanto reduz a atividade simpática, resultando em reduções na resistência vascular, FC, contratilidade cardíaca e retorno venoso (PANG, 2001), enquanto a queda da PA é capaz de ativar mecanismos opostos, inibindo a modulação parassimpática e aumentando a atividade simpática, acarretando em aumentos de resistência vascular, FC, contratilidade cardíaca, e retorno venoso (PANG, 2001). Desta forma, é reconhecido que existe uma relação inversa entre as alterações de PA e as alterações de FC e resistência vascular, caracterizando assim um sistema de controle por retroalimentação negativa.

A função barorreflexa é comumente descrita construindo curvas sigmóides que representam a relação funcional entre o estímulo-resposta ao longo de um intervalo de pressões arteriais da qual alguns parâmetros são possíveis de serem derivados. Por exemplo, a partir da curva barorreflexa é possível obter a amplitude de resposta reflexa (diferença entre a resposta máxima e mínima do barorreflexo) representado pela variável dependente, tal como a FC, a PA sistêmica e a atividade nervosa simpática, frente às manipulações da PA, ou seja, a amplitude de operação, que corresponde a variável independente e que pode ser estudada por meio de métodos farmacológicos ou mecânicos (Figura 2). O método farmacológico consiste

da administração de drogas vasoativas, tais como a fenilefrina, um vasoconstrictor capaz de aumentar a PA, e o nitroprussiato de sódio, um vasodilatador capaz de reduzir a PA; enquanto os métodos mecânicos se resumem as alterações posturais de um indivíduo, ou mesmo durante a aplicação rápida de pressão e sucção do pescoço para avaliar a função dos barorreceptores carotídeos (GOURNAY, et al., 2002).

A figura 2 é uma representação hipotética de uma função barorreflexa da FC, mas que também pode ser representativa da PA ou da atividade nervosa simpática (eixo Y). Podemos observar que o ponto operante (PO) da resposta barorreflexa representa a FC e a pressão arterial média (PAM) basais do organismo; ou seja, representam os valores antes do estímulo de alteração de PA. A pressão arterial no ponto médio (PAM_{50}) representa o ponto médio da curva equidistante da extremidade máxima e mínima, podendo ou não coincidir com a localização do PO. A PAM_{50} da curva também é representativa do valor de ganho máximo da resposta reflexa, normalmente representado como $Ganho_{50}$, e é frequentemente utilizado como a melhor representação da função barorreflexa (sensibilidade) nos organismos. É interessante notar que a localização do PO na porção final baixa da curva barorreflexa (ponto operante 2; Figura 2), posicionado em valores de PAM maiores que o valor de PAM_{50} da curva indica que o barorreflexo em questão é primariamente responsivo a eventos de hipotensão do que de hipertensão. Sendo assim, o inverso é verdadeiro nos casos em que o PO está posicionado em valores de PAM abaixo da PAM_{50} (ponto operante 1; Figura 2).

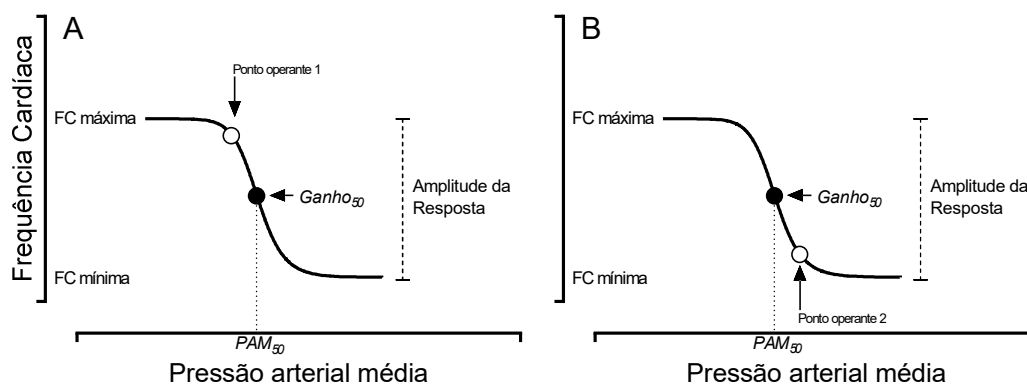


Figura 2: Gráficos hipotéticos representativos da relação entre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) caracterizando um sistema de controle por retroalimentação negativa da função barorreflexa. O círculo preto é o ponto da curva equidistante das respostas máximas e mínimas de FC e corresponde ao ganho máximo da resposta barorreflexa ($Ganho_{50}$). O ponto operante (PO, círculos brancos) representa os valores médios para a FC e a PAM antes do estímulo de alteração da pressão arterial (PA). A amplitude da resposta representa as variações máximas e mínimas de FC da curva. Um organismo que tenha o PO hipoteticamente localizado na posição 1 apresenta maior capacidade de responder a aumentos de PA (A),

enquanto aquele que apresenta o PO localizado na posição 2, apresenta maior capacidade de responder a quedas de PA (B).

1.2 Controle da pressão arterial: barorreflexo nos anfíbios

A regulação neural da PA pelo barorreflexo já foi descrita em muitas espécies de todos os grupos de vertebrados (ALTIMIRAS, et al., 1998; ARMELIN, et al., 2016; BAGSHAW, 1985; BIANCHI-DA-SILVA et al., 2000; CROSSLEY, et al., 2003; MUELLER et al., 2013; SANDBLOM e AXELSSON, 2005; ZENA, et al., 2015; 2016). Anfíbios anuros apresentam três populações de mecanorreceptores monitorando as alterações de PA estando localizados em todas as três grandes artérias que emergem do coração: as artérias pulmocutâneas (APCs), as artérias carótidas e os arcos aórticos (BIANCHI-DA-SILVA et al., 2000; ISHII, et al., 1985; MILLARD e MOALLI, 1980; KUSAKABE, 2002; VAN VLIET e WEST, 1987a,b). O monitoramento das alterações de PA pelos barorreceptores localizados nas APCs parece estar relacionado com a proteção da delicada microvascularização pulmonar de uma excessiva pressão hidrostática. Estes mecanorreceptores são os mais estudados e foram considerados os mais importantes na regulação da PA em anfíbios anuros, estando localizados especificamente na parede das APCs antes de sua bifurcação em artérias pulmonar e cutânea (HOFFMANN, et al., 1982; SMITS, et al., 1986; VAN VLIET e WEST, 1989; WEST e VAN VLIET, 1983). Considerando que a ganho máxima da resposta barorreflexa de FC está posicionado em valores de PA (~4,9 kPa = 36,7 mmHg) muito acima dos valores basais (2,7 kPa = 20,2 mmHg) para o sapo da espécie *Rhinella marina*, VAN VLIET e WEST (1989) sugeriram que os barorreceptores das APCs dos anfíbios apresentariam função de prevenir a ocorrência de edema pulmonar reagindo com mais eficiência a eventos de hipertensão do que hipotensão (ver figura 3A). Isto aconteceria em razão da ausência de separação anatômica e funcional das pressões arteriais entre a circulação sistêmica e pulmonar nos anfíbios, expondo a vascularização pulmonar a variações de PA idênticas as que ocorrem no circuito sistêmico (VAN VLIET e WEST, 1989). SMITS e colaboradores (1986), após realizarem desnervação bilateral do nervo recorrente laríngeo que contém as aferências dos barorreceptores localizados nas APCs no sapo *R. marina* relataram aumento agudo e transiente da FC, PA e do fluxo sanguíneo pulmonares, além de consequente aumento na taxa de filtração de fluido pulmonar, o que poderia acarretar na existência de edema neste tecido. É interessante notar que apesar de todas essas alterações sugestivas para o acúmulo de fluido extravascular durante eventos de hipertensão, SMITS (1994) descartou a existência de edema pulmonar no sapo *R. marina*, sugerindo que mesmo durante estados de extremos cardiovasculares mecanismos compensatórios devem existir para prevenir o acúmulo de líquido tecidual.

De acordo com o exposto acima, os barorreceptores das APCs parecem apresentar fundamental contribuição na regulação barorreflexa durante eventos de hipertensão, porém, a exclusão das aferências barorreceptoras contidas na artéria pulmocutânea no sapo *Rhinella schineideri* não apresenta efeito significativo sobre os ajustes do reflexo cardíaco durante a hipotensão (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000); situação em que o barorreflexo desempenha crítica função para manutenção da PA em valores aceitáveis de modo a evitar o comprometimento da perfusão dos órgãos-alvo garantindo suficiente disponibilidade de oxigênio e nutrientes, principalmente durante elevada demanda metabólica em ectotérmicos. Por outro lado, é interessante notar que a desnervação do arco aórtico nesta mesma espécie é capaz de inibir a resposta taquicárdica à hipotensão por nitroprussiato de sódio, indicando sua importante função no tamponamento cardíaco às quedas de PA (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000). Além disso, também foi verificado que essa taquicardia reflexa à hipotensão é atenuada após lesão eletrolítica bilateral das porções caudal e comissural do núcleo do trato solitário, o que sugere a convergência das aferências dos barorreceptores para esta região (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000), semelhante ao que ocorre em mamíferos (AKEMI SATO, et al., 2001).

Ainda não está definida a real função dos barorreceptores localizados nas artérias carótidas no controle da PA, visto que estes apresentam limiares muito acima dos valores normais de PA *in vivo*, em que os potenciais de ação só passam a ser acionados quando a PA atinge valores aproximados de 9,4 kPa (70 mmHg) (ISHII, et al., 1966). Desta forma, WEST e VAN VLIET (1994) sugeriram que a atividade nervosa oriunda do ramo carotídeo do nervo glossofaríngeo pode estar surgindo da ativação de mecanorreceptores localizados no tecido fora do sistema cardiovascular e que estariam sendo estimulados pela distensão do vaso durante altas PAs. Ainda assim, durante eventos de hipotensão, a desnervação dos barorreceptores das APCs em associação com os das artérias carótidas também não foram capazes de atenuar a resposta taquicárdica frente à hipotensão (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000).

É interessante notar que alguns fatores podem apresentar considerável influência sobre a regulação barorreflexa nos vertebrados, determinando assim diferenças ou não na sensibilidade desta resposta. Por exemplo, em detrimento das modificações na modulação autonômica sobre o coração e os vasos periféricos ao longo da ontogenia nos vertebrados, as respostas barorreflexas nestes organismos também podem apresentar considerável influência da fase do desenvolvimento embrionário, como já observado em embriões do jacaré-americano (*Alligator mississippiensis*; CROSSLEY II, et al., 2003), embriões de galinha

(*Gallus gallus*; ALTIMIRAS e CROSSLEY II, 2000), embriões de Emu (*Dromiceius novaehollandiae*; CROSSLEY II, et al., 2003) e fetos de ovelhas (BOOTH, et al., 2009; 2011). Estes mostram alterações na regulação barorreflexa caracterizada por diferenças na sensibilidade da resposta, bem como na capacidade de responder mais ou menos a estímulos hipertensores e/ou hipotensores (Figura 3A). Diferentes níveis de atividade física (leve, moderada e pesada) são capazes de estabelecer um novo nível de ajuste da função barorreflexa em humanos (RAVEN, et al., 2006). À medida que a intensidade do exercício físico aumenta, o PO move para valores mais baixos de PA e valores mais elevados de FC, ambos em relação a PAM_{50} . Isto acontece porque o PO move em direção ao limiar da resposta reflexa de hipotensão, em que o estímulo hipertensor passa a ser o principal responsável por manter a sensibilidade da resposta barorreflexa inalterada, enquanto o estímulo hipotensor já não é capaz de causar aumentos adicionais de FC (RAVEN, et al., 2006) (Figura 3B).

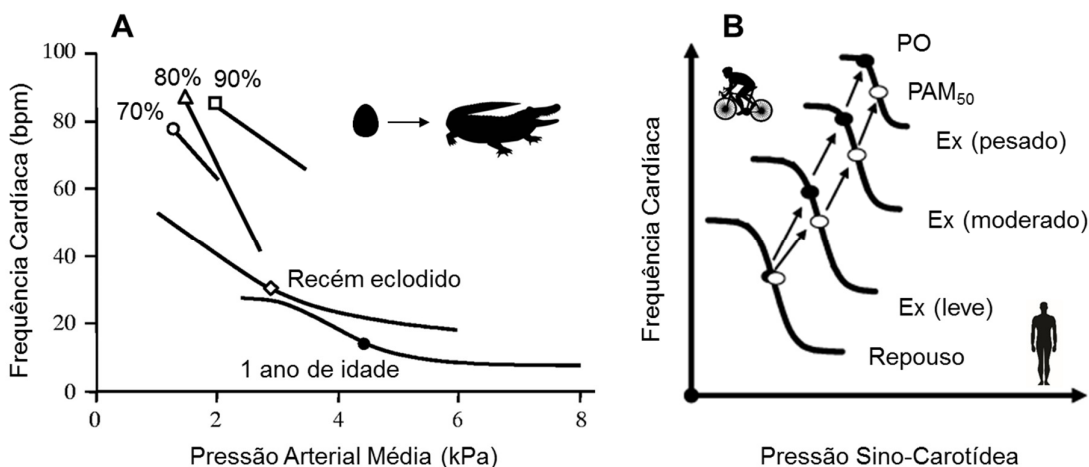


Figura 3: Fatores que podem influenciar a regulação barorreflexa. **A.** Comparação entre o barorreflexo da frequência cardíaca (FC) em diferentes estágios do desenvolvimento no jacaré-americano, *A. mississippiensis*. O símbolo em cada traço representa a FC e a pressão arterial média (PAM) basal antes do estímulo de alteração de pressão arterial (PA). O embrião aos 70, 80 e 90% de desenvolvimento apresenta o barorreflexo ativo quando a PA é aumentada (hipertensão), enquanto o recém eclodido e o juvenil de 1 ano de idade apresentam a resposta barorreflexa completa, respondendo à hipertensão e hipotensão (Modificado de CROSSLEY, II, et al., 2003). **B.** Resumo esquemático de diferentes ajustes da relação entre pressão sino-carotídea e a FC que ocorre durante diferentes níveis de exercício (Ex) em seres humanos: leve, moderado e pesado. Observe que o PO é deslocado para valores de PAM mais baixos que aqueles associados a PAM_{50} da curva, ao passo que a sensibilidade da resposta se mantém inalterada (Modificado de RAVEN, et al., 2006).

1.3 Controle da pressão arterial: efeito da temperatura sobre o barorreflexo em vertebrados

Os anfíbios estão sujeitos a uma ampla faixa de alterações ambientais, dentre elas a temperatura que é um dos fatores de maior importância, pois é capaz de afetar diretamente

todos os processos fisiológicos e bioquímicos, entre eles as funções cardiovasculares (BÍCEGO-NAHAS e BRANCO, 1999; BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001; GLASS, et al., 1997; SEEBACHER e FRANKLIN, 2011). Muitas taxas relacionadas a processos fisiológicos e bioquímicos aumentam de duas a três vezes a cada 10°C de aumento na temperatura corporal (Tc), um efeito chamado Q₁₀ (ROME, et al., 1992). Dentre os anfíbios, alterações da temperatura apresentam substanciais efeitos sobre a FC (BÍCEGO-NAHAS e BRANCO, 1999; GAMPERL, et al., 1999; GLASS, et al., 1997; LIU e LI, 2005; ROCHA e BRANCO, 1998). O aumento na taxa metabólica de um ectotérmico decorrente da elevação da Tc é normalmente acompanhada por um típico aumento de FC, muito provavelmente por um efeito direto da temperatura sobre a atividade do nódulo sinoatrial do coração (COURTICE, 1990; LIU e LI, 2005), atendendo assim as demandas energéticas para um estado metabólico mais elevado. Por outro lado, aumentos na Tc parecem afetar menos a PA, visto que a medida que o débito cardíaco aumenta existe uma redução na resistência vascular periférica, por efeito da temperatura que surge em decorrência de uma vasodilatação generalizada dos leitos periféricos. (GAMPERL, et al., 1999; LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978). Posto isto, a temperatura seria então um importante fator capaz de alterar a sensibilidade das respostas barorreflexas nos vertebrados, principalmente nos ectotérmicos. No entanto, ainda existem poucas evidências da influência desta sobre a regulação barorreflexa da FC.

Alguns estudos têm mostrado que a temperatura é capaz de alterar a sensibilidade barorreflexa em mamíferos. Por exemplo, em ratos, tanto a hipotermia durante anestesia (SABHARWAL, et al., 2004) quanto a hipertermia (MASSETT, et al., 2000) são capazes de atenuar a curva de resposta reflexa da FC. É interessante notar que mamíferos e aves apresentam a habilidade de manter a Tc relativamente constante mesmo quando a temperatura ambiente apresenta grande variabilidade. Entretanto, algumas espécies não são constantemente homeotérmicas e durante certos intervalos do dia ou do ano entram em estado de torpor diário ou prolongado (hibernação) (GEISER, 2010). Para o hamster-sírio (*Mesocricetus auratus*) é bastante comum que a Tc se aproxime da temperatura ambiente (~6°C) durante eventos de torpor diário, na qual a sensibilidade da resposta barorreflexa de FC é conseqüentemente reduzida seguindo também o padrão de reduzida taxa metabólica para a espécie durante o torpor (HORWITZ, et al., 2013).

Considerando que os vertebrados ectotérmicos têm a Tc primariamente determinada pela troca de calor com o ar, a água, e/ou o solo ou o ganho de calor proveniente do sol, dois estudos até o momento têm mostrado como as diferenças na temperatura ambiente, e conseqüentemente na Tc, podem afetar a sensibilidade barorreflexa nos animais: um

crocodiliano, o jacaré-do-papo amarelo (*Caiman latirostres*, HAGENSEN et al., 2010) e um testudíneo, a tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta*; CROSSLEY II, et al., 2015). Em ambos os animais, além da sensibilidade barorreflexa ser dependente da temperatura, é possível também verificar que os POs das respostas reflexas, representados pelos valores basais de FC do animal para uma determinada temperatura, são movidos para valores mais elevados (HAGENSEN et al., 2010; CROSSLEY II, et al., 2015), mostrando um restabelecimento da função barorreflexa de maneira a atender o diferenciado estado térmico que o animal se encontra.

1.4 Controle da pressão arterial: hipotensão versus hipertensão

Durante a evolução, a separação completa da circulação pulmonar da circulação sistêmica é apenas possível de ser observada nas aves e nos mamíferos. Nos crocodilianos, as circulações sistêmica e pulmonar não são completamente divididas, mas ainda assim estes não apresentam uma comunicação entre o ventrículo direito e o ventrículo esquerdo do coração, garantindo menor PA na circulação pulmonar em relação à sistêmica (GRIGG, 1991). É interessante notar que todos esses grupos de organismos mostram uma resposta de FC acentuada contra eventos de hipotensão em relação à hipertensão (ALTIMIRAS, et al., 1998; HAGENSEN et al., 2010; LUCITTI e HEDRICK, 2006; MURAKAMI, et al., 1998). Uma regulação barorreflexa mais acentuada para eventos de hipotensão em mamíferos e aves é principalmente importante, pois evita reduções extremas da pressão de perfusão sanguínea nos órgãos-alvo, prevenindo o comprometimento da disponibilidade de oxigênio e nutrientes em função da aumentada demanda metabólica existente nestes animais. Desta forma, uma elevada demanda metabólica é favorecida pela existência de capilares pulmonares com diâmetro reduzido em detrimento de uma maior taxa de difusão entre o sangue e a superfície de troca gasosa pulmonar. Além disso, a reduzida PA na circulação pulmonar minimizaria possíveis danos sobre essa diminuta barreira de difusão existente entre o sangue e o ar (WEST, 2009).

Como previamente hipotetizado para o sapo *Rhinella marina*, a importância do barorreflexo na proteção da delicada vascularização pulmonar contra hipertensão por meio do tamponamento da PA a partir de uma resposta reflexa de bradicardia mais acentuada que a taquicardia (Figura 4A) (VAN VLIET e WEST, 1989), poderia também ser estendida para outros grupos de vertebrados que apresentam um único ventrículo cardíaco, exibindo assim pressões arteriais indistintas entre as circulações sistêmica e pulmonar. No entanto, este não é

o cenário experimental verificado para a regulação barorreflexa da FC na tartaruga-de-orelha-vermelha (*T. scripta*; CROSSLEY II, et al., 2015) e no lagarto teiú (*Salvator merianae*; ZENA, et al., 2016), ambas espécies que apresentam pressões arteriais pulmonar e sistêmica similares (CROSSLEY II, et al., 1998; JENSEN, et al., 2014). O lagarto teiú sul-americano, assim como os crocodilianos, aves e mamíferos, apresenta uma clara resposta reflexa de taquicardia contra a hipotensão, enquanto uma bradicardia reflexa frente a eventos de hipertensão é praticamente nula. A FC de repouso nesta espécie (ponto operante antes do estímulo de alteração de PA) se encontra posicionada na porção final baixa da curva de sensibilidade barorreflexa (Figura 4B), e é compatível com um baixo tônus adrenérgico e um alto tônus colinérgico sobre o coração. Isto é confirmado por um grande aumento de FC induzido por ativação simpática em resposta à hipotensão e que é bloqueado com o uso de um antagonista de receptores β -adrenérgicos (sotalol). Assim, a mínima bradicardia observada durante a hipertensão é coerente com uma elevada modulação autonômica parassimpática operando sobre o coração e que não é capaz de atuar reduzindo ainda mais a FC frente ao estímulo pressor (ZENA, et al., 2016).

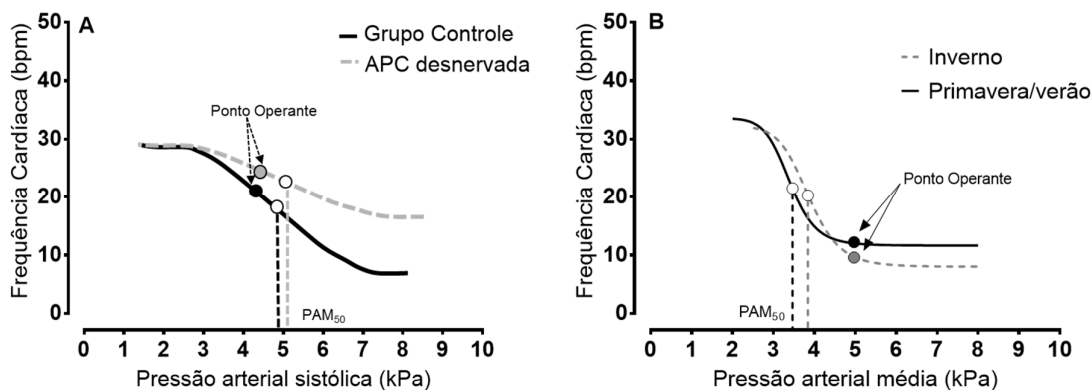


Figura 4: Regulação barorreflexa da frequência cardíaca no sapo *Rhinella marina* e no lagarto teiú *Salvator merianae*. **A.** Curvas barorreflexas para o sapo *Rhinella marina*, grupo controle representado pela linha preta e grupo com os barorreceptores das artérias pulmocutâneas (APCs) desnervados representados pela linha cinza pontilhada. A frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial sistólica (PAS) basais do animal estão representadas como círculo preto (controle) e cinza (APCs desnervadas). O ponto operante (valores antes do estímulo de alteração de pressão arterial, PA) se encontra na porção alta da curva em valores de PAS menores que o valor de pressão arterial no ponto médio da curva (PAM_{50}), significando que a resposta de FC do barorreflexo para esta espécie é responsiva primariamente a aumentos do que reduções de PA. A desnervação dos barorreceptores das APCs atenuou o barorreflexo (Adaptado de VAN VLIET e WEST, 1989). **B.** Curvas barorreflexas para o lagarto teiú *Salvator merianae* aclimatado a primavera/verão e inverno a temperatura de 25°C. Observe que a FC e a pressão arterial média (PAM) basais do animal estão representadas como círculo preto (primavera/verão) e cinza (inverno). Estes valores se encontram na porção baixa da curva em valores de PAM maiores que o valores de PAM_{50} , significando que o barorreflexo da FC para esta espécie é responsivo primariamente a quedas do que a aumentos de PA, independente da aclimatação (primavera/verão ou inverno) (Adaptado de ZENA, et al., 2016).

Uma reduzida habilidade em diminuir a FC em resposta a hipertensão nos teiús e mesmo na tartaruga-de-orelha-vermelha levanta a questão do porquê estes organismos, mesmo apresentando riscos de lesão pulmonar e edema durante eventos de elevada PA, ainda assim apresentam regulação barorreflexa da FC primariamente responsiva aos eventos de hipotensão do que de hipertensão. Em geral, anfíbios e répteis apresentam a espessura da barreira sangue/ar dos capilares pulmonares mais espessa em relação aos mamíferos e as aves (WEST, 2009). Apesar desta característica, outros fatores poderiam estar envolvidos em um aumentado fluxo de perda de plasma através dos capilares pulmonares em comparação com os mamíferos. Considerando que a taxa de filtração de fluido (plasma) dos vasos para o espaço intersticial é descrita pela equação de fluxo de Starling (HEDRICK, et al., 2013), cujos parâmetros envolvidos consideram o balanço das forças hidrostáticas que favorecem a saída de fluido do capilar, enquanto o balanço das forças osmóticas coloidais favorece o influxo de fluido de volta para o vaso; é possível notar que aumentos na pressão de fluido intersticial, reduções na pressão osmótica coloidal do tecido ou da área de superfície microvascular para a troca, ou mesmo aumentos no fluxo linfático podem todos atuar de maneira a limitar o acúmulo de fluido e conseqüentemente proteger o tecido contra a formação de edema em um organismo (SCALLAN, et al., 2010).

Comparativamente, a taxa de filtração transcápilar pulmonar (fluxo linfático pulmonar) nos mamíferos pode variar de 0.0017 a 0.0055 ml.kg⁻¹.min⁻¹ (COURTICE, 1963; ERDMANN, et al., 1975; HUMPHREYS, et al., 1967), enquanto na tartaruga da espécie *Trachemys scripta*, a filtração transcápilar através da vascularização pulmonar se aproxima de valores ao redor de 10 a 20 vezes maior que nos mamíferos (BURGGREN, 1982). Isto é possível em virtude das alterações nas forças que regem o princípio de Starling de maneira a favorecer uma aumentada taxa de filtração transcápilar em comparação com os mamíferos: tal como, uma elevada pressão arterial pulmonar, fluxo sanguíneo pulmonar variável (que aumenta durante a ventilação pulmonar e reduz durante os períodos de apneia), baixa pressão osmótica coloidal sanguínea, além da presença de junções endoteliais abertas (mais permeável) que favorecem a perda de fluido para o tecido intersticial (BARTELS e WELSCH, 1983; BURGGREN, 1982; ZWEIFACH e INTAGLIETTA, 1971). É importante salientar que, além de uma inervação vagal para o coração, répteis e anfíbios apresentam um esfíncter na artéria pulmonar innervado pelo vago e na qual termina em receptores do tipo colinérgico muscarínico (LUCKHARDT e CARLSON, 1921). O aumento da atividade vagal é capaz de aumentar a resistência da artéria pulmonar por meio da contração do esfíncter, desviando assim grande parte do sangue da circulação pulmonar para a circulação sistêmica.

Desta forma, uma reduzida bradicardia durante eventos de hipertensão nestes organismos pode estar acontecendo em paralelo a um aumento de resistência da artéria pulmonar por atuação do vago, o que redirecionaria o sangue do sistema pulmonar para o sistema sistêmico durante eventos de hipertensão reduzindo a possibilidade de danos ao pulmão.

Estudos recentes em anfíbios anuros mostram que estes apresentam taxa de filtração transcápsular e consequente formação de linfa cerca de 10 vezes maior que os mamíferos (DESAI, et al., 2010; HEDRICK, et al., 2007; HILLMAN, et al., 2010), além de um sistema linfático especializado e com habilidade de retornar o excesso de fluido transcápsular gerado de volta ao sistema cardiovascular, mantendo assim a homeostase do volume sanguíneo (HEDRICK, et al., 2013). Assim, o excesso de linfa produzida se acumula em sacos linfáticos subcutâneos e intrapleuroperitoneais separados por paredes de tecido conectivo e conectados entre si por válvulas de uma via (HEDRICK, et al., 2013).

Os mecanismos de retroalimentação negativa que determinam a regulação da PA de curto prazo dependentes dos barorreceptores não apenas dependem de efetores que alteram a FC e a resistência vascular periférica (HEDRICK, et al., 2013). O sistema linfático dos anuros ainda conta com a presença de corações linfáticos (anterior e posterior), vasos pulsáteis que estão sob controle barorreceptor e responsáveis por bombear o fluido linfático que se encontra acumulado nos sacos linfáticos de volta ao sistema cardiovascular (CROSSLEY e HILLMAN, 1999). A importância dos corações linfáticos na homeostase da PA tem sido revelada pelos achados de que aumentos de PA são capazes de reduzir reflexivamente a frequência dos corações linfáticos posteriores e assim reduzir o retorno de linfa para o sistema venoso, uma resposta que é modulada pelos barorreceptores da artéria pulmocutânea (CROSSLEY e HILLMAN, 1999; YAMANE, 1990). Entretanto, a localização dorsal dos corações linfáticos nos anfíbios anuros implica em desafios gravitacionais decorrentes da mobilização de linfa que se acumula em regiões ventrais dos sacos linfáticos. Assim, o fluido extravascular gerado por alterações da pressão hidrostática do sangue sobre o capilar sanguíneo retorna ao sistema cardiovascular através da combinação de mudanças na pressão e volume dos sacos linfáticos. O movimento vertical de linfa nos anuros parece ser dirigido por efetores como a ventilação pulmonar, cuja inflação e deflação são capazes de causar alterações de pressão e volume principalmente no saco linfático subvertebral localizado no espaço dorsal entre os pulmões e a coluna vertebral, e a contração de vários músculos esqueléticos que estão intimamente associados aos sacos linfáticos circundantes aos membros anteriores e posteriores (DREWES et al., 2007; HEDRICK, et al., 2007) (Figura 5). É interessante notar que evidências experimentais em mamíferos, incluindo humanos, têm

sugerido que o barorreflexo também é capaz de afetar a função respiratória (MCMULLAN e PILOWSKY, 2010) e, portanto, especulações a respeito da influência da PA sobre a ventilação em mamíferos poderiam ter como origem a interação central entre áreas de controle cardiovascular e respiratória nos anfíbios anuros. Desta forma, uma das hipóteses seria que a ventilação pulmonar e a contração dos músculos linfáticos envolvidos na homeostase da PA e do volume sanguíneo seriam, portanto, efetores do barorreflexo.

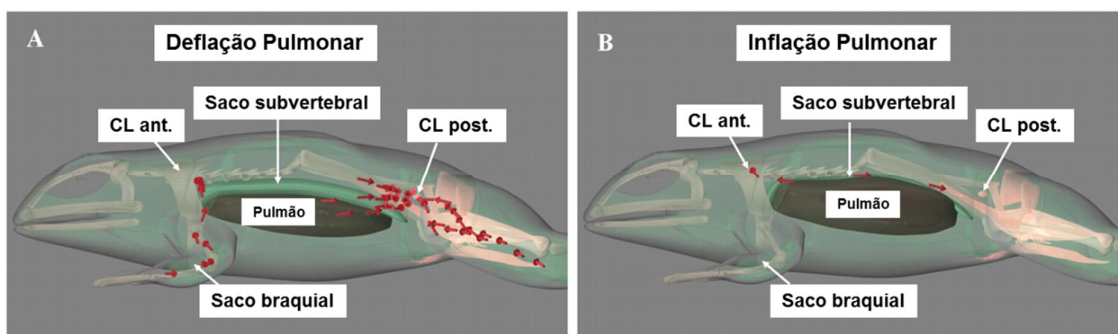


Figura 5: A. Modelo esquemático representando o efeito da ventilação pulmonar e da contração dos músculos esqueléticos linfáticos dos membros anteriores e posteriores no movimento linfático vertical no sapo *Rhinella marina*. A. A deflação pulmonar causa um aumento do volume e redução da pressão do saco linfático subvertebral, resultando no movimento de linfa proveniente do saco linfático braquial. B. A inflação pulmonar aumenta a pressão dentro dos sacos linfáticos subvertebral, dorsal e lateral e direciona a linfa aos corações linfáticos anteriores (CL ant.) e posteriores (CL post.) que bombeiam o fluido linfático de volta ao sistema cardiovascular. As setas indicam a direção do movimento linfático. (Adaptado de HEDRICK, et al., 2007).

Considerando que a temperatura é um dos principais fatores do componente climático que pode impactar diretamente a biologia dos anfíbios e que, apesar da relativa diversidade de dados sobre o efeito desta no controle cardiorrespiratório destes animais (BÍCEGO-NAHAS e BRANCO, 1999; BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001; LIU e LI, 2005; ROCHA, et al., 1998; SEEBACHER e FRANKLIN, 2011), nenhum estudo até o momento verificou o potencial efeito das mudanças de temperatura, condição em que esses animais estão susceptíveis em seu ambiente, sobre a regulação reflexa de FC a curto prazo da PA. Assim, baseado nas considerações expostas acima, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar os efeitos da temperatura nas respostas barorreflexas de FC no sapo cururu, *Rhinella schneideri* (anteriormente conhecido como *Bufo paracnemis* ou *Chaunus schneideri*; FROST, et al., 2006; Figura 6), sendo estas apresentadas no Capítulo I desta tese. Embora existam dados sugestivos da modulação barorreflexa sobre o sistema respiratório em crocodilianos e anfíbios (ALTIMIRAS, et al., 1998; HEDRICK, et al., 2013; VAN VLIET e WEST, 1986), ainda não existem evidências diretas de um componente respiratório envolvido na regulação da PA em vertebrados não-mamíferos. Assim, exploramos no Capítulo II desta tese a

existência de uma correlação entre o barorreflexo e a ventilação pulmonar no sapo *R. schneideri*; espécie sul americana popularmente conhecido como sapo cururu que apresenta grande porte e é amplamente distribuída em áreas de vegetação aberta desde o Cerrado central brasileiro até o Chaco Argentino, embora possa ser encontrado em perímetros urbanos (Figura 7): todas regiões sujeitas a variações de temperatura de ordem diária e anual.



Figura 6: Sapo cururu. Foto de um exemplar de sapo cururu (*Rhinella schneideri*) utilizado no presente trabalho. Foto: L. A. Zena.



Figura 7: Abrangência geográfica do sapo cururu. Mapa mostrando a distribuição geográfica das espécies *Rhinella schneideri* e *Rhinella marina*. Podemos observar a vasta distribuição da espécie *R. schneideri* na América do Sul (Adaptado de VALLINOTO, et al., 2010).

Capítulo I

**Efeito da temperatura sobre o controle
barorreflexo da frequência cardíaca no
sapo cururu, *Rhinella schneideri***

RESUMO

Para um adequado suprimento sanguíneo de modo a atender as diferentes demandas metabólicas, os vertebrados regulam a pressão arterial mantendo adequada perfusão dos órgãos evitando assim eventos isquêmicos ou outros danos teciduais, como edema. No presente estudo utilizamos de um método farmacológico (fenilefrina e nitroprussiato de sódio) para investigar a sensibilidade barorreflexa a 15, 25, e 30°C no sapo *Rhinella schneideri*. A sensibilidade barorreflexa apresentou alta dependência térmica ($Q_{10} = 1.9-4.1$), e a curva de FC do barorreflexo foi deslocada para cima e para a direita conforme a temperatura foi aumentada de 15 para 30°C. As variáveis do barorreflexo, tal como a amplitude de FC, o ganho₅₀ (ganho máximo) e o ganho máximo normalizado aumentaram 206, 235, e 160% para o intervalo térmico de 15 a 30°C, respectivamente. O ramo cardíaco da resposta barorreflexa para o tratamento farmacológico foi significativamente atenuado após bloqueio autonômico total (atropina + sotalol). Adicionalmente, houve uma clara resposta da FC do barorreflexo principalmente para eventos de hipotensão em todas as três temperaturas testadas. Os dados do presente estudo indicam que os sapos da espécie *R. schneideri* apresentam resposta barorreflexa de FC dependente da temperatura e que esta resposta é mais acentuada para eventos de hipotensão ao invés da hipertensão, similar ao que ocorre nos crocodilianos, aves e mamíferos. Assim, ao contrário do proposto na literatura para a regulação da PA de curto prazo nos anfíbios, cuja hipertensão resultaria em bradicardia reflexa mais acentuada com o intuito de proteger a delicada microvascularização pulmonar não foi observada no presente estudo, sugerindo assim a existência de mecanismos compensatórios adicionais, como um sistema linfático mais eficiente, quando da existência de uma elevada PA.

Palavras-chave: sensibilidade barorreflexa, anfíbios, pressão arterial, nitroprussiato de sódio, fenilefrina

ABSTRACT

For an adequate blood supply to support metabolic demands, vertebrates regulate blood pressure (BP) to maintain sufficient perfusion to avoid ischemia and other tissue damage like edema. Using a pharmacological approach (phenylephrine and sodium nitroprusside) we investigated baroreflex sensitivity at 15, 25, and 30 °C in toads *Rhinella schneideri*. Baroreflex sensitivity presented a high thermal dependence ($Q_{10} = 1.9\text{--}4.1$), and the HR–baroreflex curve was shifted up and to the right as temperature increased from 15 to 30 °C. Baroreflex variables, namely, HR range, gain₅₀ (maximal gain) and normalized gain₅₀ increased 206, 235, and 160% from 15 to 30 °C, respectively. The cardiac limb of the baroreflex response to pharmacological treatments was significantly blunted after full autonomic blockade (atropina + sotalol). In addition, there was a clear baroreflex–HR response mainly to hypotension at all three temperatures tested. These findings indicate that toads present temperature dependence for cardiac limb of the barostatic response and the cardiac baroreflex response in *R. schneideri* is primarily hypotensive rather than hypertensive as well as crocodylians and mammals. Thus, in contrary to previous data for short-term BP regulation in amphibians, in which hypertension would result in a bradycardic reflex response in order to protect a delicate pulmonary microvasculature, was not exhibited by our toads, suggesting an additional compensatory mechanisms, like an efficient lymphatic system, during high BP events.

Keywords: baroreflex sensitivity, amphibians, blood pressure, sodium nitroprusside, phenylephrine

LISTA DE ABREVIACES

APCs	artérias pulmocutâneas
FC	frequência cardíaca
FE	fenilefrina
Ganho ₅₀	ganho máximo
Ganho ₅₀ normalizado	ganho máximo normalizado
MAP ₅₀	pressão arterial no ponto médio
NPS	nitroprussiato de sódio
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial media
PAP	pressão arterial pulsátil
Tc:	temperatura corporal

1 INTRODUÇÃO

Os vertebrados são capazes de regular a pressão arterial (PA) mantendo adequada perfusão tecidual, satisfazendo apropriado suprimento de oxigênio e nutrientes de acordo com a demanda metabólica. A manutenção da PA sem alterações extremas também é importante pois evita danos teciduais e mesmo a formação de edema (HAGENSEN, et al., 2010; VAN VLIET e WEST, 1994).

A regulação neural da PA pelas respostas barorreflexas já foram verificadas para muitas espécies de vertebrados, incluindo anfíbios, répteis, aves e mamíferos (ALTIMIRAS, et al., 1998; BAGSHAW, 1985; CROSSLEY, et al., 2003; MUELLER, et al., 2013). Anfíbios anuros apresentam três regiões barorreceptoras monitorando as alterações de PA e que estão localizadas na artérias pulmocutâneas (APCs), arcos aórticos e artérias carótidas (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000; ISHII, et al., 1985; KUSAKABE, 2002; MILLARD e MOALLI, 1980; VAN VLIET e WEST, 1987a,b). Evidências experimentais indicam que os barorreceptores das APCs são essenciais para a proteção da vascularização pulmonar contra eventos de excessiva pressão hidrostática protegendo a delicada vascularização pulmonar (SMITS, et al., 1986; SMITS, 1994; VAN VLIET e WEST, 1989). Bianchi-da-Silva e colaboradores (2000) enfatizaram a importância dos barorreceptores do arco aórtico na regulação da PA durante eventos de hipotensão, e assim evitando reduções na pressão de perfusão tecidual.

Os anfíbios estão sujeitos a inúmeras alterações de ordem ambiental, e a temperatura é um dos fatores mais importantes e que diretamente afetam todos os processos fisiológicos e bioquímicos, dentre eles as funções cardiovasculares (BÍCEGO-NAHAS e BRANCO, 1999; BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001; GLASS, et al., 1997; SEEBACHER e FRANKLIN, 2011). Mudanças de temperatura parecem influenciar a frequência cardíaca (FC) mais do que a PA (BÍCEGO-NAHAS e BRANCO, 1999; GAMPERL, et al., 1999; GLASS, et al., 1997; LIU e LI, 2005; ROCHA e BRANCO, 1998). Aumentos na temperatura corporal (T_c) podem aumentar a FC principalmente por um efeito direto sobre o nódulo sinoatrial do coração (COURTICE, 1990; LIU e LI, 2005). Uma PA relativamente constante durante aumentos de temperatura pode ocorrer com um aumento do débito cardíaco em paralelo a uma redução na resistência vascular decorrente de uma vasodilatação dos leitos vasculares periféricos (GAMPERL et al., 1999; LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978).

Dentre os vertebrados, existem poucas evidências da influência térmica sobre a sensibilidade barorreflexa. Até o presente trabalho, existem estudos em mamíferos

(HORWITZ, et al., 2013; MASSETT, et al., 2000; SABHARWAL, et al., 2004), e em répteis (HAGENSEN, et al., 2010). Em ratos, a hipotermia durante anestesia (SABHARWAL, et al., 2004) e a hipertermia (MASSETT, et al., 2000) são capazes de atenuar a curva barorreflexa de FC. É interessante notar que alguns mamíferos, tal como o hamster-sírio, são bastante comuns que a temperatura corporal se aproxime da temperatura ambiente durante os eventos de torpor, em que a sensibilidade barorreflexa está reduzida (HORWITZ, et al., 2013). No jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), a sensibilidade barorreflexa de FC é dependente da temperatura, em que mudanças de temperatura de 15 para 30°C deslocam a curva de sensibilidade barorreflexa para cima e para a direita (HAGENSEN, et al., 2010). Até o momento, nenhum estudo examinou o possível efeito da temperatura sobre a resposta barorreflexa de FC em anfíbios anuros. Em contraste com os mamíferos, aves, e crocodilianos, pressões arteriais idênticas entre as circulações sistêmicas e pulmonar podem expor a vascularização pulmonar dos anfíbios a significativas alterações de PA, a menos que uma resposta compensatória exista para atenuar os possíveis efeitos deletérios dos eventos de alta PA. Assim, esta resposta compensatória pode ser consideravelmente afetada pelas alterações da temperatura.

Baseado no exposto acima, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o efeito da temperatura nas respostas barorreflexa de FC no sapo sul-americano, *Rhinella schneideri* (anteriormente conhecido como *Bufo paracnemis* ou *Chaunus schneideri*; FROST, et al., 2006). Esta espécie é de grande porte e amplamente distribuída em áreas de vegetação aberta desde o Cerrado brasileiro até regiões do Chaco argentino (PRAMUK, 2006), embora sua ocorrência também inclui áreas urbanas abertas. Todas essas regiões sujeitas a mudanças de temperatura diária e anual.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Sapos da espécie *R. schneideri* (Werner, 1894) de ambos os sexos e pesando entre 180-350 gramas foram coletados no entorno de áreas alagadas na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil (aproximadamente 21° 10' S e 47° 48'O). Os animais foram mantidos no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UNESP, Jaboticabal, Brasil. Todos os animais foram mantidos a temperatura de 25°C, com ciclo claro/escuro de 12:12 h com livre acesso a água potável e área para descanso. Os animais foram mantidos em caixas plásticas contendo substrato a base de fibra de coco e com tubos de PVC para esconderijos, e foram mantidos nas condições laboratoriais citadas acima por pelo menos 3 semanas antes do início dos protocolos experimentais. Os animais foram alimentados de duas a três vezes por semana com tenébrios (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*), grilos (*Gryllus sp*) e/ou baratas (*Nauphoeta cinerea*), todos criados em cativeiro. Os experimentos foram realizados de setembro a março, no qual coincide com a estação de atividade da espécie, estação mais chuvosa do ano (BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001; GLASS, et al., 1997). A coleta dos animais foi aprovada pelo órgão ambiental (SISBIOICMBio/ n. 35484-1), e o estudo foi conduzido sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FCAV-UNESP; Protocolo n. 017204/12).

2.2 Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados por imersão em solução aquosa 0,25% de ácido 3-aminobenzóico etil éster (MS-222, Sigma, St. Louis, EUA), tamponado em pH 7,7 com bicarbonato de sódio, por aproximadamente 10 minutos ou até que houvesse perda dos reflexos da córnea. Para as medidas de pressão arterial pulsátil (PAP), uma cânula de polietileno (PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA), preenchida com solução Ringer heparinizada (100 i.u. mL⁻¹ heparina) foi oclusivamente inserida na artéria ilíaca, exteriorizada e suturada sobre a pele do animal. O mesmo procedimento foi utilizado para canular a veia femoral (100 i.u. mL⁻¹ heparina em solução Ringer) para infusão dos fármacos. Logo após os procedimentos cirúrgicos, os sapos foram tratados com antibiótico (enrofloxacina, Flotril®; Schering-Plough, 5,0 mg.kg⁻¹ s.c.) e analgésico (Flunixin Meglumina, Banamine®; Schering-Plough, 1,0 mg.kg⁻¹ s.c.) de acordo com doses recomendadas para anfíbios (GENTZ, 2007; SMITH, 2007). Após a recuperação da anestesia, cada animal foi individualmente colocado em uma câmara com temperatura controlada a 25°C

e mantidos nestas condições por 24 h sem interferência externa até o início dos procedimentos experimentais.

2.3 Fármacos

Nitroprussiato de sódio dihidratado (NPS, doador de óxido nítrico), fenilefrina (FE, agonista de receptores α -1 adrenérgicos), sulfato de atropina (antagonista de receptores muscarínicos), e sotalol (antagonista de receptores β -adrenérgicos) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os fármacos foram dissolvidos em solução Ringer para anfíbios (composição em mM: 46,9 NaCl; 21,0 KCl; 2,40 CaCl; 1,29 MgCl; 3,14 NaHCO₃).

2.4 Medidas da pressão arterial (PA)

A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (MLT1199, ADInstruments®, Sydney, Austrália) cuja calibração foi feita por meio de uma coluna de mercúrio. O transdutor foi conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sydney, Austrália) por meio de um amplificador de sinais (FE221, ADInstruments®, Sydney, Austrália). A frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM) foram calculadas a partir do sinal de PAP e registrada em tempo real usando a ferramenta *cyclic measurements* do Software LabChart.

2.5 Avaliação do barorreflexo

A resposta reflexa de FC foi avaliada como alteração na PAM induzida pela infusão intravenosa de FE (150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a uma taxa de 0,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e do doador de óxido nítrico NPS (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a uma taxa de 0,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, Holliston, MA, EUA) (CRESTANI, et al., 2010). A ordem de infusão dos fármacos foi randomizada e ajustada para durar 60 s, resultando em uma injeção de dose total de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para a FE e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para o NPS, causando um aumento e diminuição máximos de PAM de $\sim 1,33$ kPa (~ 10 mmHg) a 25°C. Os aumentos e reduções graduais na PAM foram associados as respectivas respostas reflexas de FC batimento-a-batimento. Os valores de PAM e FC obtidos para cada animal em cada temperatura através das infusões em rampa de FE e NPS foram plotados um com o outro. Uma função logística de quatro parâmetros foi então usada para criar a relação de FC-PAM (veja análise do barorreflexo cardíaco). A resposta barorreflexa resultante da combinação dos dados batimento-a-batimento foram interrompidos

quando a PA foi máxima para a FE e mínima para o NPS. Todas as doses foram escolhidas com base em dados da literatura na mesma espécie (NPS e FE; BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000), bem como de experimentos pilotos.

2.6 *Protocolos experimentais*

Todos os experimentos foram realizados em sapos não anestesiados e sem estarem contidos. Durante os experimentos, os sapos foram acondicionados em câmaras acrílicas mantidas a temperatura experimental de 15, 25 ou 30°C utilizando um banho de circulação externa (PolyScience 9112A11B Programmable Model 9112 Refrigerated Circulator). Os animais foram aclimatados a cada temperatura por aproximadamente 12 horas (começando 24 h após a realização dos procedimentos cirúrgicos). A câmara experimental foi continuamente circulada com ar ambiente umidificado e a temperatura interna da câmara foi continuamente monitorada por meio de um sensor de temperatura (MLT415/MThermistor temperature sensor, ADInstruments®, Sydney, Austrália). Após 60 minutos do registro basal de PAP, a solução Ringer (0.4 mL.kg⁻¹) foi infundida na veia femoral do animal com o objetivo de se verificar qualquer influência do volume injetado nos parâmetros cardiovasculares. Os sapos utilizados neste estudo receberam duas infusões cada de FE e NPS para o estudo do barorreflexo a 15, 25 e 30°C a qual foram infundidas nos animais de maneira randômica. Cada temperatura foi testada randomicamente ao longo de três dias consecutivos para permitir as 12 horas de aclimação em cada temperatura. Cinco animais do grupo experimental a 25°C foram também testados para o bloqueio autonômico total do coração (ALTIMIRAS, et al., 1998; HAGENSEN, et al., 2010). Para este protocolo os animais receberam injeções intravenosas com antagonista β-adrenérgico, sotalol (3,0 mg kg⁻¹), e o antagonista de receptores muscarínicos, sulfato de atropina (3,0 mg kg⁻¹), e na sequência o protocolo para a quantificação da sensibilidade barorreflexa foi novamente realizado.

2.7 *Análise do barorreflexo*

A função barorreflexa foi investigada por meio da análise da curva sigmoide da relação entre PAM e FC. Utilizando-se de ferramenta específica do GraphPad Prism (regressão não-linear), os dados de PAM (kPa) foram plotados batimento-a-batimento junto com os correspondentes valores de FC (bpm) e analisados utilizando uma função logística sigmoide de quatro parâmetros como descrita previamente por Reid (1996):

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

Onde A é a FC máxima e D é a FC mínima da curva. B é o coeficiente que representa a inclinação da curva (bpm.kPa^{-1}). C é a PAM no ponto médio da amplitude de FC (PAM_{50}). A amplitude do barorreflexo para a FC foi calculado como a diferença entre a FC máxima e mínima (A-D). O ganho máximo (Ganho_{50} ; em bpm.kPa^{-1}) da curva, na qual ocorre quando a PAM é igual a C foi determinada tomando a derivada primeira da equação 1 resultando no ganho máximo por meio da equação abaixo:

$$(2) \quad \text{Ganho}_{50} = \frac{-B(A-D)}{4C}$$

O ganho máximo foi então normalizado (sem unidades) em relação a PAM e FC basais para cada animal (BERGER, et al., 1980; CROSSLEY, et al., 2003) com o objetivo de estabelecer comparações significativas entre as temperaturas:

$$(3) \quad \text{Ganho}_{50} \text{ normalizado} = \text{Ganho}_{50} \times \left(\frac{\text{PAM}}{\text{FC}} \right)$$

2.8 Análise dos dados e estatística

Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. O efeito farmacológico dos tratamentos sobre a PAM e a FC nas diferentes temperaturas foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias de medidas repetidas (fatores: tempo e temperatura). O efeito da temperatura sobre os valores basais de PAM e FC assim como sobre os valores de FC mínima, FC máxima, a amplitude de FC, o coeficiente do *slope*, o ganho máximo, o ganho normalizado, e a PAM no ponto médio da curva foram analisados por meio de uma ANOVA de uma via. O efeito do bloqueio autonômico total sobre as respostas barorreflexas para infusões de FE e NPS foram calculadas na forma de delta (efeito do fármaco menos valores pré-infusão) e também analisadas por meio de uma ANOVA de uma via. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software SigmaPlot versão 11. Em todos os casos de análise por meio de ANOVA, as diferenças entre as médias foram obtidas utilizando um pós-teste de Tukey e foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. A variância e a normalidade dos dados foram testadas e quando necessário, foram transformados adequadamente quando não atendiam aos requisitos da análise paramétrica.

3 RESULTADOS

A Figura 1 mostra os registros representativos de PAP, PAM e FC durante infusões intravenosas de FE e NPS a 15, 25 e 30°C. Note que a 15°C os efeitos de ambos os fármacos duram mais tempo em comparação com as temperaturas mais elevadas (25 e 30°C).

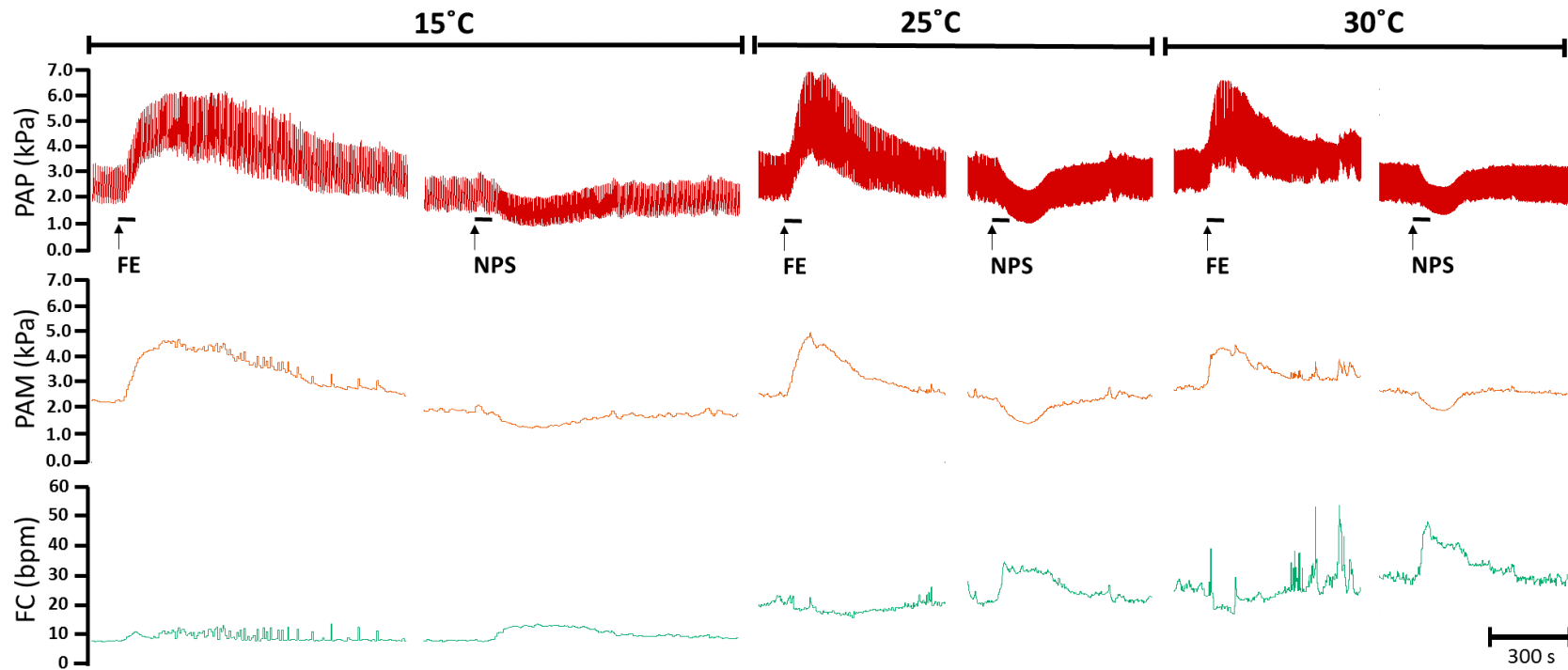


Figura 1: Pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos traçados originais representativos de um sapo cururu *Rhinella schneideri* nas temperaturas de 15, 25 e 30°C. Registro representativo ilustrando as respostas reflexas de FC frente ao aumento e a redução da pressão arterial causadas pela infusão intravenosa (as linhas pretas representam a duração da infusão) de fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS) em três diferentes temperaturas (15, 25, e 30°C).

3.1 Efeito da temperatura sobre os parâmetros cardiovasculares

A PAM e a FC dos sapos a 15, 25 e 30°C foram $3,01 \pm 0,26$; $3,88 \pm 0,25$; $4,20 \pm 0,44$ kPa e $16,7 \pm 1,81$; $27,7 \pm 2,59$; $31,7 \pm 2,72$ bpm, respectivamente (Tabela 1 e Figura 4). Os valores basais de PAM não foram diferentes entre as temperaturas ($F_{(2, 21)} = 3,313$; $P = 0,056$), e os valores basais de FC a 25 e 30°C foram mais altos que a 15°C ($F_{(2, 21)} = 11,867$; $P < 0,001$; Tabela 1).

Tabela 1: Variáveis cardiovasculares basais e do barorreflexo derivadas das curvas sigmóides do barorreflexo da FC geradas após infusão de fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS) (equação 1) a 15, 25 e 30°C no sapo cururu *Rhinella schneideri*

	15°C	25°C	30°C
Variáveis basais			
PAM (kPa)	3,01±0,26	3,88±0,25	4,20±0,44
FC (bpm)	16,7±1,81 ^a	27,7±2,59 ^b	31,7±2,72 ^b
Variáveis barorreflexas			
FC mínima (bpm)	13,2 ± 1,75 ^a	22,3 ± 2,49 ^b	25,1 ± 1,61 ^b
FC máxima (bpm)	23,8 ± 2,63 ^a	49,9 ± 3,97 ^b	57,1 ± 4,73 ^b
Amplitude de FC (bpm)	10,6 ± 1,92 ^a	27,6 ± 4,10 ^b	32,0 ± 4,47 ^b
R ²	0,88 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,80 ± 0,03
Coeficiente do Slope	9,89 ± 3,16	9,37 ± 1,61	12,7 ± 2,05
PAM ₅₀ (kPa)	2,83 ± 0,32	3,31 ± 0,20	3,88 ± 0,40
Ganho ₅₀ (bpm.kPa ⁻¹)	7,27± 1,44 ^a	19,6 ± 3,27 ^b	24,4 ± 4,15 ^b
Ganho normalizado ₅₀ (un)	1,33 ± 0,30 ^a	2,90 ± 0,58 ^{ab}	3,45 ± 0,84 ^b

Valores indicados por diferentes letras são significativamente diferentes entre as temperaturas (ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey; $P < 0,05$). FC, frequência cardíaca; PAM, pressão arterial média; R², coeficiente de determinação; coeficiente do slope, coeficiente que representa a inclinação da curva; PAM₅₀, pressão arterial média no ponto médio da curva; Ganho₅₀, ganho máximo; ganho normalizado₅₀, ganho expresso em unidade normalizada. Os dados são expressos como média ± E.P.M. N = 7-10.

3.2 Efeito da temperatura sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela fenilefrina (FE)

A 15, 25 e 30°C, as infusões de FE causaram aumento na PAM ($F_{(2, 21)} = 49,690$; $P < 0,001$; Figura 2A), mas a FC não apresentou resposta reflexa após o aumento de PAM (Figura 2B). A elevação da PAM pela FE não foi diferente entre as temperaturas de 25 e 30°C, mas foi menos acentuada para a temperatura mais baixa, 15°C (15 vs 25°C; $F_{(2, 21)} = 4,880$; $P < 0,028$, e 15 vs 30 °C; $F_{(2, 21)} = 4,880$; $P < 0,031$; Figura 2A). Os valores de FC ao longo do

tempo foram sempre menores a 15°C comparado aos valores de 25 e 30°C ($F_{(2, 21)} = 13,077$; $P < 0,01$; Figura 2B)

3.3 Efeito da temperatura sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo nitroprussiato de sódio (NPS)

As infusões de NPS em diferentes temperaturas causaram efeito hipotensivo ($F_{(2, 21)} = 48,085$; $P < 0,001$; Figura 2C) e taquicardia reflexa ($F_{(2, 21)} = 47,698$; $P < 0,001$; Figura 2D). A redução da PAM ao longo do tempo a 15°C apresentou os menores valores em comparação com a temperatura de 30°C ($F_{(2, 21)} = 6,666$; $P = 0,004$), e a taquicardia reflexa foi menor a 15°C em comparação com 25°C ($F_{(2, 21)} = 21,822$; $P < 0,001$) e 30°C ($F_{(2, 21)} = 21,822$; $P < 0,001$).

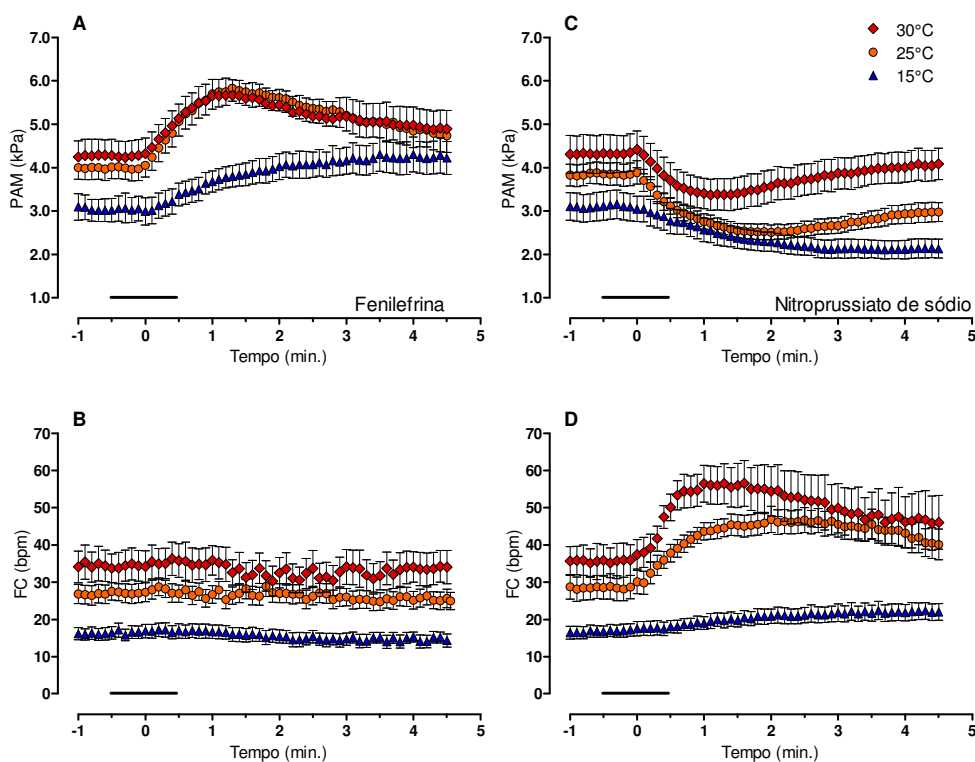


Figura 2: Efeito da manipulação farmacológica sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) no sapo cururu *Rhinella schneideri* nas temperaturas de 15, 25 e 30°C. Efeito da infusão intravenosa (as linhas pretas representam a duração da infusão) de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de fenilefrina (FE; A e B) ou 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de nitroprussiato de sódio (NPS; C e D) na pressão arterial média (PAM; A e C) e frequência cardíaca (FC; B e D) do sapo cururu *Rhinella schneideri* a 15 (triângulo azul), 25 (círculo amarelo), e 30°C (quadrado vermelho), respectivamente. $N = 7-10$. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

3.4 Controle do barorreflexo da FC: Efeitos da temperatura

Podemos observar na figura 3 a representação da resposta de alteração de PAM com FE e NPS na curva barorreflexa de FC para as três temperaturas, avaliadas para cada animal. Em todos os animais, reduções na PAM causaram taquicardia reflexa em todas as temperaturas testadas, mas não houve uma resposta consistente de bradicardia para o mesmo aumento de PAM.

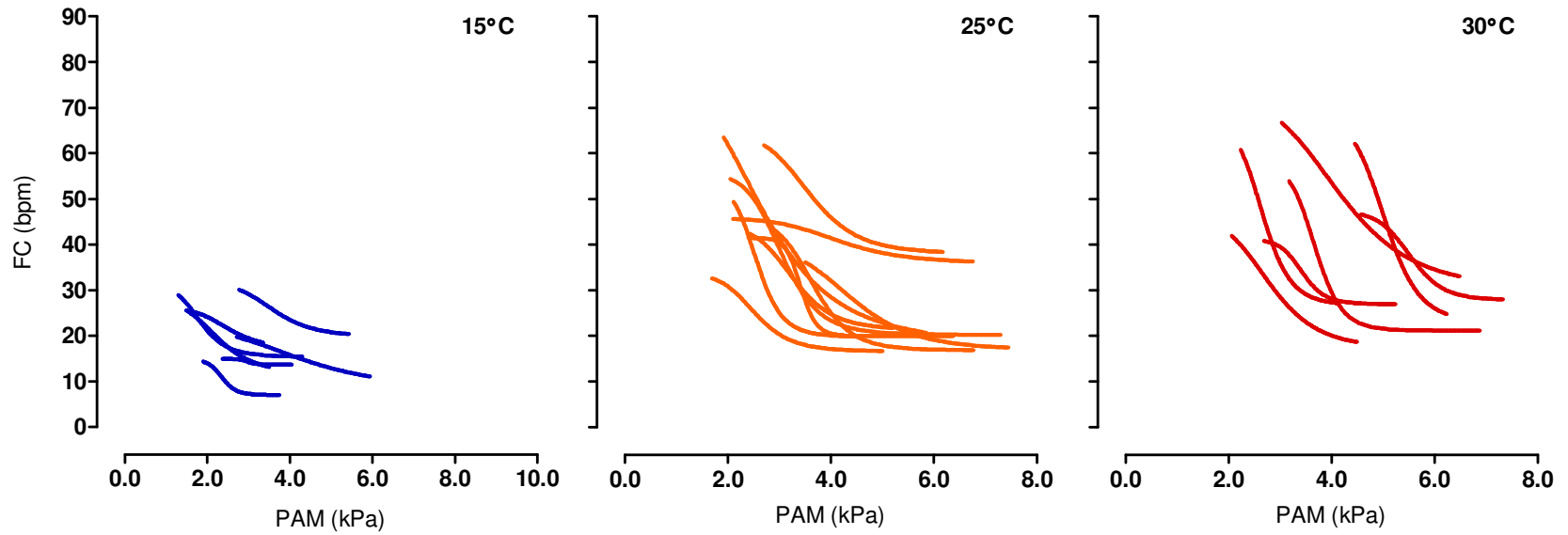


Figura 3: Curvas barorreflexas individuais obtidas à 15, 25 e 30°C. Curvas barorreflexas de cada animal nas temperaturas de 15, 25 e 30°C ($N = 7-10$) obtidas após mudanças na pressão arterial (PA) induzida farmacologicamente com fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS) no sapo cururu *Rhinella schneideri*.

Na figura 4 é mostrada as curvas médias do barorreflexo da FC geradas a partir de todas as curvas individuais que estão representadas na figura 3 a 15, 25 e 30°C. Se tomarmos como ponto de partida a temperatura de 25°C, para o intervalo térmico de 25 a 15°C é possível ver uma atenuação da resposta barorreflexa de FC por meio do deslocamento da curva para a esquerda e para baixo. Além disso, houve uma redução na FC mínima e máxima em 40% ($F_{(2, 21)} = 9,736$; $P = 0,005$) e 52% ($F_{(2, 21)} = 17,467$; $P < 0,001$), respectivamente, sendo que a amplitude de FC foi diminuída em 62% ($F_{(2, 21)} = 7,862$; $P = 0,013$; Tabela 1). O ganho máximo foi 63% menor a 15 ($F_{(2, 21)} = 6,528$; $P = 0,035$) em comparação com 25°C enquanto o ganho máximo normalizado foi 54% menor a 15°C, porém, este não foi diferente para o intervalo térmico de 25-15°C (Tabela 1). A PAM no ponto médio da amplitude de FC (PAM₅₀) não foi afetada a 15°C comparado a temperatura de 25°C (Tabela 1). Nos animais expostos a 30°C, a curva barorreflexa de FC foi movida ligeiramente para cima e para a direita em relação a curva a 25°C (Figura 4). Porém, nenhuma diferença para as variáveis barorreflexas derivadas da curva sigmoide referente ao intervalo térmico de 25 a 30°C foi observada (Tabela 1). Mesmo assim, se considerarmos o intervalo de temperatura entre 15 e 30°C, é possível observar que as variáveis barorreflexas como as FCs mínima e máxima aumentaram cerca de 86% ($F_{(2, 21)} = 9,736$; $P = 0,002$) e 140% ($F_{(2, 21)} = 17,467$; $P < 0,001$), respectivamente. A amplitude de FC, o ganho máximo e o ganho máximo normalizado aumentaram cerca de 206% ($F_{(2, 21)} = 7,862$; $P = 0,003$), 235% ($F_{(2, 21)} = 6,528$; $P < 0,006$) e 160% ($F_{(2, 21)} = 4,105$; $P = 0,034$), respectivamente (Tabela 1), enquanto a PAM₅₀ aumentou apenas 38%, não apresentando diferença entre os extremos de temperatura.

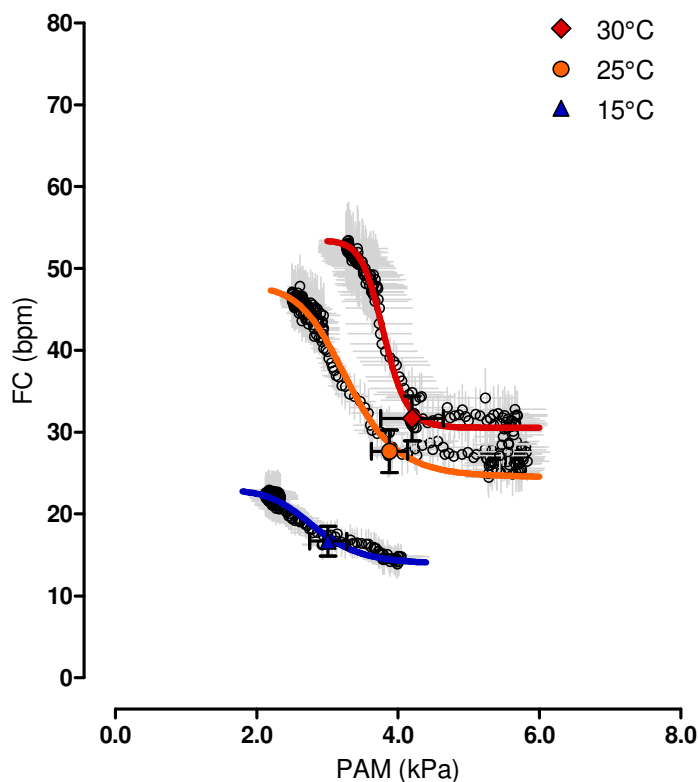


Figura 4: Curvas barorreflexas médias no sapo cururu *Rhinella schneideri* obtidas a 15, 25, e 30°C. A relação entre pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram geradas a partir dos valores médios das variáveis da curva para cada animal em cada temperatura (veja Tabela 1). O triângulo azul (15°C), o círculo laranja (25°C), e o losango vermelho (35°C) de cada curva representam a FC e a PAM basais dos animais em cada temperatura. $N = 7-10$. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

3.5 Efeito do bloqueio autonômico total sobre as respostas barorreflexas à FE e ao NPS

A figura 5 mostra os dados de efeito do bloqueio autonômico realizado com atropina e sotalol nas respostas cardiovasculares à FE e ao NPS a 25°C no sapo *R. schneideri*. É possível observar que a alteração reflexa de taquicardia expressa como delta de FC frente a hipotensão foi atenuada pelo bloqueio autonômico total ($F_{(2, 22)} = 115,664$; $P < 0,001$), assim como a discreta bradicardia reflexa, expressa como delta de FC, induzida pela hipertensão com FE ($F_{(2, 22)} = 22,448$; $P < 0,006$)

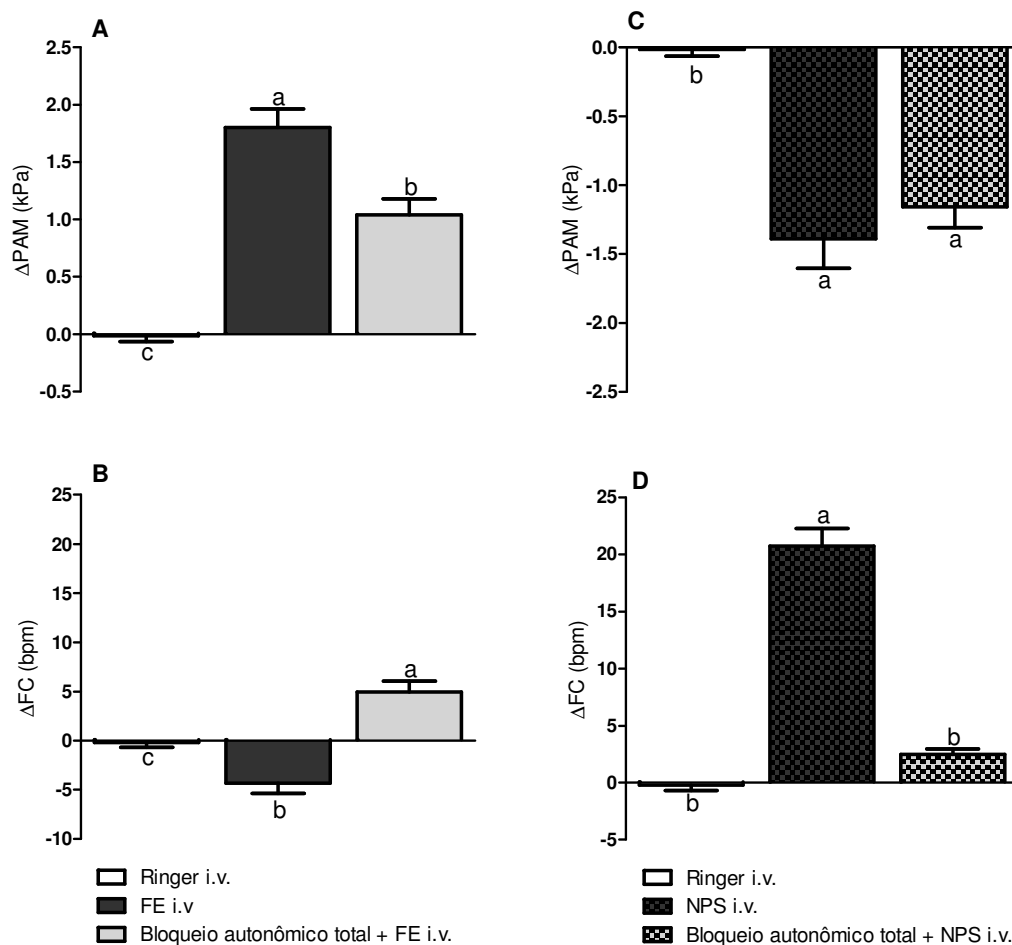


Figura 5: Efeito da manipulação farmacológica sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) no sapo cururu *Rhinella schneideri* antes e após o bloqueio autônômico total. Alterações na pressão arterial média (ΔPAM ; A e C) e frequência cardíaca (ΔFC ; B e D) causadas pela infusão intravenosa de Ringer (veículo), fenilefrina (FE; $60 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e nitroprussiato de sódio (NPS; $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$) antes e após o bloqueio autônômico total com atropina ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) mais sotalol ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) a 25°C no sapo cururu *Rhinella schneideri*. Valores indicados por letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$); $N = 5-10$. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve pela primeira vez o efeito da temperatura na regulação barorreflexa da FC no sapo *R. schneideri*. Em contraste com a literatura vigente sobre a regulação barorreflexa em anfíbios anuros, os dados do presente estudo são consistentes com uma vigorosa resposta reflexa de FC primariamente contra eventos de hipotensão do que de hipertensão, independente da temperatura testada, 15, 25 ou 30°C.

4.1 Crítica ao método

O uso de fármacos vasoativos para alterar a resistência vascular periférica é um dos métodos mais comuns utilizados para o estudo da sensibilidade barorreflexa em vertebrados. Entretanto, esta metodologia apresenta algumas limitações: só é possível avaliar o ramo cardíaco da resposta barorreflexa (resposta reflexa de FC). Apesar desta desvantagem, o método farmacológico tem a vantagem de estimular todas as regiões barorreceptoras, o que pode ser muito importante se considerarmos que os anfíbios apresentam três regiões barorreceptoras distintas, localizadas nos arcos aórticos, nas artérias carótidas e nas artérias pulmocutâneas (APCs) (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000; ISHII, et al., 1985; KUSAKABE, 2002; MILLARD e MOALLI, 1980; VAN VLIET e WEST, 1987a,b). O fármaco fenilefrina é amplamente utilizada no estudo do barorreflexo em mamíferos (MASSETT, et al., 2000; SABHARWAL, et al., 2004), bem como em outros vertebrados, como os anfíbios (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000; MILLARD e MOALLI, 1980) e os répteis (ALTIMIRAS, et al., 1998; BERGER, et al., 1980; CROSSLEY, et al., 2003; HAGENSEN, et al., 2010; MILLARD e MOALLI, 1980). No entanto, estudos anteriores têm sugerido que a FE pode interferir com a sensibilidade barorreflexa por exercer um pequeno efeito cronotrópico positivo no coração de mamíferos (WILLIAMSON, et al., 1994). Assim, a ausência de uma bradicardia reflexa, ou uma resposta mínima, em nossos sapos (Figura 2 e 5) pode sugerir um efeito cronotrópico positivo da FE no coração destes animais, mascarando assim a resposta reflexa decorrente da hipertensão. No caso dos anfíbios anuros, alguns estudos tem demonstrado uma pequena ou nenhuma redução reflexa de FC no sapo *R. schneideri* (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000), na rã aquática *Xenopus laevis* (HEDRICK, et al., 2015) e no sapo *Rhinella marina* (SMITH, et al., 1981); entretanto, em outros estudos foi possível observar um efeito um pouco mais acentuado sobre a FC na rã-touro americana *Lithobates catesbeianus* (HEDRICK, et al., 2015; HERMAN e SANDOVAL, 1983; MILLARD e MOALLI, 1980; ZENA, et al., 2013) e no sapo *Rhinella marina* (HEDRICK, et

al., 2015). Ainda assim, os valores de bradicardia reflexa observados nesses estudos estavam aquém dos valores de taquicardia reflexa induzida pela hipotensão (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000; HEDRICK, et al., 2015). Em estudo anterior de nosso laboratório, foi mostrada uma significativa bradicardia reflexa (redução em 10 bpm) após hipertensão induzida por injeção intravenosa de FE ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; com aumento na PAM de $\sim 1,33 \text{ kPa} = 10 \text{ mmHg}$) na rã-touro americana (ZENA, et al., 2013). Desta forma, os resultados contrastantes encontrados na literatura podem representar diferenças específicas para cada espécie de anuro estudo. É importante ressaltar que os dados do presente estudo foram publicados em 2015 (veja Anexo I) e um estudo realizado por Hedrick e colaboradores (2015) veio a corroborar nossos dados, descrevendo o estudo da função barorreflexa da FC em outras três espécies de anuros representativos de diferentes ambientes (*R. marina*, *L. catesbeianus* e *X. laevis*, um terrestre, um semiaquático, e um aquático, respectivamente). Estes dados também mostram uma pronunciada resposta reflexa de FC frente à hipotensão em comparação as respostas de bradicardia evocadas por eventos hipertensivos de similar magnitude.

4.2 Efeito da temperatura sobre a atividade barorreflexa no sapo *R. schneideri*

Vertebrados ectotérmicos estão sujeitos a flutuações de Tc naturalmente, podendo evitar danos potenciais decorrentes de temperaturas extremas por meio da termorregulação comportamental: caracterizada pela alternância entre ambientes mais quentes ou mais frios de modo a ganhar ou perder calor (BÍCEGO, et al., 2007; LILLYWHITE, 1970). Em um gradiente térmico com variação de temperatura entre 10 e 40°C, o sapo *R. schneideri* apresenta Tc de preferência entre 23 e 27°C (BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001; GUERRA, et al., 2008). Os padrões demográficos no campo para esta espécie de sapo são muitas vezes dependentes de fatores climáticos, tais como a pluviosidade e a temperatura ambiente (VASCONCELLOS e COLLI, 2009). Apesar da temperatura ambiente máxima no sudeste brasileiro atingir valores acima de 35°C durante o verão (SÃO PAULO, 2016), as Tcs observadas para esta espécie de sapo mantida em cativeiro (em recinto semi-natural) podem variar de $\sim 13\text{--}17^\circ\text{C}$ (mínima) a $\sim 27\text{--}31^\circ\text{C}$ (máxima) dependendo da estação do ano nesta mesma região (NORONHA-DE-SOUZA, et al., 2015).

No sapo *R. schneideri*, a curva de sensibilidade barorreflexa apresenta posições distintas para a relação PAM-FC de acordo com a temperatura. Se partirmos da temperatura de 25°C podemos observar um deslocamento da curva para baixo e para a esquerda para o intervalo térmico de 25 a 15°C, enquanto uma mudança de posição na curva também pode ser

observada quando o intervalo de temperatura considerado passa a ser de 25 a 30°C, deslocando a curva para cima e para a direita (Figura 4). Se observarmos os valores de Q_{10} para algumas das variáveis barorreflexas, tais como a amplitude de FC, o ganho máximo, e o ganho máximo normalizado para o intervalo térmico de 25-15°C temos os seguintes valores: 8.3 ± 6.1 , 3.7 ± 1.7 , e 1.9 ± 0.9 , respectivamente. Sendo que para o intervalo térmico de 25 a 30°C temos que os valores de Q_{10} são: 2.3 ± 0.4 , 4.1 ± 2.1 , e 2.1 ± 0.8 , respectivamente. Estes valores estão em contraste com os valores de Q_{10} para a PAM₅₀, a qual apresentou pequena dependência térmica para ambos os intervalos de temperatura (15–25°C: $Q_{10} = 1.1 \pm 0.1$; 25–30°C: $Q_{10} = 1.5 \pm 0.4$). Assim, nossos dados estão de acordo com a literatura demonstrando uma maior dependência térmica para os valores de FC, e conseqüentemente as variáveis do barorreflexo que apresentam a FC associada, em comparação com os valores de PAM relatados para anfíbios e répteis (BÍCEGO-NAHAS e BRANCO, 1999; LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978; OVERGAARD, et al., 2012; ROCHA e BRANCO, 1998). Como já visto para muitos vertebrados ectotérmicos, pequena ou nenhuma alteração da PAM pode refletir alterações de resistência vascular periférica a medida que a temperatura aumenta, causando uma vasodilatação generalizada (GALLI, et al., 2004; LILLYWHITE e SEYMOUR, 1978; OVERGAARD, et al., 2012; STINNER, 1987). É importante levar em consideração que em nossos experimentos preliminares, alguns animais foram expostos a temperatura de 35°C, no entanto o pico de hipertensão induzido pelas infusões de FE a essa temperatura acarretaram em um padrão de FC caracterizado por um curto intervalo bradicárdico intercalado por um padrão de PAP em que a FC era semelhante aos valores de pré-infusão, ou seja, sem alteração de FC, ou mesmo situações em que a FC era até maior que os valores pré-infusão (leve taquicardia). Desta forma, o estudo do barorreflexo para a técnica de infusão em rampa mostrou-se inviável para esta temperatura dificultando o ajuste da curva com os dados obtidos. De acordo com Courtice (1990), o aumento de temperatura ao redor de 33-37°C diminui a efetividade vagal em reduzir a FC no sapo *R. marina* (espécie filogeneticamente relacionada ao sapo *R. schneideri*; MACIEL, et al., 2010). Assim, essa reduzida efetividade vagal em altas temperaturas pode ser causada por um aumento da atividade da colinesterase, enzima que degrada a acetilcolina, fazendo com que o intervalo bradicárdico seja curto, diminuindo a capacidade do nervo vago em agir sobre o nódulo sinoatrial por tempo prolongado (COURTICE, 1990).

É possível ver que a temperatura também afetou a latência das respostas cardiovasculares às infusões de FE e NPS. A 15°C, o efeito da FE levou cerca de 4 minutos para atingir a máxima resposta hipertensiva em contraste com apenas 1 minuto para o máximo

efeito hipertensivo ser atingido nas temperaturas de 25 e 30°C (Figura 2A). Para a hipotensão por NPS, o máximo efeito a 15°C foi atingido com 2,5 minutos, um minuto a mais do que o máximo efeito hipotensivo para as temperaturas mais altas (25 e 30°C) (Figura 2C). Alterações na reatividade dos vasos sanguíneos a tratamentos farmacológicos foram anteriormente observadas durante hipertermia em ratos (MASSETT, et al., 1998; MASSETT, et al., 2000). De fato, ambas hipotermia e hipertermia podem mudar a responsividade α -adrenérgica dos vasos sanguíneos em mamíferos (IVES, et al., 2011). Apesar dos possíveis efeitos térmicos sobre os componentes centrais e periféricos dos reflexos cardiovasculares nos nossos sapos, a reatividade dos vasos sanguíneos à FE e ao NPS também pode ser afetada pela temperatura, o que vai de encontro com dados da literatura relativos a magnitude da ação de agonistas α -adrenérgicos no sistema arterial de *L. catesbeianus* (HERMAN e MATA, 1985).

Separação completa entre as circulações sistêmicas e pulmonar é observada apenas em mamíferos e aves, e por isso, as pressões nos capilares pulmonares podem ser mantidas baixas o suficiente para evitar lesões do tecido pulmonar (WEST, 2009). Ao longo do curso evolutivo, os crocodilianos são considerados os únicos ectotérmicos com separação anatômica completa dos ventrículos. Nos animais com quatro câmaras cardíacas (dois átrios e dois ventrículos), tal como o rato e o coelho (CRESTANI, et al., 2010; MURAKAMI, et al., 1998), o pombo (LUCITTI e HEDRICK, 2006), e os crocodilianos, jacaré-americano (*Alligator mississippiensis*), jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) e o crocodilo-de-água-salgada (*Crocodylus porosus*) (ALTIMIRAS, et al., 1998; CROSSLEY, et al., 2003; HAGENSEN, et al., 2010), a resposta reflexa de FC obtida frente à quedas de PA (taquicardia) é mais pronunciada do que o reflexo de bradycardia decorrente da hipertensão. Em contraste, o coração dos anfíbios por apresentar ventrículo único e portanto não havendo divisão entre as pressões sistêmica e pulmonar, pode apresentar alta pressão sobre os capilares pulmonares, resultando em lesões capilares deste órgão (VAN VLIET e WEST, 1989). Neste caso, mudanças na resistência arterial pulmonar poderiam ser ajustadas por meio da inervação vagal que existe nas APCs, regulando o fluxo sanguíneo pulmonar e por conseguinte o *shunt* cardíaco (EMILIO e SHELTON, 1972; de SAINT-AUBAIN e WINGSTRAND, 1979; GAMPERL, et al., 1999; LANGILLE e JONES, 1977). A estimulação elétrica do nervo recorrente laríngeo, na qual as aferências barorreceptoras da APC estão contidas, é capaz de aumentar a resistência da APC por meio da contração da musculatura lisa presente no esfíncter deste vaso em cerca de 76%, além de causar reduções na pressão arterial das APCs (VAN VLIET e WEST, 1986). Ademais, a desnervação dos barorreceptores das APCs leva a um aumento transiente na PA sistêmica, FC e fluxo sanguíneo da artéria pulmonar sugerindo

que estes são tonicamente ativos, mas não essenciais para a regulação a longo prazo da PA (HOFFMANN e de SOUZA, 1982; SMITS, et al., 1986; SMITS, 1994; VAN VLIET e WEST, 1989). Mesmo em condições basais a taxa de filtração transcáprilar pulmonar no sapo *R. marina* é cerca de $0,74 \pm 0,41 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, ou seja, esta é elevada em pelo menos treze ordens de magnitude em relação ao fluxo linfático pulmonar encontrado nos mamíferos ($0,0017$ a $0,0055 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (COURTICE, 1963; ERDMANN, et al., 1975; HUMPHREYS, et al., 1967). Assim, em situações de elevada pressão na circulação pulmonar, em que a filtração transcáprilar pulmonar pode atingir valores extremamente elevados ($7,77 \pm 2,09 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) decorrentes da desnervação bilateral do nervo recorrente laríngeo, os riscos potenciais para a ocorrência de um edema pulmonar poderiam ser contrabalanceados pela existência de uma eficiente produção de fator natriurético atrial nos pulmões do sapo *R. schneideri* (GLASS, et al., 1996), cuja aumentada produção nos pulmões de mamíferos está relacionada a prevenção de edema pulmonar (GUTKOWSKA, et al., 1989). Adicionalmente, a presença de uma eficiente mobilização linfática pulmonar poderia estar envolvida na proteção da delicada microvascularização do pulmão contra alterações bruscas de fluxo sanguíneo nos anfíbios, evitando a ocorrência de edema pulmonar como previamente descrito por Smits (1994) para o sapo *R. marina*.

Em estudo anterior, Van Vliet e West (1989) sugerem que os anfíbios anuros (*e.g.* *R. marina*) são capazes primariamente de regular oscilações da PA sistêmica durante eventos de hipertensão em detrimento da proteção da microvascularização pulmonar. Entretanto, Bianchi-da-Silva e colaboradores (2000) em seus estudos sobre a regulação barorreflexa da FC no sapo *R. schneideri* mostraram uma significativa taquicardia reflexa para eventos de queda de PA, na qual foi associada a participação dos barorreceptores dos arcos aórticos, visto que a resposta de taquicardia é inibida pela desnervação dos mesmos, mas não dos barorreceptores da APC. Nas rãs *L. catesbeianus* e *X. laevis*, apesar do fato da FE induzir hipertensão com uma discreta bradicardia reflexa (HEDRICK, et al., 2015; ZENA, et al., 2013), esta é de menor magnitude comparada a taquicardia reflexa induzida pela hipotensão (causada por NPS) (HEDRICK, et al., 2015), indicando que oscilações de PA são defendidas primariamente para a hipotensão em ambas as espécies quando consideramos a resposta de FC da regulação barorreflexa. Nossos dados são claramente consistentes com uma vigorosa resposta de FC para queda de PA ao invés do aumento da PA no sapo *R. schneideri*, cuja resposta de sensibilidade barorreflexa é mais pronunciada para o intervalo térmico de 25–30°C em comparação com 15°C. A resposta predominante para a hipotensão pode ser concluída com base no posicionamento dos valores de PAM e FC basal do animal na porção

final, acima dos valores de PAM_{50} da curva barorreflexa, e que também corresponde a localização do ganho máximo da resposta (Figura 4 e Tabela 1). Nossos resultados, e as evidências experimentais para uma reduzida resistência sistêmica e especialmente pulmonar no sapo *R. marina* a 30°C em comparação com 20 e 10°C (HEDRICK, et al., 1999) dão suporte a ideia de que as respostas barorreflexas a hipotensão tem maior contribuição em evitar reduções adicionais na resistência vascular quando os anfíbios anuros estão expostos à elevada temperatura. Adicionalmente, a ausência de uma significativa bradicardia reflexa em todas as temperaturas testadas (Figuras 2 e 4) poderia estar acompanhada de uma atividade vagal considerável sobre a musculatura lisa do esfíncter das APCs contraindo a mesma o que reduziria a PA na circulação pulmonar (de SAINT-AUBAIN e WINGSTRAND, 1979; EMILIO e SHELTON, 1972; GAMPERL, et al., 1999; LANGILLE e JONES, 1977). Pelo menos no sapo *R. marina* mantido a 25°C, Gamperl e colaboradores (1999) mostraram um sustentado aumento no fluxo sanguíneo da APC em cerca de 100% em relação aos valores basais (de $30,3 \pm 3,8$ para $63,8 \pm 7,4 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) e apenas um discreto aumento de FC (de $49,3 \pm 6,5$ para $53,4 \pm 5,8 \text{ min}^{-1}$) decorrentes do bloqueio muscarínico com atropina. Um reduzido aumento de FC após bloqueio dos receptores muscarínicos cardíacos observado por esses autores pode sugerir um reduzido tônus parassimpático sobre o coração, visto que a FC de repouso nesses animais já se encontrava relativamente alta. Em todo caso, estes autores mostraram redução no *shunt* intracardíaco (fração de sangue venoso que é recirculada na circulação sistêmica) após injeção com atropina, o que acarretou em aumento de fluxo sanguíneo para o circuito pulmonar em relação ao sistêmico, indicando assim a existência de um forte tônus colinérgico sobre as APCs de seus sapos antes do bloqueio com atropina. A existência de um controle vagal diferenciado para o coração e para as APCs durante eventos de hipertensão ainda é desconhecida, necessitando de estudos complementares para maiores esclarecimentos.

Como conclusão, o presente estudo mostra evidências de que a sensibilidade barorreflexa no sapo *R. schneideri* é dependente da temperatura, deslocando a curva barorreflexa de FC para cima e para a direita considerando o intervalo térmico de 15 a 30°C. Estas respostas compensatórias de FC podem ser muito importantes para uma espécie de bufonídeo que é encontrada em vários habitats como o Chaco, Cerrado e regiões de Mata Atlântica na América do Sul, além de ser encontrada facilmente em áreas abertas e urbanas; todos ambientes com variação de temperatura de ordem diária e anual. Adicionalmente, nossos dados estão de acordo com a literatura anterior para o sapo *R. schneideri* (BIANCHI-DASILVA, et al., 2000) e que indicam uma compensação reflexa de FC mais pronunciada

contra eventos de hipotensão em relação a eventos de hipertensão, como acontece com os crocodilianos, aves e mamíferos. Esta resposta parece proporcionar uma adequada disponibilização de oxigênio as demandas metabólicas do animal, principalmente em condições de elevada temperatura. Em contraste, uma acentuada resposta barorreflexa de FC para situações de hipertensão previamente sugerida por Van Vliet e West (1989) no sapo *R. marina* parece estar em desacordo com dados da literatura recente: que mostram que o sapo cururu (presente estudo; *R. schneideri*), o sapo-da-cana (*R. marina*), a rã-touro-americana (*L. catesbeianus*) e a rã-de-unha-africana (*X. laevis*) (HEDRICK, et al., 2015), todos apresentam resposta reflexa de FC muito acentuada contra eventos de hipotensão. Desta forma, a proteção da delicada microvascularização pulmonar frente aos aumentos de PA e a formação de edema pulmonar sugeridas por Van Vliet e West (1989) parecem ser compensadas pela existência de um eficiente sistema linfático e pela produção de fator natriurético atrial no tecido pulmonar, cuja concentração é aproximadamente duas vezes maior que no tecido pulmonar de um mamífero de tamanho similar (GUTKOWSKA, et al., 1989).

Capítulo II

**A regulação barorreflexa afeta a
ventilação no sapo cururu, *Rhinella
schneideri***

RESUMO

O controle efetivo da pressão arterial (PA) a curto prazo em anfíbios anuros se dá por ajustes da frequência cardíaca (FC), resistência vascular periférica e frequência dos corações linfáticos. A ventilação pulmonar nos anuros está diretamente associada a homeostase do volume sanguíneo por meio da facilitação do transporte de linfa para o sistema cardiovascular. No presente estudo nos hipotetizamos que o barorreflexo arterial modula a ventilação pulmonar no sapo cururu *Rhinella schneideri* e que esta relação é dependente da temperatura. Hipotensão (nitroprussiato de sódio) e hipertensão (fenilefrina) induzidas farmacologicamente aumentaram a ventilação (25°C: 248,7±25,7; 35°C: 351,5±50,2 ml kg⁻¹ min⁻¹) e diminuíram a ventilação (25°C: 9,0±6,6; 35°C: 50,7±15,6 ml kg⁻¹ min⁻¹), respectivamente, relativo aos valores controle de injeção de Ringer (25°C: 78,1±17,0; 35°C: 137,7±15,5 ml kg⁻¹ min⁻¹) principalmente por ajustes na frequência respiratória. A sensibilidade da resposta ventilatória a alteração de PA foi maior durante a hipotensão em relação a hipertensão (25°C: -97,6 ± 17,1 vs. -23,6 ± 6,0 rpm kPa⁻¹; 35°C: -141,0 ± 29,5 vs. -28,7 ± 6,4 rpm kPa⁻¹, respectivamente), enquanto a temperatura não apresentou efeito sobre a sensibilidade ventilatória. A hiperóxia (30%; 25°C) diminuiu a ventilação, mas não atenuou a resposta ventilatória a hipotensão, indicando uma resposta independente dos quimiorreceptores periféricos. Embora existem dados prévios mostrando um aumento na sensibilidade barorreflexa de 15 a 30°C nesta espécie, aumentos adicionais na temperatura (35°C) diminuíram o ganho da resposta barorreflexa de FC (3,99 ± 0,73 vs. 2,31 ± 0,60 unidades normalizadas). Portanto, apesar da função da ventilação pulmonar em corresponder a disponibilidade de O₂ a demanda metabólica em altas temperaturas em anuros, também apresenta participação na regulação da PA, independente da temperatura, possivelmente devido a uma interação entre o barorreflexo e as áreas respiratórias no sistema nervosa central, como previamente sugerido para os mamíferos.

Palavras-chave: barorreceptores; quimiorreceptores; ventilação pulmonar; hiperóxia; bloqueio autonômico; anfíbios anuros

ABSTRACT

Anurans regulate short-term oscillations in blood pressure (BP) through changes in heart rate (f_H), vascular resistance and lymph hearts frequency. Lung ventilation in anurans is linked to blood volume homeostasis by facilitating lymph movement back into the cardiovascular system. We hypothesized that the arterial baroreflex modulates pulmonary ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri* and that this relationship is temperature-dependent. Pharmacologically induced hypotension (sodium nitroprusside) and hypertension (phenylephrine) evoked increases in ventilation (25°C: 248.7 ± 25.7 ; 35°C: 351.5 ± 50.2 ml kg⁻¹ min⁻¹) and decreases in ventilation (25°C: 9.0 ± 6.6 ; 35°C: 50.7 ± 15.6 ml kg⁻¹ min⁻¹), respectively, relative to control values from Ringer injection (25°C: 78.1 ± 17.0 ; 35°C: 137.7 ± 15.5 ml kg⁻¹ min⁻¹) mainly by adjusting breathing frequency. The sensitivity of the ventilatory response to blood pressure changes was higher during hypotension than hypertension (25°C: -97.6 ± 17.1 vs. -23.6 ± 6.0 breaths min⁻¹ kPa⁻¹; 35°C: -141.0 ± 29.5 vs. -28.7 ± 6.4 breaths min⁻¹ kPa⁻¹, respectively), while temperature had no effect on those sensitivities. Hyperoxia (30%; 25°C) diminished ventilation, but did not abolish the ventilatory response to hypotension, indicating a response independent of peripheral chemoreceptors. Although there are previous data showing increased f_H baroreflex sensitivity from 15 to 30°C in this species, further increases in temperature (35°C) diminished f_H baroreflex gain ($3,99 \pm 0,73$ vs. $2,31 \pm 0,60$ units normalized). Therefore, besides a pulmonary ventilation role in matching O₂ delivery to demand at higher temperatures in anurans, it also plays a role in BP regulation, independent of temperature, possibly owing to an interaction between baroreflex and respiratory areas in the brain, as previously suggested for mammals.

Keywords: baroreceptors; chemoreceptors; lung ventilation; hyperoxia; autonomic blockade; anuran amphibians

LISTA DE ABREVIACOES

FC	frequênca cardíaca
FE	fenilefrina
F ₁ O ₂	frao de oxigênco no ar inspirado
FR	frequênca respiratória
NPS	nitroprussiato de sdo
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial media
P _a O ₂	pressão parcial arterial de oxigênco
PAP	pressão arterial pulsátil
Q ₁₀	efeito da temperatura
SNC	sistema nervosa central
V _C	volume corrente
\dot{V}_E	ventilação total

1 INTRODUÇÃO

Dentre os vertebrados, os mecanismos de retroalimentação negativa que determinam a regulação da pressão arterial (PA) de curto-prazo são dependentes de macanorreceptores (barorreceptores) localizados na parede do sistema arterial e que detectam flutuações na PA. A informação barorreceptora aferente é transmitida e integrada no sistema nervoso central (SNC), em que a capacidade de ajuste pelo barorreflexo é alcançada alterando-se reflexivamente a frequência cardíaca (FC) e a resistência vascular (ALTIMIRAS, et al., 1998; BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000; SANDBLOM e AXELSSON, 2005; HEDRICK, et al., 2015; ZENA, et al., 2015; ZENA, et al., 2016). Além das respostas cardiovasculares, o barorreflexo também influencia a função respiratória nos mamíferos (MCMULLAN e PILOWSKY, 2010). Embora existam dados sugestivos para a modulação barorreflexa sobre o sistema respiratório em crocodilianos e anfíbios (ALTIMIRAS, et al., 1998; HEDRICK et al., 2013; VAN VLIET e WEST, 1986), ainda não existem evidências diretas do componente respiratório na regulação reflexa da PA em vertebrados não mamíferos.

Os mecanismos envolvidos na homeostase cardiorrespiratória para o monitoramento da PA e dos gases sanguíneos envolvem informações sensoriais dos barorreceptores e quimiorreceptores, respectivamente, localizados nos grandes vasos que emergem do coração: as artérias pulmocutâneas (APCs), os arcos aórticos, e as artérias carotídeas (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000; REYES, et al., 2014). Enquanto a identidade destes receptores já foi descrita anteriormente na literatura, a relativa contribuição destes para o controle cardiorrespiratório ainda se encontra em estudo. A homeostase da pressão arterial parcial de oxigênio é mantida pela regulação da respiração pelos quimiorreceptores periféricos (BRANCO e GLASS, 1995; WANG, et al., 1994), enquanto a regulação da PA pelos barorreceptores é ajustada por alterações na resistência vascular periférica e FC. Adicionalmente, anuros apresentam corações linfáticos (órgãos pulsáteis) que estão sob controle barorreceptor e que bombeiam linfa de volta ao sistema venoso (CROSSLEY e HILLMAN, 1999).

Apesar de sua significativa função nas trocas gasosas, os pulmões dos anfíbios estão também associados a algumas funções ecofisiológicas, incluindo vocalização, fluatibilidade e comportamento defensivo (HILLMAN, et al., 2010; JARED, et al., 2009). Adicionalmente, a ventilação pulmonar, tem sido diretamente associada ao movimento linfático vertical, e conseqüentemente à homeostase do volume sanguíneo nos anuros (HEDRICK, et al., 2007; HILLMAN, et al., 2010). Por meio da alteração de pressão e volume dos sacos linfáticos

subcutâneos, a ventilação pulmonar nos anfíbios anuros facilita o movimento linfático por atuar contra as forças gravitacionais, direcionando a linfa para os corações linfáticos dorsais, e assim prevenindo o acúmulo de linfa em regiões ventrais do corpo (HEDRICK, et al., 2013). Como componentes do sistema linfático nos anuros, os corações linfáticos dorsais anteriores e posteriores participam na regulação do volume sanguíneo bombeando o fluido linfático gerado por meio de uma aumentada taxa de filtração transcápsular de volta ao sistema venoso (CROSSLEY e HILLMAN, 1999). Isto é evidente se considerarmos a extraordinária habilidade do sapo *Rhinella marina* em compensar perdas agudas de sangue (78% do volume sanguíneo inicial), enquanto a destruição de ambos corações linfáticos, anterior e posterior, criticamente prejudica a habilidade de compensar eventos hemorrágicos, levando a uma hemoconcentração e morte dos indivíduos em poucos dias (BAUSTIAN, 1988).

O sapo cururu *Rhinella schneideri* é uma espécie de bufonídeo amplamente distribuído por habitats naturais na América do Sul (Chaco, Cerrado, e Mata Atlântica), e é também encontrado em áreas urbanas. Apesar da temperatura diária máxima do ar atingir valores acima de 35°C durante o verão no sudeste do Brasil (SÃO PAULO, 2016), evidências experimentais têm mostrado que a temperatura corporal de preferência da espécie é ao redor de 23 a 27°C (BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001; GUERRA, et al., 2008; NORONHA-DE-SOUZA, et al., 2015). Assim, com o objetivo de evitar danos potenciais devido a temperaturas ambientais extremas, os anfíbios tendem a procurar locais que mantêm umidade e temperatura apropriadas (MOREIRA, et al., 2009; NORONHA-DE-SOUZA, et al., 2015).

Baseado na função desempenhada pelos pulmões na homeostase do volume sanguíneo em anuros (CROSSLEY e HILLMAN, 1999; HEDRICK, et al., 2007; HEDRICK, et al., 2013; HILLMAN, et al., 2010) e na distribuição de oxigênio de acordo com a demanda metabólica do animal, nós testamos a hipótese de que a ventilação pulmonar contribui na resposta barorreflexa das alterações de PA no sapo cururu *R. schneideri*, e que este efeito é modulado pelas alterações de temperatura. Para isto, a função barorreflexa foi estudada por meio de intervenções farmacológicas na PA (método de Oxford) à 25 e 35°C. A resposta de FC reflexa foi avaliada em associação com a ventilação, a frequência respiratória e o volume corrente. Considerando que os quimiorreceptores periféricos principalmente ajustam a ventilação em resposta as alterações na pressão parcial arterial de oxigênio (BRANCO e GLASS, 1995; WANG, et al., 1994), os sapos foram expostos à hiperóxia [fração de oxigênio no ar inspirado ($F_{I}O_2$)] em consideração à possível influência dos quimiorreceptores periféricos nas respostas ventilatórias durante a hipotensão a 25°C. Além disso, as respostas ventilatórias a hipotensão foram também avaliadas após o bloqueio autonômico total.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Sapos da espécie *Rhinella schneideri* (WERNER, 1894), de ambos os sexos ($159,5 \pm 7,7$ gramas) foram coletados em áreas alagadas na região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil (aproximadamente $21^{\circ} 10' S$ e $47^{\circ} 48' O$) e transportados para o Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP, Jaboticabal, Brasil. Todos os animais foram mantidos a temperatura de $25^{\circ}C$ e ciclo claro/escuro de 12h:12h com livre acesso a água potável e área para descanso. Os animais foram mantidos em baias contendo substrato a base de fibra de coco e com tubos de PVC para esconderijos, e foram mantidos nas condições laboratoriais citadas acima por pelo menos 3 semanas antes do início dos protocolos experimentais. Os animais foram alimentados de duas a três vezes por semana com tenébrios (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*), grilos (*Gryllus sp*) e/ou baratas (*Nauphoeta cinerea*) criados em cativeiro. Os experimentos foram realizados de setembro a março, no qual coincide com a estação de atividade da espécie, estação mais chuvosa do ano (GLASS, et al., 1997; BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001). A coleta dos animais foi aprovada pelo órgão ambiental (SISBIOICMBio/ n. 35484-1), e o estudo foi conduzido sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FCAV-UNESP; Protocolo n. 017204/12).

2.2 Procedimentos cirúrgicos

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados como previamente descrito (ZENA, et al., 2015). Resumidamente, a anestesia foi realizada por meio de imersão em solução aquosa 0,25% de ácido 3-aminobenzóico etil éster (MS-222, Sigma, St. Louis, EUA), tamponado em pH 7,7 com bicarbonato de sódio, por aproximadamente 10 minutos ou até que houvesse perda dos reflexos da córnea. Para as medidas de pressão arterial pulsátil (PAP), uma cânula de polietileno (PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA), preenchida com solução Ringer heparinizada (100 i.u. mL^{-1} heparina) foi oclusivamente inserida na artéria ilíaca, exteriorizada e suturada sobre a pele do animal. O mesmo procedimento foi utilizado para canular a veia femoral (100 i.u. mL^{-1} heparina em solução Ringer) para injeção dos fármacos. Logo após os procedimentos cirúrgicos, os sapos foram tratados com antibiótico (enrofloxacina, Flotril®; Schering-Plough, $5,0 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ s.c.}$) e analgésico (Flunixin Meglumina, Banamine®; Schering-Plough, $1,0 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ s.c.}$) de acordo com doses recomendadas para anfíbios (GENTZ, 2007; SMITH, 2007). Após a recuperação da anestesia, cada animal foi individualmente colocado em uma câmara com temperatura controlada a $25^{\circ}C$

e mantidos nestas condições por 48 h sem interferência externa até o início dos procedimentos experimentais.

2.3 Fármacos

Nitroprussiato de sódio dihidratado (NPS, doador de óxido nítrico), fenilefrina (FE, agonista de receptores α -1 adrenérgicos), sulfato de atropina (antagonista de receptores muscarínicos), e sotalol (antagonista de receptores β -adrenérgicos) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os fármacos foram dissolvidos em solução Ringer para anfíbios (composição em mM: 46,9 NaCl; 21,0 KCl; 2,40 CaCl; 1,29 MgCl; 3,14 NaHCO₃).

2.4 Medidas da pressão arterial (PA) e da ventilação (\dot{V}_E)

A ventilação pulmonar (\dot{V}_E), o volume corrente (V_C) e a frequência respiratória (FR) foram calculadas a partir do registro de respiração de cada animal utilizando o método de pneumotacografia descrito por GLASS et al. (1978). Uma máscara foi construída para cada animal a partir de uma placa de silicone (Bio-Art Equipamentos Odontológicos, São Carlos, Brazil) aquecida sobre um molde da face do animal feito de gesso. O pneumotacógrafo foi acoplado a máscara e posteriormente fixo a face do animal de maneira a permitir as medidas do fluxo de ar pelo pneumotacógrafo continuamente. Existe uma relação direta entre o fluxo laminar e as diferentes pressões através do pneumotacógrafo, a qual foi monitorada por meio de um transdutor diferencial de pressão (MLT141Spirometer, PowerLab System, ADInstruments, Sydney, Austrália) conectado a um sistema de aquisição que inclui um software específico (PowerLab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sydney, Australia). A calibração foi realizada para cada máscara injetando-se volumes de ar de 1, 3 e 5 ml através do pneumotacógrafo utilizando uma seringa graduada. Em todos os casos, a relação entre o sinal elétrico gerado e o volume injetado pôde ser descrita por uma regressão linear cujo coeficiente de determinação (r^2) foi sempre maior que 0,99 para todos os animais (Figura 2). A ventilação foi obtida a partir do produto entre o V_C e a FR ($\dot{V}_E = V_C \times$ FR).

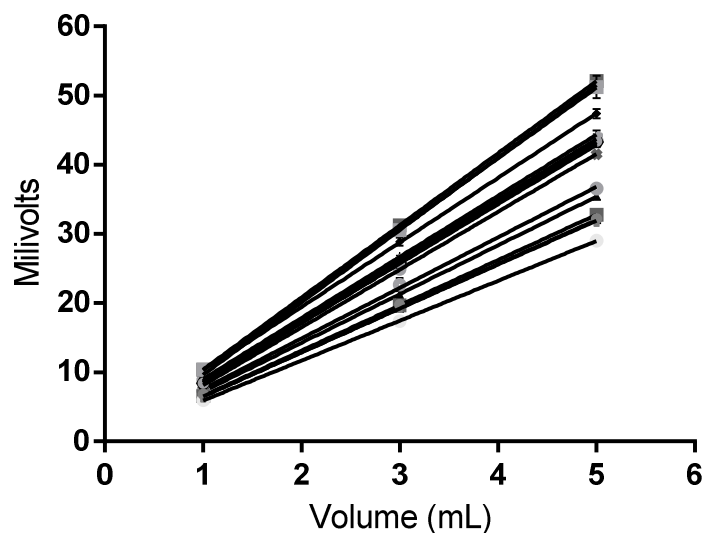


Figura 2: Regressões lineares obtidas a partir da geração do sinal elétrico associado aos volumes conhecidos (1, 3 e 5 mL) utilizados para calibrar individualmente as máscaras acopladas ao pneumotacógrafo ($r^2 > 0.99$; para todas as máscaras).

A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (MLT1199, ADInstruments®, Sydney, Austrália) cuja calibração foi feita por meio de uma coluna de mercúrio. O transdutor foi conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sydney, Austrália) por meio de um amplificador de sinais (FE221, ADInstruments®, Sydney, Austrália). A frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM) foram calculadas a partir do sinal de pressão arterial pulsátil (PAP) e registradas em tempo real usando a ferramenta *cyclic measurements* do Software LabChart.

2.5 Protocolo experimental

Todos os experimentos foram realizados em sapos não anestesiados e sem estarem contidos. Durante os experimentos, os sapos foram acondicionados em câmaras acrílicas mantidas a temperatura experimental de 25 ou 35°C utilizando um banho de circulação externa (PolyScience 9112A11B Programmable Model 9112 Refrigerated Circulator). A máscara contendo o pneumotacógrafo foi fixada a face do animal utilizando um material de impressão em poliéster (Impregum Soft, 3M) 24 h após a cirurgia. Os experimentos foram iniciados 48 h após os procedimentos cirúrgicos e 24 h após a fixação da máscara facial. Para os experimentos na temperatura mais alta, os sapos foram aclimatados a 35°C por pelo menos 6 h, começando em 48 h após a cirurgia. A câmara experimental foi continuamente circulada

com ar ambiente umidificado e a temperatura interna da câmara foi continuamente monitorada por meio de um sensor de temperatura (MLT415/MThermistor temperature sensor, ADInstruments®, Sydney, Austrália). Após 60 minutos do registro basal de FC, PA e fluxo ventilatório, solução Ringer (0.4 mL.kg^{-1}) foi injetada na veia femoral do animal com o objetivo de se verificar qualquer influência do volume injetado nos parâmetros cardiorrespiratórios. Injeções intravenosas seriais de doses crescentes de FE e NPS foram realizadas (veja doses na próxima seção). Todos os parâmetros cardiorrespiratórios foram registrados ao longo de todo o protocolo experimental. Entre cada injeção de fármacos, os parâmetros cardiorrespiratórios foram sempre permitidos retornar a valores similares aos de pré-injeção.

Cinco animais do grupo experimental principal descrito acima foram submetidos ao bloqueio autonômico total na temperatura de 25°C e que foi realizado um dia após os experimentos do barorreflexo. Este protocolo consistiu em injeções intravenosas de um antagonista de receptores β -adrenérgicos, o sotalol ($3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e de antagonista de receptores muscarínicos, a atropina ($3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). As variáveis cardiorrespiratórias foram registradas continuamente nos animais tratados com NPS ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) antes e depois do bloqueio autonômico total.

Outros cinco animais foram submetidos a hiperóxia [fração de oxigênio no ar inspirado ($F_{\text{I}}\text{O}_2$) = 0.30] para identificar qualquer possível envolvimento dos quimiorreceptores periféricos nas respostas ventilatórias aos ajustes de PA. Assim, após aplicar o protocolo de estudo do barorreflexo, os animais foram expostos à mistura gasosa de 30% de O_2 por pelo menos 30 minutos. Após este intervalo, injeção de NPS ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi repetida com o objetivo de identificar as respostas respiratórias à hipotensão em condições hiperóxicas.

2.6 Análise do barorreflexo

As respostas reflexas de FC foram avaliadas alterando a PA por meio de injeções crescentes e seriadas de FE (5, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; causando aumentos de PA) e NPS (5, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; causando reduções de PA) em ambas temperaturas de 25 e 35°C . Os dados de FC foram plotados correspondendo aos respectivos valores de PA obtidos para cada animal em cada temperatura e analisados utilizando de uma função logística sigmoide de quatro parâmetros como descrita previamente por REID (1996):

$$(4) \quad FC = \frac{(A-D)}{1+(PAM/C)^B} + D$$

Onde A é a FC máxima e D é a FC mínima da curva. B é o coeficiente que representa a inclinação da curva (bpm.kPa⁻¹). C é a PAM no ponto médio da amplitude de FC (PAM₅₀). A amplitude do barorreflexo para a FC foi calculado como a diferença entre a FC máxima e mínima (A-D). O ganho máximo (Ganho₅₀; em bpm.kPa⁻¹) da curva, na qual ocorre quando a PAM é igual a C foi determinado tomando a derivada primeira da equação 1 resultando no ganho máximo por meio da equação abaixo:

$$(5) \quad \text{Ganho}_{50} = \frac{-B(A-D)}{4C}$$

O ganho máximo foi então normalizado (unidade normalizada) em relação a PAM e FC basais para cada animal (BERGER, et al., 1980; CROSSLEY, et al., 2003) com o objetivo de estabelecer comparações significativas entre as temperaturas:

$$(6) \quad \text{Ganho}_{50} \text{ normalizado} = \text{Ganho}_{50} \times \left(\frac{PAM}{FC} \right)$$

2.7 Análise dos dados e estatística

Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. O efeito da temperatura sobre as variáveis cardiorrespiratórias e barorreflexas foi analisado por meio de um teste *t* de Student e o teste U de Mann-Whitney para os dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. O efeito das injeções de solução Ringer e dos fármacos FE e NPS sobre a PAM, a FC, a FR, o V_C e a \dot{V}_E a 25 e 35°C foram analisados utilizando-se uma ANOVA de duas vias de medidas repetidas (fatores: drogas e temperatura). Diferentes F_IO₂ (0.21 and 0.30) antes e depois da hipotensão induzida por NPS para a \dot{V}_E e o efeito do bloqueio autonômico total sobre a hipotensão induzida por NPS foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Análises de regressão foram utilizadas para avaliar o efeito da temperatura sobre as relações de PAM/FR e PAM/ \dot{V}_E durante o estímulo de hipotensão e hipertensão e uma ANOVA de duas vias foi utilizada para comparar as inclinações da curva (pressão e temperatura). Adicionalmente, a relação entre PAM e as respostas ventilatórias (FR, V_C e \dot{V}_E) foram agrupadas em categorias de PAM com o objetivo de avaliar a influência da temperatura nestas relações (ANOVA de duas vias; pressão e temperatura). Em todos os casos de análise

por meio de ANOVA, as diferenças entre as médias foram obtidas utilizando um pós-teste de Holm-Šídák e foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. A variância e a normalidade dos dados foram testadas e quando necessário foram transformados adequadamente quando não atendiam aos requisitos da análise paramétrica.

3 RESULTADOS

Pode-se observar na tabela 1 as variáveis cardiorrespiratórias basais médias para os sapos expostos à temperatura de 25 e 35°C. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao efeito da temperatura sobre a PAM ($P = 0,73$), enquanto a FC foi significativamente elevada a 35°C ($P < 0,001$). A temperatura acentuou significativamente os valores basais de \dot{V}_E ($P = 0,001$) principalmente por um aumento nos valores basais de V_C dos sapos ($P = 0,037$).

Tabela 1: Variáveis cardiorrespiratórias basais e do barorreflexo derivadas da curva sigmoide do barorreflexo de FC após injeção serial em bolus de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (Equação 4) a 25 e 35°C no sapo cururu *Rhinella schneideri*

	25°C	35°C	Valor de P
Variáveis basais			
PAM (kPa)	3,95 ± 0,31	3,83 ± 0,15	0,73
FC (bpm)	32,2 ± 1,83	64,3 ± 3,69*	<0,001
\dot{V}_E (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	62,0 ± 11,5	143,3 ± 15,9*	0,001
V_T (ml.kg ⁻¹)	3,80 ± 0,53	5,79 ± 0,68*	0,037
FR (rpm ^l)	18,3 ± 3,95	25,2 ± 1,96	0,14
Variáveis do barorreflexo			
FC mínima (bpm)	27,0 ± 1,61	54,5 ± 3,47*	<0,001
FC máxima (bpm)	62,3 ± 1,45	96,1 ± 4,94*	<0,001
Amplitude de FC (bpm)	35,3 ± 2,74	41,6 ± 3,48	0,17
R^2	0,93 ± 0,01	0,94 ± 0,02	0,48
Coefficiente do slope	10,9 ± 1,62	11,3 ± 2,02	0,93
PAM ₅₀ (kPa)	3,10 ± 0,21	3,32 ± 0,09	0,38
Ganho ₅₀ (bpm.kPa ⁻¹)	30,8 ± 4,49	38,3 ± 9,80	1,00
Ganho normalizado (un)	3,99 ± 0,73	2,31 ± 0,60*	0,04

*indica diferença significativa entre as temperaturas. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; \dot{V}_E , ventilação; V_C , volume corrente; FR, frequência respiratória; R^2 , coeficiente de determinação; coeficiente do slope, coeficiente que representa a inclinação da curva; PAM₅₀, pressão arterial no ponto médio da curva; Ganho₅₀, ganho máximo; e o ganho₅₀ expresso em unidade normalizada. Os dados são expressos como média ± E.P.M. Parâmetros cardiovasculares e do barorreflexo ($N = 9$); parâmetros ventilatórios ($N = 8$).

Um traçado original de PAP de um sapo a 25°C exibindo uma típica resposta reflexa taquicárdica para a redução da PAM após injeção de NPS (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) é mostrado na Figura 1. Adicionalmente, um aumento paralelo no registro de fluxo ventilatório foi observado durante a hipotensão. Em contraste, o aumento da PAM após a injeção em bolus de FE (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) teve um pequeno efeito sobre a FC, mas foi capaz de causar redução consistente do fluxo ventilatório.

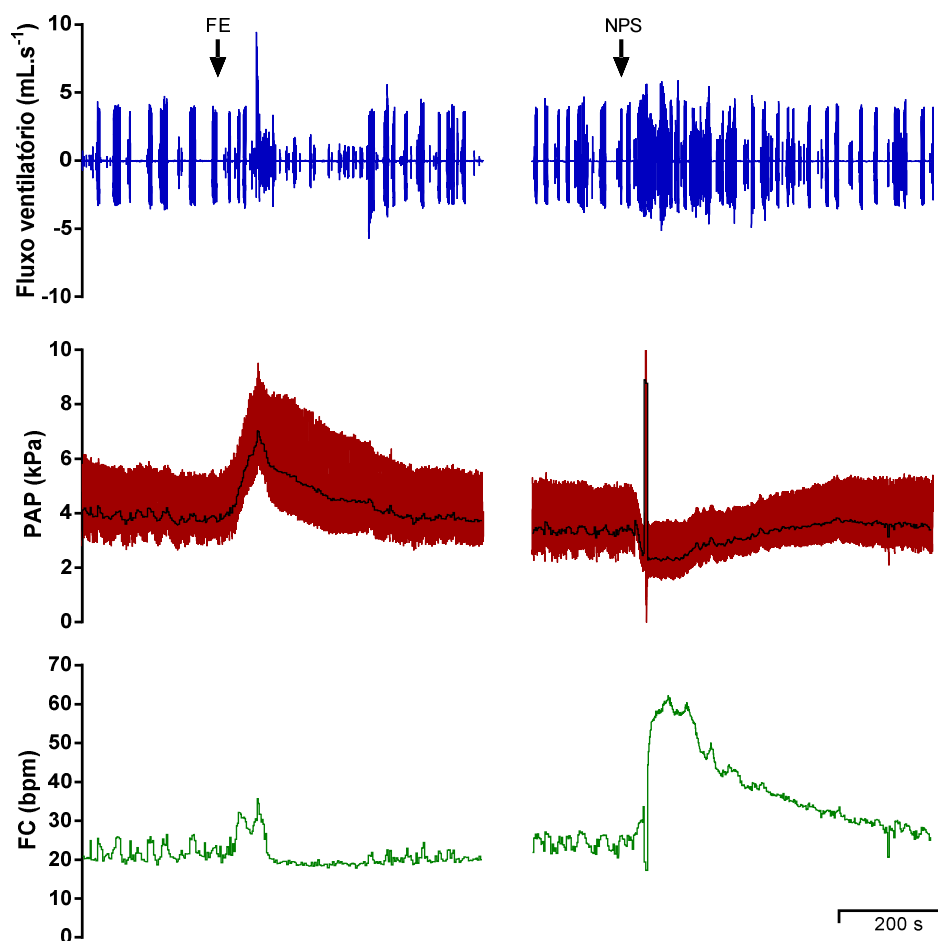


Figura 1: Fluxo ventilatório, pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) dos traçados originais representativos de um sapo cururu *Rhinella schneideri* a 25°C. As setas indicam o momento das injeções intravenosas de fenilefrina (FE; 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e nitroprussiato de sódio (NPS; 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). O traçado em preto no sinal de PAP representa a pressão arterial média.

3.1 Efeito da temperatura sobre as influências da pressão arterial (PA) nas variáveis cardiorrespiratórias

As doses seriadas e crescentes de FE elevaram a PAM (efeito do tratamento: $P < 0,001$; $F_{5, 102} = 90,141$; Figura 2A) e provocaram uma pequena redução na FC (efeito do tratamento:

$P < 0,001$; $F_{5, 102} = 20,049$; Figura 2B) nas duas temperaturas testadas, enquanto a temperatura teve efeito significativo apenas sobre a FC (efeito da temperatura: $P < 0,001$; $F_{1, 106} = 59,548$; Figura 2B). O efeito da FE sobre a PAM não foi afetado pela temperatura ($P = 0,96$; Figura 2A) e, juntamente com as alterações reflexas de FC, a hipertensão induzida pela FE causou uma significativa redução da FR independentemente da temperatura (efeito do tratamento: $P < 0,001$; $F_{(5, 90)} = 21,137$; Figura 2C). Em contraste, o V_C foi significativamente diminuído pelas injeções de 25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FE apenas a 25°C (efeito do tratamento: $P < 0,001$; $F_{(5, 90)} = 5,951$; Figura 2D). Quando a temperatura foi aumentada para 35°C, o V_C permaneceu inalterado para todas as doses de FE que induziram hipertensão mas que se mantiveram sempre elevados em relação aos valores para a temperatura mais baixa (25°C) (efeito da temperatura: $P < 0,001$; $F_{1, 94} = 19,565$; Figura 2D). De uma maneira geral, aumentada PAM induziu reduções paralelas da \dot{V}_E independente da temperatura (efeito do tratamento: $P < 0,001$; $F_{5, 90} = 17,783$; Figura 2E) principalmente devido as reduções da FR. Visto que o V_C não foi afetado pela hipertensão a 35°C, os valores de \dot{V}_E foram mantidos elevados relativos a menor temperatura (efeito da temperatura: $P = 0,002$; $F_{1, 94} = 13,858$; Figura 2E).

Em contraste aos efeitos da FE, as doses seriais e crescentes de NPS reduziram a PAM (interação da temperatura \times tratamento: $P = 0,028$; $F_{(5, 102)} = 2,671$; Figura 2F) causando uma pronunciada resposta reflexa de taquicardia (interação da temperatura \times tratamento: $P = 0,049$; $F_{(5, 102)} = 2,343$; Figura 2G). Adicionalmente, considerando que a alta temperatura significativamente deslocou os valores de FC basais para valores mais elevados (veja Tabela 1), a taquicardia reflexa também foi mantida em valores elevados para todas as doses de NPS indutoras de hipotensão relativos a 25°C (efeito da temperatura: $P < 0,001$; $F_{(1, 106)} = 73,105$; Figura 2G). Reduções na PAM induziram aumentos da FR (efeito do tratamento: $P < 0,001$; $F_{(5, 90)} = 16,858$; Figura 2H) que foram seguidos por aumentos no V_C apenas para as doses mais altas de NPS na temperatura mais baixa, enquanto a hipotensão induzida pelo NPS provocou um aumento no V_C apenas na dose mais baixa de NPS a 35°C (efeito do tratamento: $P = 0,002$; $F_{(5, 90)} = 4,398$; Figura 2I). Assim, independentemente da temperatura, os efeitos da hipotensão induzida pelo NPS sobre o V_C e a FR no sapo *R. schneideri* resultou em um significativo aumento da ventilação total (efeito do tratamento: $P < 0,001$; $F_{(5, 90)} = 24,656$; Figura 2J).

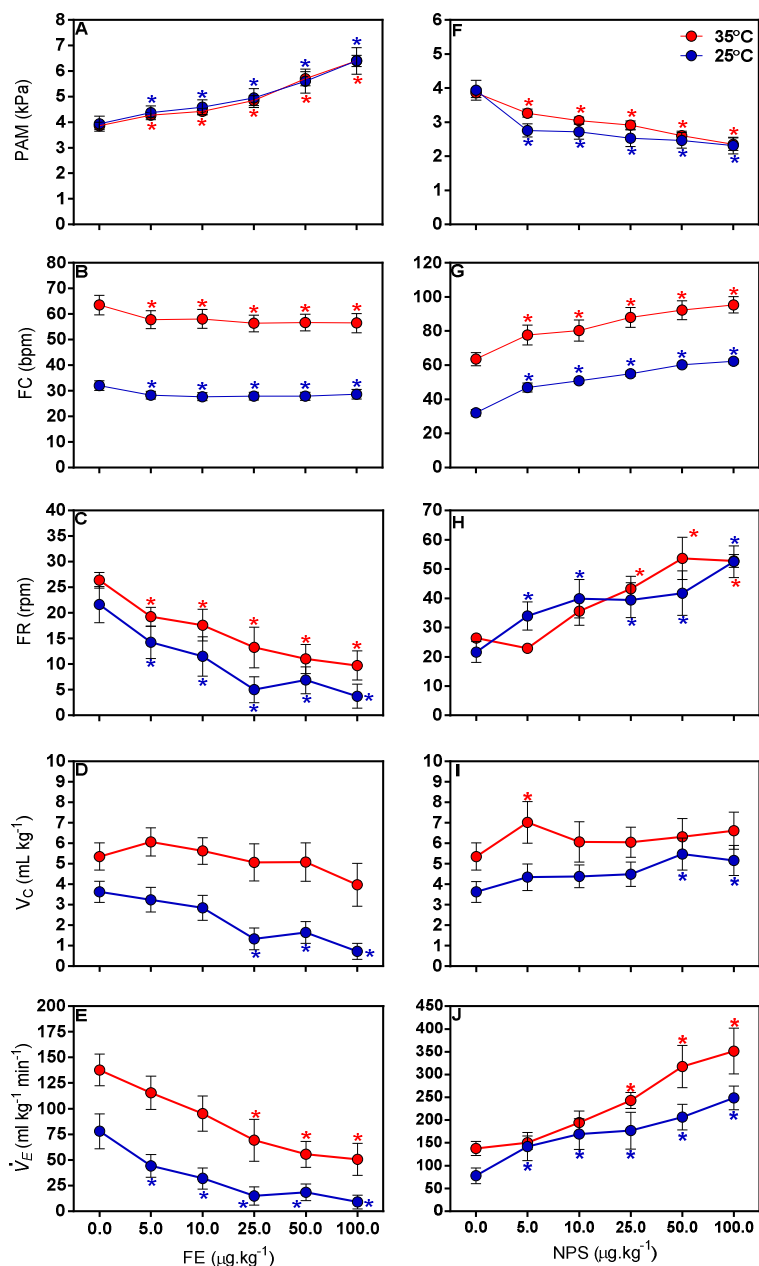


Figura 2: Efeito da manipulação farmacológica sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), volume corrente (V_c) e ventilação (\dot{V}_E) no sapo cururu *Rhinella schneideri* a 25 e 35°C. Injeções intravenosa de solução Ringer e de doses seriais e crescentes em bolus de fenilefrina (FE, A, B, C, D e E) e nitroprussiato de sódio (NPS, F, G, H, I e J) a 25°C (azul) e 35°C (vermelho). Asteriscos azuis representam diferença significativa do efeito das drogas relativo ao efeito da solução Ringer a 25°C. Asteriscos vermelhos representam diferença significativa do efeito das drogas relativo ao efeito da solução Ringer a 35°C (ANOVA two-way de medidas repetidas; $P < 0.05$; pós-teste de Holm-Šidák). Parâmetros cardiovasculares ($N = 9$); parâmetros ventilatórios ($N = 8$). Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

3.2 Efeito da temperatura sobre as relações entre pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e ventilação (\dot{V}_E)

Aumentando a temperatura de 25 para 35°C resultou em um deslocamento para cima na relação entre PAM e FC (Figura 3). O ponto operante (representado pelos valores basais de PAM e FC) nesta relação foi movido para cima principalmente devido ao efeito da temperatura sobre os valores basais de FC ($P < 0,001$; Tabela 1 e Figura 3). Apesar de um aumento de 10°C na temperatura, a sensibilidade do barorreflexo da FC não foi elevada como pode ser observado pelas similaridades entre o ganho absoluto a 25 e 35°C ($P = 1,0$; Tabela 1). Em função de um substancial efeito da temperatura sobre os valores de repouso de FC no sapo *R. schneideri*, o ganho absoluto foi então normalizado com base na PAM e FC basais para cada animal, o que resultou na redução significativa do ganho normalizado ($P = 0,04$; Tabela 1) na temperatura mais elevada. Em adição aos efeitos da temperatura sobre a FC de repouso, as FCs mínima e máxima também foram afetadas significativamente pela temperatura ($P < 0,001$; Tabela 1 e Figura 3).

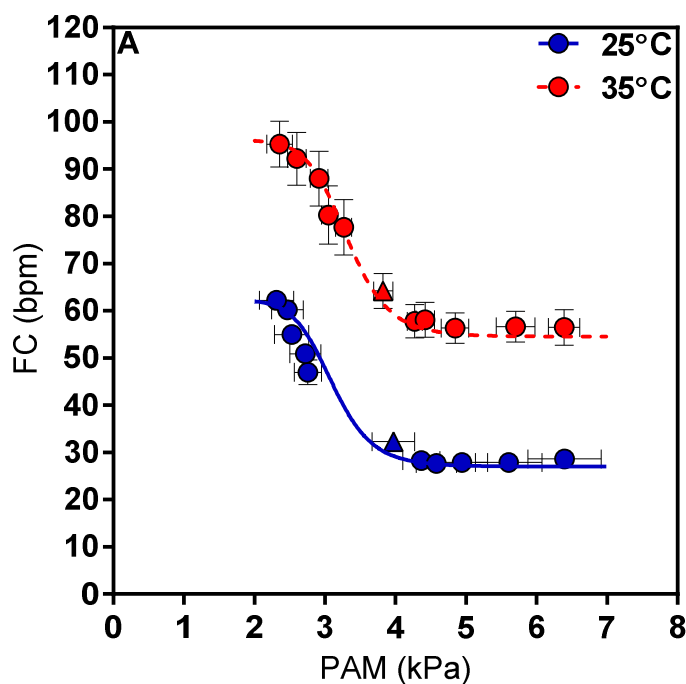


Figura 3: Curvas barorreflexas médias no sapo cururu *Rhinella schneideri* obtidas a 25 (linha azul contínua), e 35°C (linha pontilhada vermelha). A relação entre pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram geradas a partir dos valores médios das variáveis da curva para cada animal (veja Tabela 1). A PAM e a FC basais são representadas pelos triângulos em azul a 25°C ($N = 9$) e vermelho a 35°C ($N = 9$). Para as diferenças estatísticas, veja as variáveis do barorreflexo derivadas da curva sigmoide do barorreflexo da FC na Tabela 1. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

O efeito das alterações de PAM sobre as respostas ventilatórias (FR, V_C e \dot{V}_E) estão representados pelas relações apresentadas nas figuras 4, 5 e 6. A distribuição da variabilidade dos dados para ambas as temperaturas mostrando as relações entre a PAM e a FR, o V_C ou a \dot{V}_E estão representadas na figura 4.

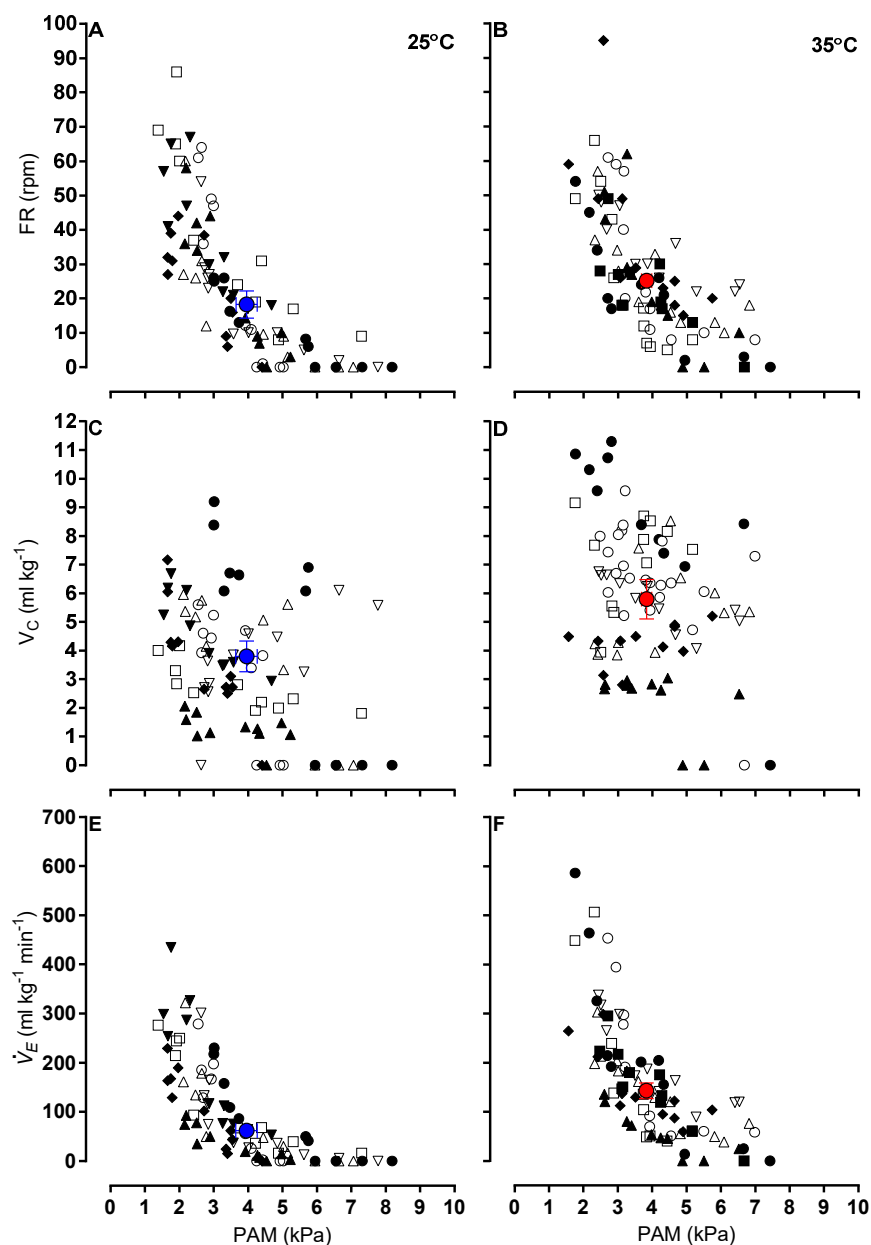


Figura 4: O efeito das alterações na pressão arterial média (PAM) sobre a frequência respiratória (FR; A e B), sobre o volume corrente (V_C ; C e D) e sobre a ventilação (\dot{V}_E ; E e F) no sapo cururu *Rhinella schneideri* a 25 e 35°C. Os valores basais de FR, V_C , \dot{V}_E e PAM são representados pelos círculos azul a 25°C ($N = 8$) e vermelho a 35°C ($N = 8$). Os diferentes símbolos representam diferentes animais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

Dados para um animal representativo está ilustrado na figura 5 mostrando as inclinações das curvas para a hipotensão induzida pelo NPS e a hipertensão induzida pela FE a 25 e 35°C para a FR e a \dot{V}_E . Os dados de regressão linear não foram apresentados para a relação PAM/ V_C porque houve baixos coeficientes de determinação para a maioria dos animais, como pode ser visto na figura 4C e 4D. A sensibilidade da resposta (inclinação da curva) devido a hipotensão ou hipertensão não foram afetadas pelas alterações térmicas para ambas as relações PAM/FR ($P = 0,84$) ou PAM/ \dot{V}_E ($P = 0,18$) mas a hipotensão exibiu maiores valores médios para as relações PAM/FR ($P < 0,001$; $F_{(1, 90)} = 40,369$) e PAM/ \dot{V}_E ($P < 0,001$; $F_{(1, 30)} = 52,764$) do que a hipertensão em ambas as temperaturas (Tabela 2).

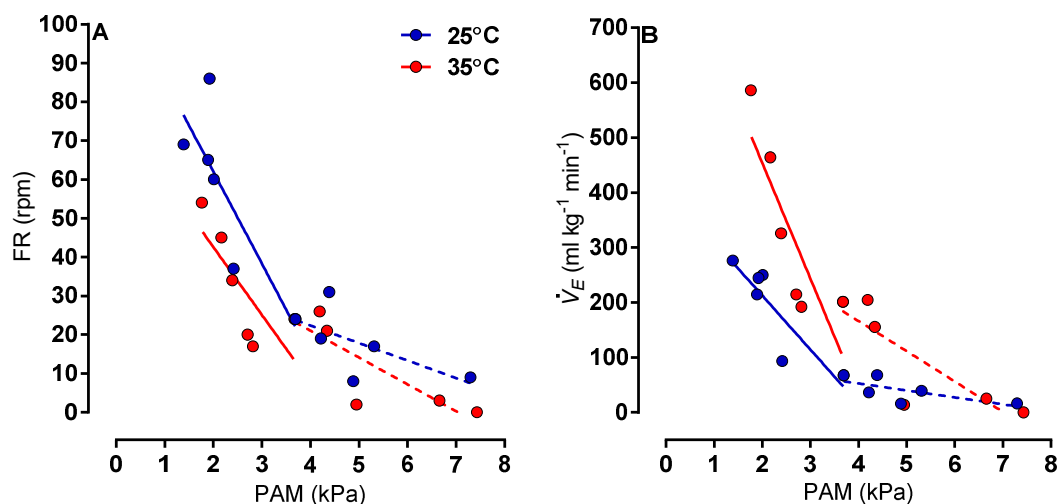


Figura 5: Sapo cururu *Rhinella schneideri* representativo para as relações entre pressão arterial média (PAM) e frequência respiratória (FR) ou ventilação (\dot{V}_E) a 25 e 35°C. A. Efeito da alteração da PAM sobre a FR com nitroprussiato de sódio (linha azul contínua, 25°C: $r^2 = 0.70$; $P = 0.04$; linha vermelha contínua, 35°C: $r^2 = 0.60$; $P = 0.07$) e fenilefrina (linha azul pontilhada, 25°C: $r^2 = 0.42$; $P = 0.16$; linha vermelha pontilhada, 35°C: $r^2 = 0.72$; $P = 0.03$). **B.** Efeito da alteração da PAM sobre a \dot{V}_E com nitroprussiato de sódio (linha azul contínua, 25°C: $r^2 = 0.77$; $P = 0.02$; linha vermelha contínua, 35°C: $r^2 = 0.72$; $P = 0.03$) e fenilefrina (linha azul pontilhada, 25°C: $r^2 = 0.47$; $P = 0.13$; linha vermelha pontilhada, 35°C: $r^2 = 0.72$; $P = 0.03$).

Tabela 2: Slopes da análise de regressão para as relações entre a pressão arterial média (PAM), a frequência respiratória (FR), e a ventilação (\dot{V}_E) geradas após injeções seriais crescentes e em bolus de fenilefrina (hipertensão) e nitroprussiato de sódio (hipotensão) a 25 e 35°C no sapo cururu *Rhinella schneideri*

Temperatura (°C)	FR-slope		valor de P	\dot{V}_E -slope		valor de P
	Hipotensão	Hipertensão		Hipotensão	Hipertensão	
25	-16.8 ± 4.8	-7.1 ± 2.1*	<0.001	-97.6 ± 17.1	-23.6 ± 6.0*	<0.001
35	-19.8 ± 3.0	-4.8 ± 0.7*	<0.001	-141.0 ± 29.5	-28.7 ± 6.4*	<0.001

*indica diferença significativa entre os slopes para hipotensão e hipertensão (teste *t* de Student; $P < 0.05$) dentro de cada temperatura. FR-slope (rpm.kPa⁻¹), slope para a relação entre PAM e FR; \dot{V}_E -slope (ml kg⁻¹ min⁻¹ kPa⁻¹), slope para a relação entre PAM e \dot{V}_E . $N = 8$.

Para testar as respostas específicas das variáveis ventilatórias às alterações de PAM nas duas diferentes temperaturas, as relações entre a PAM e FR, V_C ou \dot{V}_E , foram examinadas para os valores de PAM agrupados em intervalos de 1,0 kPa (Figura 6). A frequência respiratória foi significativamente elevada a 35°C para as pressões arteriais maiores que 4.0 kPa apenas (hipertensão) (efeito da temperatura: $P < 0,001$; $F_{1,175} = 20,174$; Figura 6A), enquanto a \dot{V}_E foi mantida em valores elevados a 35°C para todo o intervalo de pressões arteriais, abrangendo da hipotensão a hipertensão (efeito da temperatura: $P < 0,001$; $F_{1,175} = 61,694$; Figura 6C) principalmente devido as alterações no V_C (efeito da temperatura: $P < 0,001$; $F_{1,175} = 49,823$; Figura 6B).

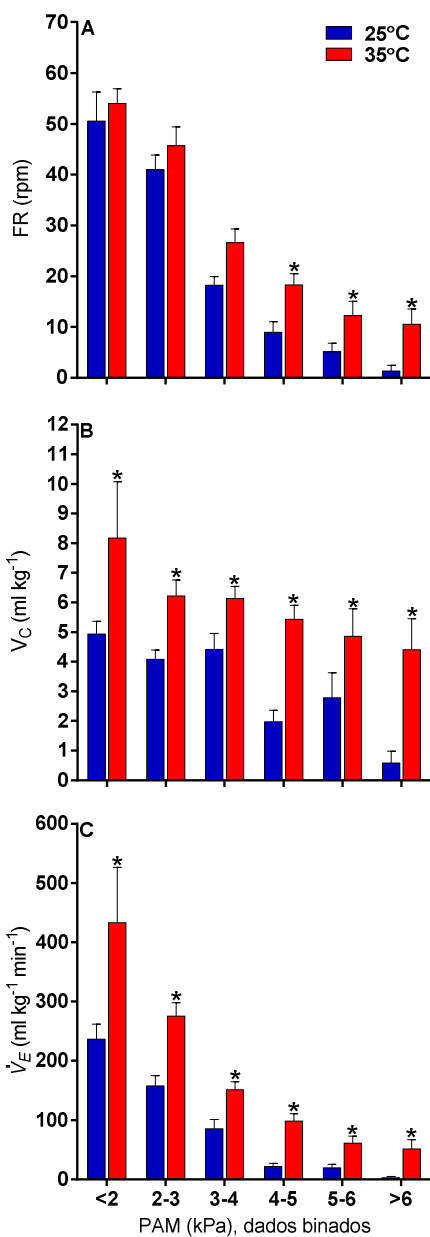


Figura 6: Relações entre os dados binados de pressão arterial média (PAM) e frequência respiratória (FR; A), volume corrente (V_C ; B) ou ventilação (\dot{V}_E ; C) no sapo cururu *Rhinella schneideri* a 25 e 35°C. Os valores de PAM estão agrupados em seis categorias abrangendo pressões arteriais menores que 2,0 kPa até maiores que 6,0 kPa. Note que as pressões arteriais entre 2,0 e 6,0 kPa estão binadas em intervalos de 1,0 kPa. *efeito significativo da temperatura (ANOVA two-way; $P < 0.05$; pós-teste de Holm-Šidák). Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

3.3 Efeitos do bloqueio colinérgico e adrenérgico nos parâmetros cardiorrespiratórios

Está representado na figura 7 o efeito do bloqueio autonômico total com atropina mais sotalol sobre a PAM, a FC e a \dot{V}_E antes e depois da hipotensão induzida por NPS no sapo cururu *R. schneideri*. O bloqueio autonômico total atenuou a taquicardia reflexa induzida pela hipotensão (interação do bloqueio autonômico total \times tratamento: $P < 0,001$; $F_{1, 22} = 48,265$; Figura 7B); em contraste, os aumentos de \dot{V}_E causados pela hipotensão não foram afetados pelo bloqueio autonômico total ($P = 0,74$; Figura 7C).

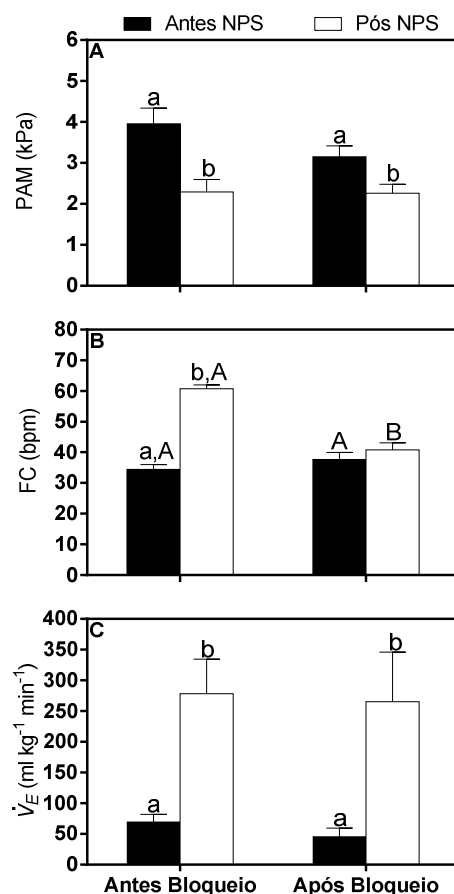


Figura 7: Efeito do nitroprussiato de sódio (NPS) na pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e ventilação (\dot{V}_E) no sapo cururu *Rhinella schneideri* antes e após o bloqueio autonômico total com atropina e sotalol. Alterações na PAM (A), FC (B) e \dot{V}_E (C) induzidas pelo NPS ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) antes ($N = 7$) e após ($N = 5$) o bloqueio autonômico total com atropina ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) mais sotalol ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a 25°C . Letras diferentes minúsculas representam efeito significativo da injeção de NPS; e letras diferentes maiúsculas representam efeito do bloqueio autonômico total dentro de antes e após NPS (ANOVA two-way de medidas repetidas; $P < 0,05$; pós-teste de Holm-Šídák). Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

3.4 Efeitos da hipotensão induzida pelo nitroprussiato de sódio sobre a ventilação em condições de normóxia e hiperóxia

Nos sapos expostos a hiperóxia ($F_{I}O_2 = 0,30$) a ventilação foi significativamente reduzida ($P = 0,032$; $F_{1, 28} = 3,177$; Figura 8). Similar aos animais sob condições normóxicas, os animais que foram expostos a 30% de O_2 também expressaram um aumento nas respostas ventilatórias ($P < 0,001$; $F_{1, 28} = 96,581$; Figura 8) após hipotensão induzida pelo NPS, esta resposta não foi estatisticamente diferente dos valores obtidos para o grupo de animais que foi exposto ao ar normóxico ($P = 0,6$).

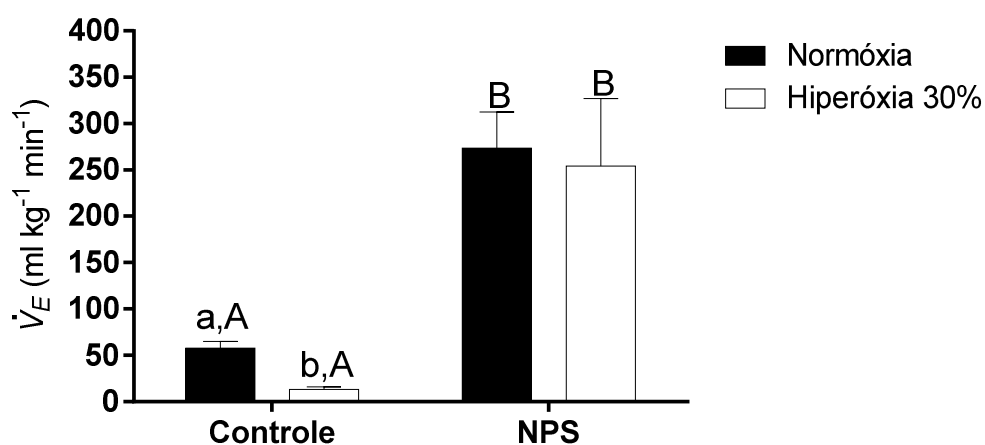


Figure 8. Efeito da indução de hipotensão pelo nitroprussiato de sódio (NPS) sobre a ventilação (\dot{V}_E) no sapo cururu *Rhinella schneideri* exposto à condição gasosa normóxia e hiperóxia. Letras diferentes minúsculas representam diferença significativa entre normóxia e hiperóxia; e letras diferentes maiúsculas representam diferença significativa entre controle e NPS dentro de cada condição gasosa (ANOVA two-way de medidas repetidas; $P < 0,05$; pós-teste de Holm-Šídák). Normóxia ($N = 10$); hiperóxia ($N = 5$). Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que as alterações na ventilação pulmonar ocasionadas pelo aumento e redução da PA no sapo cururu *R. schneideri* proporciona uma interessante evidencia para a interação entre o reflexo barorreceptor, a ventilação pulmonar, e o sistema linfático nos anfíbios anuros. Ademais, em contraste com dados prévios relativos ao aumento da sensibilidade barorreflexa para o intervalo térmico entre 15 e 30°C (veja Capítulo I), uma temperatura elevada de 35°C foi incapaz de acentuar a sensibilidade barorreflexa da FC, causando redução da mesma, enquanto as respostas ventilatórias a hipotensão e hipertensão foram independentes da temperatura.

4.1 Homeostase da pressão arterial (PA) em anfíbios anuros

Como parte da homeostase cardiovascular em anfíbios anuros, os barorreceptores localizados no sistema arterial atenuam as flutuações de curto prazo da PA reflexivamente por meio de efetores que ajustam a FC e a resistência vascular periférica. Os anuros apresentam uma alta taxa de formação de linfa, cerca de 10 vezes os valores para mamíferos, além de exibir um sistema linfático altamente eficiente para manter a homeostase do volume sanguíneo (DESAI, et al., 2010; HILMAN, et al., 2010). E como parte do sistema linfático dos anuros, os corações linfáticos localizados na região dorsal anterior e posterior do corpo participam na regulação do volume sanguíneo bombeando o excesso de fluído linfático gerado pela aumentada filtração transcápsular de volta ao sistema venoso (CROSSLEY e HILLMAN, 1999). Os anuros geralmente apresentam dois pares de corações linfáticos capazes de gerar pressões de ~1,0 a 1,5 kPa com frequência de ~40 a 60 batimentos por minuto. Sua importância também tem sido revelada no âmbito do controle da PA pela existência de inervação proveniente dos nervos espinhais (revisado por HEDRICK, et al., 2013), pela presença de vesículas do tipo granular sugerindo uma inervação adrenérgica (SCHIPP e FLINDT, 1968), e pela resposta reflexa de diminuição da frequência de pulsação dos corações linfáticos quando do aumento de PA, ou mesmo pela estimulação do nervo recorrente laríngeo que inerva os barorreceptores das artérias pulmocutâneas (CROSSLEY e HILLMAN, 1999; YAMANE, 1990).

É importante salientar que experimentos conduzidos a partir da destruição dos corações linfáticos resultam em um marcante aumento no volume de hemácias, aumento de edema intersticial, e conseqüente óbito do animal dentro de poucos dias (BAUSTIAN, 1988; ZWEMER e FOGLIA, 1943), mostrando assim a importância destes para a manutenção do

volume sanguíneo do animal. O fluido linfático extravascular gerado por alterações na PA nos anuros enfrenta problemas gravitacionais para ser devolvido ao sistema cardiovascular por meio dos corações linfáticos, tendendo a se acumular nos sacos linfáticos ventrais do animal. Assim, a presença de efetores capazes de superar a ação da gravidade e deslocar o fluido linfático verticalmente até os corações linfáticos é fundamental para a manutenção da homeostase cardiovascular dos anfíbios anuros. Dentre os efetores envolvidos no deslocamento de linfa está a contração de vários músculos esqueléticos das quais muitos deles estão inseridos na pele. A contração desta musculatura esquelética, muitas vezes associada com os sacos linfáticos dos membros anteriores e posteriores alteram a complacência e o volume dos sacos linfáticos ao redor, assim causando o movimento de linfa (DREWES, et al., 2007; 2013). Outro efector muito importante no movimento linfático, sendo o principal responsável por direcionar o fluído linfático verticalmente de regiões mais ventrais dos sacos linfáticos até os corações linfáticos dorsais, é a ventilação pulmonar. A inflação e deflação pulmonar alteram a pressão e o volume dos sacos linfáticos ao redor, principalmente o grande seio linfático subvertebral que se encontra no espaço dorsal entre os pulmões e a coluna vertebral, além de apresentar comunicação direta com os corações linfáticos nos anuros (HEDRICK et al., 2007; 2013). Assim, a partir de uma perspectiva evolucionária, as respostas ventilatórias possivelmente moduladas pela estimulação dos barorreceptores no sapo cururu *R. schneideri* obtidas no presente trabalho podem contribuir para nosso entendimento com relação as inúmeras evidências da influência do sistema cardiovascular diretamente sobre as respostas respiratórias existentes para os mamíferos (BAEKEY, et al., 2010; BRUNNER, et al., 1982; STEWART, et al., 2011; WALKER e JENNINGS, 1998). Ainda mais interessante, nossos dados apresentam relação com estudos da literatura que mostram o papel da ventilação pulmonar na homeostase da pressão/volume nos anfíbios anuros (HEDRICK, et al., 2013). É importante salientar que os ajustes ventilatórios decorrentes da queda e aumento de PA no sapo *R. schneideri* são meramente correlativos e estudos mecânicos são necessários para elucidar a real contribuição da ventilação no retorno linfático.

O núcleo do trato solitário é a maior região do tronco encefálico recebendo e integrando aferências provenientes do sistema cardiovascular e respiratório nos mamíferos (LOWEY e SPYER, 1990). As aferências barorreceptoras também convergem para o núcleo do trato solitário no sapo *R. schneideri* (BIANCHI-DA-SILVA, et al., 2000), mas qualquer outra transmissão sináptica no SNC dos anfíbios relacionada ao controle barorreflexo ainda é desconhecida. Estimulação elétrica de alta intensidade do nervo recorrente laríngeo provoca ajustes cardiovasculares tal como bradicardia e hipotensão, além de aumentar o período de

apneia em sapos *R. marina* não anestesiados (VAN VLIET e WEST, 1986). Esta observação corrobora a reduzida ventilação durante hipertensão vista em nossos sapos. Existe uma extensiva sobreposição entre as áreas de controle cardiovascular e respiratório em mamíferos; além disso, um aumento dose-dependente na pressão de pulso é capaz de estender o tempo de expiração em experimentos com ratos na preparação *in situ* indicando a presença de uma interação neural entre o barorreflexo e o padrão respiratório nestes animais (BAEKEY, et al., 2008; BAEKEY, et al., 2010). É possível que *inputs* barorreceptores para o núcleo do trato solitário nos anfíbios anuros poderiam causar a supressão ou a liberação do *drive* central respiratório contribuindo para a existência de hipopnéia ou hiperpnéia, respectivamente. Desta forma, as relações entre PA, ventilação e sistema linfático podem depender da integração central destas informações no SNC; entretanto, a existência deste circuito e/ou a interação destes entre si permanecem desconhecidos e demanda investigação adicional nos anfíbios.

Pode-se argumentar que a resposta respiratória a hipotensão resultaria de uma ativação do quimiorreflexo periférico, mas algumas evidências não suportam esta hipótese. Sabemos que nos sapos a resposta ventilatória à hipóxia é mediada por reduções na pressão parcial arterial de oxigênio (P_{aO_2} ; BRANCO e GLASS, 1995; WANG, et al., 1994). Ainda neste contexto, a frequência de disparos dos quimiorreceptores carotídeos no sapo *R. marina* não aumenta até que a P_{aO_2} caia entre 5,3-8,0kPa (40-60mmHg), e permanecem silenciados em condições gasosas hiperóxicas (30%; VAN VLIET e WEST, 1992). Assim, uma aumentada F_{IO_2} (0.30) no ar reduziu a ventilação basal dos nossos sapos e não foi capaz de abolir a resposta ventilatória a hipotensão (Figura 8), sugerindo um pequeno ou mesmo nenhum envolvimento destes quimiorreceptores. Adicionalmente, as respostas ventilatórias à hipóxia no sapo *R. schneideri*, a fim de melhorar as trocas gasosas pulmonares, são mediadas primariamente alterando o V_C ao invés da FR (BÍCEGO-NAHAS, et al., 2001; GARGAGLIONI e BRANCO, 2001; 2003), enquanto aumentos na ventilação induzidos pela hipotensão no presente estudo foram ajustados primariamente por meio do aumento na FR do que no V_C (Figura 2). Nós também sabemos que, pelo menos no sapo *R. marina*, os quimiorreceptores do labirinto carotídeo não são sensíveis as variações de fluxo sanguíneo, pois a atividade nervosa aferente proveniente destes receptores não é afetada pela interrupção no suprimento sanguíneo do labirinto carotídeo e a hipóxia passa a não ser mais efetiva em estimular os quimiorreceptores nestas condições (VAN VLIET e WEST, 1992). Portanto, nossos dados sugerem que as respostas ventilatórias durante a hipotensão aguda podem ser potencialmente relacionadas à influência dos barorreceptores sobre as áreas respiratórias. Em

favor desta hipótese temos os resultados com a hipertensão induzindo respostas opostas a hipotensão (reduzida ventilação).

4.2 Efeitos da temperatura nas respostas reflexas cardiorrespiratórias

O aumento da temperatura em 10°C (de 25 para 35°C) promoveu ajustes cardiorrespiratórios, dentre eles aumentos nos valores basais de FC e \dot{V}_E . A ventilação foi afetada pela temperatura (127% de aumento, $Q_{10} = 2,27$) principalmente em decorrência do aumento no V_C ($Q_{10} = 1,57$). Assim, elevada \dot{V}_E em altas temperaturas é coerente com o aumento da taxa metabólica de até 105% para o mesmo intervalo térmico relatado no sapo *R. marina*, espécie próxima filogeneticamente (OVERGAARD, et al., 2012). A exposição a elevada temperatura (35°C) no sapo *R. schneideri* também aumentou a FC, acompanhando assim a elevada demanda metabólica do animal, e que ocorreu por meio de um aumento de 100% relativo aos valores da temperatura mais baixa enquanto a PA manteve-se constante. A sustentação da PA em valores relativamente constantes para o intervalo térmico entre 25 e 35°C, ao passo que os valores basais de FC são ajustados em conformidade com a alta temperatura, provavelmente reflete a ocorrência de uma vasodilatação generalizada (ZENA, et al., 2015), visto que o volume sistólico não apresenta alterações significativas para o intervalo térmico de 10 a 30°C no sapo *R. marina* (HEDRICK, et al., 1999).

As alterações de PA induzidas farmacologicamente não apenas desencadearam respostas barorreflexas de FC, mas também afetaram a \dot{V}_E no sapo *R. schneideri*, similar ao que já foi visto para mamíferos (BRUNNER, et al., 1982; MCMULLAN e PILOWSKY, 2010; STEWART, et al., 2011; WALKER e JENNINGS, 1998). Primariamente alterando a FR e em menor extensão o V_C , aumentos na PA nos sapos foram seguidos por reduções na \dot{V}_E enquanto, reciprocamente, a \dot{V}_E foi significativamente elevada após a hipotensão. Contrastando com a redução no V_C durante a hipertensão a 25°C (doses mais altas de FE), a hipertensão na temperatura elevada de 35°C não foi capaz de reduzir o V_C , apesar de diminuir a FR. Adicionalmente, a relação entre a PA e as respostas ventilatórias (dados binados de PA; Figura 6) revelaram que em altas temperaturas, os sapos exibiram aumentada ventilação ao longo de todos os intervalos de PA (<2 a >6 kPa), principalmente em função do aumento no V_C . Isto permitiu aos sapos manter um fluxo ventilatório suficientemente alto em seus pulmões garantindo adequada trocas gasosas através do órgão durante elevada demanda metabólica enquanto sua habilidade em alterar a ventilação em resposta a hipertensão e hipotensão foi mantida (tabela 2 e figura 5). De acordo com a habilidade dos anfíbios anuros

em responder primariamente a hipotensão aumentando a FC (ver capítulo I; HEDRICK, et al., 2015; ZENA, et al., 2015), o sapo cururu também exibiu uma resposta ventilatória mais proeminente a reduções do que aumentos de PA. Assim, nossos dados parecem ser correlativos à habilidade dos anfíbios anuros em utilizar seus pulmões para a regulação da homeostase do volume sanguíneo (HEDRICK, et al., 2013), além de contribuir com a hipótese prevalente de regulação da PA primariamente contra eventos de hipotensão (HEDRICK, et al., 2015; ZENA, et al., 2015).

Além das respostas reflexas ventilatórias, que foram independentes da temperatura, o barorreflexo da FC nos nossos sapos na realidade apresentou-se reduzido a 35°C, como pode ser observado pelo ganho normalizado na Tabela 1. Isto sugere que o ramo cardíaco da resposta barostática possivelmente aproximou-se do limite térmico para esta espécie. Como visto no capítulo I desta tese, é possível observar que a sensibilidade barorreflexa é acentuada pela temperatura para o intervalo térmico entre 15 e 30°C. Entretanto, nossos dados parecem indicar que aumentos adicionais da temperatura (> 30°C) ao invés de aumentar a sensibilidade barorreflexa da FC no sapo cururu *R. schneideri*, na realidade foi responsável por reduzi-la. Uma possível explicação para este fenômeno pode envolver um prejuízo térmico da resposta taquicárdica durante a hipotensão. Isto é indicado por um baixo Q_{10} (1,5) para a resposta máxima de FC alcançada para a dose mais alta de NPS para o intervalo térmico de 25 a 35°C. A FC basal foi consideravelmente afetada pela temperatura, alterando o ponto operante do barorreflexo para valores mais altos de FC (100% de aumento) com um Q_{10} de aproximadamente 2,0. Por isso, em um cenário ideal em que a sensibilidade barorreflexa da FC de 25 para 35°C fosse sustentada, era esperado que a temperatura influenciasse a resposta de FC máxima e mínima por meio de um mesmo Q_{10} como aconteceu para a FC basal do sapo; entretanto, esta não foi a real resposta observada para a FC máxima.

A capacidade dos anfíbios anuros em aumentar a FC frente à hipotensão conta com a maior contribuição de alteração de FC durante alterações da PA (HEDRICK, et al., 2015; ZENA, et al., 2015) e que pode ser fortemente afetada pela inabilidade de aumentar adicionalmente a FC quando o animal já apresenta valores elevados de FC basal. Tal condição pode ser vista quando o animal é exposto a altas temperaturas (>35°C; OVERGAARD et al., 2012) ou durante atividade física forçada (WAHLQVIST e CAMPBELL, 1988); esta última já conhecida por causar um ajuste do barorreflexo em humanos, onde a FC e a PA do ponto operante durante o repouso são deslocadas para valores mais elevados (NORTON, et al., 1999).

Em geral, parece que os anfíbios anuros dependem de uma combinação de mecanismos para manter a homeostase cardiovascular. O barorreflexo nos anuros é claramente relacionado ao seu eficiente sistema linfático, visto que os corações linfáticos nesses animais estão sob controle dos barorreceptores arteriais (CROSSLEY e HILLMAN, 1999) e a ventilação pulmonar funciona como um eficiente efetor para a mobilização linfática (HEDRICK, et al., 2007). Baseado nos nossos dados, oscilações de curto prazo da PA são defendidas por mecanismos que envolvem ajustes reflexos de FC juntamente com alterações de ventilação pulmonar (principalmente FR) que podem essencialmente surgir da integração das aferências barorreceptoras no SNC, modulando áreas de controle da respiração, como previamente proposto para os mamíferos. Adicionalmente, temperaturas ambientais elevadas podem reduzir o barorreflexo por prejudicar a resposta máxima de FC (baixo Q_{10}) quando os valores de FC basais já são elevados, enquanto o componente ventilatório desta resposta é preservado. Embora a conexão entre a ventilação e o fluxo linfático baseada na regulação barorreflexa merece investigação adicional, nossos dados no sapo *R. schneideri* claramente proporcionam uma ligação correlativa entre o barorreflexo, a ventilação pulmonar e o sistema linfático nos anuros, além de fornecer uma compreensão evolutiva para melhor entendimento da interação entre PA e ventilação nos mamíferos. Entre os anfíbios, ainda é desconhecido se a função da ventilação pulmonar é uma característica conservada contribuindo com a homeostase da PA, visto que anfíbios desprovidos de pulmão, como algumas salamandras (HUTCHISON, 2008) e a rã-de-Bornéu, *Barbourula kalmantanensis* (BICKFORD, et al., 2008) poderiam depender de outros efetores para o movimento vertical de linfa (*e.g.* contração da musculatura esquelética) e que poderiam estar sob controle dos barorreceptores. Sendo assim, a suposta regulação da PA/volume dependente da ventilação certamente não existiria nesses animais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEMI SATO, M.; VANDERLEI MENANI, J.; UBRIACO LOPES, O.; COLOMBARI, E. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 38, n. (3 Pt 2), p. 560-564, set. 2001.

ALTIMIRAS, J.; CROSSLEY, D. A. 2ND. Control of blood pressure mediated by baroreflex changes of heart rate in the chicken embryo (*Gallus gallus*). **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 278, n. 4, p. R980-R986, abr. 2000.

ALTIMIRAS, J.; FRANKLIN, C. E.; AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **J. Exp. Biol.**, v. 201, n. Pt 15, p. 2235-2242, ago. 1998.

ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H.; TEIXEIRA, M. T.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L. Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Fish. Physiol. Biochem.**, v. 42, n. 4, p. 1213-1224, ago. 2016.

BAEKEY, D. M.; DICK, T. E.; PATON, J. F. R. Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation. **Exp. Physiol.**, v. 93, n. 7, p. 803–816, jul. 2008.

BAEKEY, D. M.; MOLKOV, Y. I.; PATON, J. F. R.; RYBAK, I. A.; DICK, T. E. Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: Insights into respiratory-sympathetic interactions. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 174, n. 1-2, p. 135–145, nov. 2010.

BAGSHAW, R. J. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 60, n. 2, p. 121-162, maio 1985.

BARTELS, H.; WELSCH, U. Freeze-fracture study of the turtle lung. 1. Intercellular junctions in the air-blood barrier of *Pseudemys scripta*. **Cell Tissue Res.**, v. 231, n. 1, p. 157-172, 1983.

BAUSTIAN, M. The contribution of lymphatic pathways during recovery from hemorrhage in the toad *Bufo marinus*. **Physiol. Zool.**, v. 61, n. 6, p. 555-563, nov./dez. 1988.

BERGER, P. J.; EVANS, B. K.; SMITH, D. G. Localization of Baroreceptors and Gain of the Baroreceptor-Heart Rate Reflex in the Lizard *Trachydosaurus rugosus*. **J. Exp. Biol.**, v. 86, p. 197-209, 1980.

BIANCHI-DA-SILVA, L. M.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. Baroreceptor control of heart rate in the awake toad: peripheral autonomic effectors and arterial baroreceptor areas. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 80, n. 1-2, p. 31-39, abr. 2000.

BICEGO, K. C.; BARROS, R. C.; BRANCO, L. G. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 147, n. 3, p. 616-639, jul. 2007.

- BICEGO-NAHAS, K. C.; BRANCO, L. G. Seasonal changes in the cardiorespiratory responses to hypercarbia and temperature in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 124, n. 2, p. 221-229, out. 1999.
- BICEGO-NAHAS, K. C.; GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. Seasonal changes in the preferred body temperature, cardiovascular, and respiratory responses to hypoxia in the toad, *Bufo paracnemis*. **J. Exp. Zool.**, v. 289, n. 6, p. 359-65, maio 2001.
- BOOTH, L. C.; GUNN, A. J.; MALPAS, S. C.; BARRETT, C. J.; DAVIDSON, J. O.; GUILD, S. J.; BENNET, L. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity and heart rate in near-term fetal sheep. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 8, p. 736-744, ago. 2011.
- BOOTH, L. C.; MALPAS, S. C.; BARRETT, C. J.; GUILD, S. J.; GUNN, A. J.; BENNET, L. Is baroreflex control of sympathetic activity and heart rate active in the preterm fetal sheep? **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 296, n. 3, p. R603-R609, mar. 2009.
- BRANCO, L. G.; GLASS, M. L. Ventilatory responses to carboxyhaemoglobinaemia and hypoxic hypoxia in *Bufo paracnemis*. **J. Exp. Biol.**, v. 198, n. (Pt 6), p. 1417-1421, jun. 1995.
- BRUNNER, M. J.; SUSSMAN, M. S.; GREENE, A. S.; KALLMAN, C. H.; SHOUKAS, A. A. Carotid sinus baroreceptor reflex control of respiration. **Circ. Res.**, v. 51, n. 5, p. 624-636, nov. 1982.
- BURGGREN, W. W. Pulmonary blood plasma filtration in reptiles: a "wet" vertebrate lung? **Science**, v. 215, n. 4528, p. 77-78, jan. 1982.
- COURTICE, F. C. Lymph flow in the lungs. **Br. Med. Bull.** v. 19, p. 76-79, jan. 1963.
- COURTICE, G. P. Effect of temperature on cardiac vagal action in the toad *Bufo marinus*. **J. Exp. Biol.**, v. 149, p. 439-47, mar. 1990.
- CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; BUSNARDO, C.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neurosci. Res.**, v. 67, n. 4, p. 317-326, ago. 2010.
- CROSSLEY, D. A. 2ND; ALTIMIRAS, J.; WANG, T. Hypoxia elicits an increase in pulmonary vasculature resistance in anaesthetised turtles (*Trachemys scripta*). **J. Exp. Biol.**, v. 201, n. (Pt 24), p. 3367-3375, dez. 1998.
- CROSSLEY, D. A. 2ND; BAGATTO, B. P.; DZIALOWSKI, E. M.; BURGGREN, W. W. Maturation of cardiovascular control mechanisms in the embryonic emu (*Dromiceius novaehollandiae*). **J. Exp. Biol.**, v. 206, n. (Pt 15), p. 2703-2710, ago. 2003.
- CROSSLEY, D. A. 2ND; HICKS, J. W.; ALTIMIRAS, J. Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. **J. Exp. Biol.**, v. 206, n. (Pt 16), p. 2895-2902, ago. 2003.
- CROSSLEY, D. A. 2ND; HILLMAN, S. S. The role of pulmocutaneous baroreceptors in the control of lymphatic heart rate in the toad *Bufo marinus*. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 72, n. 1,

p. 109–115, jan./feb. 1999.

de SAINT-AUBAIN, M. L.; WINGSTRAND, K. G. A Sphincter in the pulmonary artery of the frog *Rana temporaria* and its influence on blood flow in skin and lungs. **Acta Zool.**, v. 60, n. 3, p. 163-172, set. 1979.

DESAI, P.; WILLIAMS, A. G. JR; PRAJAPATI, P.; DOWNEY, H. F. Lymph flow in instrumented dogs varies with exercise intensity. **Lymphat. Res. Biol.**, v. 8, n. 3, p. 143-148, set. 2010.

DREWES, R. C.; HEDRICK, M. S.; HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C. Unique role of skeletal muscle contraction in vertical lymph movement in anurans. **J. Exp. Biol.**, v. 210, n. (Pt 22), p. 3931-3939, nov. 2007.

DREWES, R. C.; HILLMAN, S. S.; HEDRICK, M. S.; WITHERS, P. C. Evolutionary implications of the distribution and variation of the skeletal muscles of the anuran lymphatic system. **Zoomorphology**, v. 132, p. 339-349, abr. 2013.

EMILIO, M. G.; SHELTON, G. Factors affecting blood flow to the lungs in the amphibian, *Xenopus laevis*. **J. Exp. Biol.**, v. 56, p. 67-77, 1972.

ERDMANN, A. J. 3RD; VAUGHAN, T. R. JR; BRIGHAM, K. L.; WOOLVERTON, W. C.; STAUB, N. C. Effect of increased vascular pressure on lung fluid balance in unanesthetized sheep. **Circ. Res.** v. 37, n. 3, p. 271-284, se. 1975.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; SA´, R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 297, p. 1–371, mar. 2006.

GALLI, G., TAYLOR, E.W., WANG, T. The cardiovascular responses of the freshwater turtle *Trachemys scripta* to warming and cooling. **J. Exp. Biol.**, v. 207, n. (Pt 9), p. 1471-1478, abr. 2004.

GAMPERL, A. K.; MILSOM, W. K.; FARRELL, A. P.; WANG, T. Cardiorespiratory responses of the toad (*Bufo marinus*) to hypoxia at two different temperatures. **J. Exp. Biol.**, v. 202, n. (Pt 24), p. 3647-3658, dez. 1999.

GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. Effect of nitric oxide in the nucleus isthmi on the hypoxic and hypercarbic drive to breathing of toads. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 281, n. 1, p. R338–R345, jul. 2001.

GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. S. Role of glutamate in the nucleus isthmi on the hypoxia- and hypercarbia-induced hyperventilation of toads. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 135, n. 1, p. 47–58, abr. 2003.

GEISER, F. Aestivation in mammals and birds. **Prog. Mol. Subcell. Biol.**, v. 49, p. 95-111, 2010.

- GENTZ, E. J. Medicine and surgery of amphibians. **ILAR J.**, v. 48, n. 3, p. 255-259, 2007.
- GLASS, M. L., WOOD, S. C.; JOHANSEN, K. The application of pneumotachography on small unrestrained animals. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.**, v. 59, n. 4, p. 425-427, mar. 1978.
- GLASS, M. L.; BRANCO, L. G.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GUTKOWSKA, J. Characterization of the atrial natriuretic factor system in lungs of the toad *Bufo paracnemis*. **J. Exp. Biol.**, v. 199, n. (Pt 7), p. 1493-1499, jul. 1996.
- GLASS, M. L.; FERNANDES, M. S.; SONCINI, R.; GLASS, H.; WASSER, J. S. Effects of dry season dormancy on oxygen uptake, heart rate, and blood pressures in the toad, *Bufo paracnemis*. **J Exp Zool**, v. 279, n. 4, p. 330-6, nov. 1997.
- GOURNAY, V.; DROUIN, E.; ROZÉ, J. C. Development of baroreflex control of heart rate in preterm and full term infants. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.**, v. 86, n. 3, p. F151-154, maio. 2002.
- GRIGG, G. C. Central cardiovascular anatomy and function in Crocodylia. In: Wood S. C.; Weber, R. E.; Hargens, A. R.; Millard, R. W. **Physiological Adaptations in Vertebrates: Respiration, Circulation and Metabolism**. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 339-354.
- GUERRA, A. R.; GARGAGLIONI, L. H.; NORONHA-DE-SOUZA, C. R.; ABE, A. S.; BRANCO, L. G.; BÍCEGO, K. C. Role of central nitric oxide in behavioral thermoregulation of toads during hypoxia. *Physiol. Behav.*, v. 95, n. (1-2), p. 101-107, set. 2008.
- GUTKOWSKA, J.; NEMER, M.; SOLE, M. J.; DROUIN, J. SIROIS, P. Lung is an important source of atrial natriuretic factor in experimental cardiomyopathy. **J. Clin. Invest.**, v. 83, n. 5, p. 1500-1504, maio. 1989.
- GUYENET PG. The sympathetic control of blood pressure. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 5, p. 335-46, maio. 2006.
- HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; WANG, T. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 156, n. 4, p. 458-62, ago. 2010.
- HEDRICK, M. S.; DREWES, R. C.; HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C. Lung ventilation contributes to vertical lymph movement in anurans. **J. Exp. Biol.**, v. 210, n. (Pt 22), p. 3940-3945, nov. 2007.
- HEDRICK, M. S.; HILLMAN, S. S.; DREWES, R. C.; WITHERS, P. C. Lymphatic regulation in nonmammalian vertebrates. **J. Appl. Physiol.**, v. 115, n. 3, p. 297-308, ago. 2013.
- HEDRICK, M. S.; MCNEW, K. A.; CROSSLEY, D. A. 2ND. Reprint of "Baroreflex function in anurans from different environments". **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 186, p. 61-65, ago. 2015.

HEDRICK, M. S.; PALIOCA, W. B.; HILLMAN, S. S. Effects of temperature and physical activity on blood flow shunts and intracardiac mixing in the toad *Bufo marinus*. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 72, n. 5, p. 509-519. set./out. 1999

HERMAN, C. A.; MATA, P. L. Catecholamine effects on blood pressure and heart rate in warm- and cold-acclimated American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 59, n. 3, p. 434-441, set. 1985.

HERMAN, C. A.; SANDOVAL, E. J. Catecholamine effects on blood pressure and heart rate in the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 52, n. 1, p. 142-148, out. 1983.

HILLMAN, S. S.; HEDRICK, M. S.; DREWES, R. C.; WITHERS, P. C. Lymph flux rates from various lymph sacs in the cane toad *Rhinella marina*: an experimental evaluation of the roles of compliance, skeletal muscles and the lungs in the movement of lymph. **J. Exp. Biol.**, v. 213, n. (Pt 18), p. 3161-3166, set. 2010.

HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C.; DREWES, R. C.; HILLYARD, S. D. **Ecological and Environmental Physiology of Amphibians**. Oxford: Oxford Univ. Press, 2009.

HILLMAN, S.S.; HEDRICK, M. S.; DREWES, R. C.; WITHERS, P.C. Lymph flux rates from various lymph sacs in the cane toad *Rhinella marina*: an experimental evaluation of the roles of compliance, skeletal muscles and the lungs in the movement of lymph. **J. Exp. Biol.**, v. 213, n. (Pt 18), p. 3161-3166, set. 2010.

HOFFMANN, A.; DE SOUZA, M. B. Cardiovascular reflexes in conscious toads. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 5, n. 3, p. 345-55, maio 1982.

HORWITZ, B. A.; CHAU, S. M.; HAMILTON, J. S.; SONG, C.; GORGONE, J.; SAENZ, M.; HOROWITZ, J.M.; CHEN, C. Y. Temporal relationships of blood pressure, heart rate, baroreflex function, and body temperature change over a hibernation bout in Syrian hamsters. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 305, n. 7, p. R759-R768, out. 2013.

HUMPHREYS, P. W.; NORMAND, I. C.; REYNOLDS, E. O.; STRANG, L. B. Pulmonary lymph flow and the uptake of liquid from the lungs of the lamb at the start of breathing. **J. Physiol.**, v. 193, n. 1, p. 1-29, nov. 1967.

ISHII, K.; HONDA, K. The function of the carotid labyrinth in the toad. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 88, n. 2, p. 103-16, fev. 1966.

ISHII, K.; ISHII, K.; KUSAKABE, T. Chemo- and baroreceptor innervation of the aortic trunk of the toad *Bufo vulgaris*. **Respir. Physiol.**, v. 60, n. 3, p. 365-75, jun. 1985.

IVES, S. J.; ANDTBACKA, R. H.; NOYES, R. D.; MCDANIEL, J.; AMANN, M.; WITMAN, M. A.; SYMONS, J. D.; WRAY, D. W.; RICHARDSON, R. S. Human skeletal muscle feed arteries studied in vitro: the effect of temperature on alpha(1)-adrenergic responsiveness. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 9, p. 907-918, set. 2011.

- JACOB, F.; CLARK, L. A.; GUZMAN, P. A.; OSBORN, J. W. Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 289, n. 4, p. H1519-H1529, out. 2005.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; JORDÃO, A. E. C.; SILVA, J. R. M. C.; GREVEN, H.; RODRIGUES, M. T. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**. v. 54, n. 3, p. 197–207, set. 2009.
- JENSEN, B.; MOORMAN, A. F.; WANG, T. Structure and function of the hearts of lizards and snakes. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 89, n. 2, p. 302-336, maio. 2014.
- KUSAKABE, T. Carotid labyrinth of amphibians. **Microsc. Res. Tech.**, v. 59, n. 3, p. 207-26, nov. 2002.
- LANGILLE, B. L.; JONES, D. R. Dynamics of blood flow through the hearts and arterial systems of anuran amphibia. **J. Exp. Biol.**, v. 68, p. 1-17, 1977.
- LILLYWHITE, H.B.; SEYMOUR, R.S. Regulation of arterial blood pressure in Australian tiger snakes. **J. Exp. Biol.**, v. 75, p. 65–79, ago. 1978.
- LIU, C. B.; LI, R. D. Electrocardiogram and heart rate in response to temperature acclimation in three representative vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.**, v. 142, n. 4, p. 416–421, dez. 2005.
- LOEWY, A. D.; SPYER, K. M. **Central Regulation of Autonomic Functions**. New York: Oxford Univ. Press, 1990.
- LUCITTI, J. L.; HEDRICK, M. S. Characterization of baroreflex gain in the domestic pigeon (*Columba livia*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 143, n. 1, p. 103-111, jan. 2006.
- LUCKHARDT, A. B.; CARLSON, A. J. (1921). Studies on the visceral sensory nervous system VIII. On the presence of vasomotor fibers in the vagus nerve to the pulmonary vessels of the amphibian and the reptilian lung. **Am. J. Physiol.**, v. 56, p. 72-112, dec. 1921.
- MACIEL, N. M.; COLLEVATTI, R. G.; COLLI, G. R.; SCHWARTZ, E. F. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 57, n. 1, p. 787-797, nov. 2010.
- MASSETT, M. P.; LEWIS, S. J.; KREGEL, K. C. Effect of heating on the hemodynamic responses to vasoactive agents. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. (3 Pt 2), p. R844-R853, set. 1998).
- MASSETT, M. P.; LEWIS, S. J.; STAUSS, H. M.; KREGEL, K. C. Vascular reactivity and baroreflex function during hyperthermia in conscious rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, n. 4, p. R1282-R1289, out. 2000.
- MCMULLAN, S.; PILOWSKY, P. M. The effects of baroreceptor stimulation on central respiratory drive: a review. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 174, n. 1-2, p. 37-42, nov. 2010.

- MILLARD, R. W.; MOALLI, R. Baroreflex sensitivity in an amphibian, *Rana catesbeiana*, and a reptilian, *Pseudemys scripta elegans*. **J. Exp. Zool.**, v. 213, n. 2, p. 283-8, ago. 1980.
- MOREIRA, L. A.; FENOLIO, D. B.; SILVA, H. L. R.; SILVA JR, N. J. A preliminary list of the herpetofauna from termite mounds of the cerrado in the upper Tocantins river valley. **Pap. Avulsos Zool.** v. 49, n. 15, p. 183–189, jun. 2009.
- MUELLER, C. A.; BURGGREN, W. W.; CROSSLEY, D. A. 2ND. ANG II and baroreflex control of heart rate in embryonic chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 305, n. 8, p. R855-R863, out. 2013.
- MURAKAMI, H.; LIU, J. L.; YONEYAMA, H.; NISHIDA, Y.; OKADA, K.; KOSAKA, H.; MORITA, H.; ZUCKER, I. H. Blockade of neuronal nitric oxide synthase alters the baroreflex control of heart rate in the rabbit. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. (1 Pt 2), p. R181-R186, jan. 1998.
- NORONHA-DE-SOUZA, C. R.; BOVO, R. P.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; BÍCEGO, K. C. Thermal biology of the toad *Rhinella schneideri* in a seminatural environment in southeastern Brazil. *Temperature*, v. 2, n. 4, p. 554-562, out. 2015.
- NORTON, K. H.; BOUSHEL, R.; STRANGE, S.; SALTIN, B.; RAVEN, P. B. Resetting of the carotid arterial baroreflex during dynamic exercise in humans. **J. Appl. Physiol.**, v. 87, n. 1, p. 332–338, jul. 1999.
- O'DONAUGHY, T. L.; RESTA, T. C.; WALKER, B. R. Laboratory demonstration of baroreflex control of heart rate in conscious rats. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 26, n. 1-4, p. 309-316, dez. 2002.
- OVERGAARD, J.; ANDERSEN, J. L.; FINDSEN, A.; PEDERSEN, P. B.; HANSEN, K.; OZOLINA, K.; WANG, T. Aerobic scope and cardiovascular oxygen transport is not compromised at high temperatures in the toad *Rhinella marina*. **J. Exp. Biol.** V. 215, n. (Pt 20), p. 3519-3526, out. 2012.
- PANG, C. C. Autonomic control of the venous system in health and disease: effects of drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 90, n. 2-3, p. 179-230, maio/jun. 2001.
- PRAMUK, J.B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zool. J. Linnean Soc.** v. 146, n. 3, p. 407–452, mar. 2006.
- RAVEN, P. B.; FADEL, P. J.; OGOH, S. Arterial baroreflex resetting during exercise: a current perspective. **Exp. Physiol.**, v. 91, n. 1, p. 37-49, jan. 2006.
- REID, I. A. Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. **News Physiol. Sci.**, v. 11, n. 6, p. 270-274, 1996.
- REYES, C.; FONG, A. Y.; BRINK, D. L.; MILSOM, W. K. Distribution and innervation of putative arterial chemoreceptors in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). **J. Comp. Neurol.** v. 522, n. 16, p. 3754–3774, nov. 2014.

- ROCHA, P. L.; BRANCO, L. G. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **J. Exp. Biol.**, v. 201, n. (Pt 5), p. 761-168, mar. 1998.
- ROME, L. C., STEVENS, E. D.; JOHN-ALDER, H. B. (1992) The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function. In: FEDER, M.E.; BURGGREN, W.W. **Environmental physiology of the amphibia**, Chicago: University of Chicago Press, 1992. p.183–205.
- SABHARWAL, R.; COOTE, J. H.; JOHNS, E. J.; EGGINTON, S. Effect of hypothermia on baroreflex control of heart rate and renal sympathetic nerve activity in anaesthetized rats. **J. Physiol.**, v. 557, n. (Pt 1), p. 247-259, maio 2004.
- SANDBLOM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **J. Exp. Biol.**, v. 208, n. (Pt 5), p. 821-829, mar. 2005.
- SÃO PAULO (estado). Centro integrado de informações agrometeorológicas, CIIAGRO: 2016. Disponível em: < <http://www.ciiagro.sp.gov.br/>>. Acesso em: jul. 2016.
- SCALLAN, J.; HUXLEY, V. H.; KORTHUIS, R. J. Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology. In: **Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
- SCHIPP, R.; FLINDT, R. Zur feinstruktur und innervation der lymphherzmuskulatur der Amphibien (*Rana temporaria*). **Z. Anat. Entwickl. Gesch.**, v. 127, n. 3, p. 232-253, set. 1968.
- SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 5-6, p. 514-521, maio/jun. 2002.
- SEEBACHER, F.; FRANKLIN, C. E. Physiology of invasion: cane toads are constrained by thermal effects on physiological mechanisms that support locomotor performance. **J. Exp. Biol.**, v. 214, n. (Pt 9), p. 1437-1444, maio. 2011.
- SMITH, D. G.; BERGER, P. J.; EVANS, B. K. Baroreceptor control of heart rate in the conscious toad *Bufo marinus*. **Am. J. Physiol.**, v. 241, n. 5, p. R307-R311, nov. 1981.
- SMITH, S. A. Appendix: compendium of drugs and compounds used in amphibians. **ILAR J.**, v. 48, n. 3, p. 297-300, 2007.
- SMITS, A. W. Lack of edema in toad lungs after pulmonary hypertension. **Am. J. Physiol.**, v. 266, n. (4 Pt 2) p. R1338-R1344, abr. 1994.
- SMITS, A. W.; WEST, N. H.; BURGGREN, W. W. Pulmonary fluid balance following pulmocutaneous baroreceptor denervation in the toad. **J. Appl. Physiol.**, v. 61, n. 1, p. 331-337, jul. 1986.
- STEWART, J. M.; RIVERA, E.; CLARKE, D. A.; BAUGHAM, I. L.; OCON, A. J.; TANEJA, I.; TERILLI, C.; MEDOW, M. S. Ventilatory baroreflex sensitivity in humans is not modulated by chemoreflex activation. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 300, n. 4, p. H1492–H1500, abr. 2011.

STINNER, J. N. Cardiovascular and metabolic responses to temperature in *Coluber constrictor*. **Am. J. Physiol.**, v. 253, n. (2 Pt 2), p. R222-R227, ago. 1987.

VALLINOTO, M.; SEQUEIRA, F.; SODRÉ, D.; BERNARDI, J. A. R.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. **Zool. Scripta**, v. 39, n. 2, p. 128-140, mar. 2010.

VAN VLIET, B. N.; WEST, N. H. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the recurrent laryngeal nerve in conscious toads (*Bufo marinus*). **J. Comp. Physiol. B**, v. 156, n. 3, p. 363-375, maio. 1986.

_____. Response characteristics of pulmocutaneous arterial baroreceptors in the toad, *Bufo marinus*. **J. Physiol.**, v. 388, p. 55-70, jul. 1987a.

_____. Responses to circulatory pressures, and conduction velocity, of pulmocutaneous baroreceptors in *Bufo marinus*. **J. Physiol.**, v. 388, p. 41-53, jul. 1987b.

_____. Functional characteristics of arterial chemoreceptors in an amphibian (*Bufo marinus*). **Respir. Physiol.**, v. 88, n. 1-2, p. 113-127, abr./maio. 1992.

VASCONCELLOS, M. M., COLLI, G. R. Factors affecting the population dynamics of two toads (Anura: Bufonidae) in a seasonal neotropical savanna. *Copeia*, v. 2, p. 266-276, 2009.

WAHLQVIST, B. Y. I.; CAMPBELL, G. Autonomic influences on heart rate and blood pressure in the toad, *Bufo marinus*, at rest and during exercise. **J Exp Biol.**, v. 396, p. 377-396, jan. 1988.

WALKER, J. K.; JENNINGS, D. B. Respiratory effects of pressor and depressor agents in conscious rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 76, n. 7-8, p. 707-14, jul./ago. 1998.

WANG, T.; BRANCO, L. G.; GLASS, M. L. Ventilatory responses to hypoxia in the toad *Bufo paracnemis* before and after a decrease in haemoglobin oxygen-carrying capacity. **J. Exp. Biol.**, v. 186, p. 1-8, jan. 1994.

WEST, J.B. Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: the unique avian solution. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 297, n. 6, p. R1625-R1634, dez. 2009.

WEST, N. H.; VAN VLIET, B. N. Open-loop analysis of the pulmocutaneous baroreflex in the toad *Bufo marinus*. **Am. J. Physiol.**, v. 245, n. (5 Pt 1), p. R642-R650, nov. 1983.

_____. The role of arterial baroreceptors in the undivided circulation of anuran amphibians. **Physiol. Zool.**, v. 67, n. 6, p. 1305-1324, nov./dez. 1994.

WILLIAMSON, A. P.; SEIFEN, E.; LINDEMANN, J. P.; KENNEDY, R. H. Alpha 1a-adrenergic receptor mediated positive chronotropic effect in right atria isolated from rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 72, n. 12, p. 1574-1579, dez. 1994.

YAMANE M. The arterial baroreceptor-lymph heart inhibitory reflex and its pathway in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **Kawasaki Med. J.**, v. 16, n. 1, p. 93–100, 1990.

ZENA, L. A.; DANTONIO, V.; GARGAGLIONI, L. H.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; BÍCEGO, K. C. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. **J. Exp. Biol.**, v. 219, n. (Pt 5), p. 725-733, mar. 2016.

ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BICEGO, K. C. Role of brain nitric oxide in the cardiovascular control of bullfrogs. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 165, n. 2, p. 263-271, jun. 2013.

ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BICEGO, K. C. Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 179, p. 81-88, jan. 2015.

ZEWIFACH, B. W.; INTAGLIETTA, M. Measurement of blood plasma colloid osmotic pressure. II. Comparative study of different species. **Microvasc Res.**, v. 3, n. 1, p. 83-88, jan. 1971.

ZWEMER, R.; FOGLIA, V. Fatal loss of plasma volume after lymph heart destruction in toads. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 53, n. 1, p. 14–17, maio. 1943.

Apêndices

Apêndice A

**“Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the
toad, *Rhinella schneideri*”**



Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*



Lucas A. Zena, Luciane H. Gargaglioni, Kênia C. Bicego*

Department of Animal Morphology and Physiology, College of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil
National Institute of Science and Technology on Comparative Physiology (INCT- Fisiologia Comparada), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2014

Received in revised form 1 September 2014

Accepted 18 September 2014

Available online 28 September 2014

Keywords:

Baroreflex sensitivity

Amphibians

Blood pressure

Sodium nitroprusside

Phenylephrine

ABSTRACT

For an adequate blood supply to support metabolic demands, vertebrates regulate blood pressure to maintain sufficient perfusion to avoid ischemia and other tissue damage like edema. Using a pharmacological approach (phenylephrine and sodium nitroprusside) we investigated baroreflex sensitivity at 15, 25, and 30 °C in toads *Rhinella schneideri*. Baroreflex sensitivity presented a high thermal dependence ($Q_{10} = 1.9\text{--}4.1$), and the HR–baroreflex curve was shifted up and to the right as temperature increased from 15 to 30 °C. Baroreflex variables, namely, HR range, gain₅₀ (maximal gain) and normalized gain₅₀ increased 206, 235, and 160% from 15 to 30 °C, respectively. The cardiac limb of the baroreflex response to pharmacological treatments was significantly blunted after full autonomic blockade. In addition, there was a clear baroreflex–HR response mainly to hypotension at all three temperatures tested. These findings indicate that toads present temperature dependence for cardiac limb of the barostatic response and the cardiac baroreflex response in *R. schneideri* is primarily hypotensive rather than hypertensive as well as crocodylians and mammals. Thus, the cardiac baroreflex compensation to changes in arterial pressure might present different patterns among amphibian species, since the previously reported bradycardic compensation to hypertension in some anurans was not observed in the toad used in the present study.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Vertebrates are capable of regulating arterial blood pressure (AP) in order to maintain an adequate tissue blood perfusion, satisfying oxygen and nutrient delivery according to their metabolic demands. The maintenance of AP without extreme changes is also important to avoid tissue damage or edema due to high capillary pressures (Van Vliet and West, 1994; Hagensen et al., 2010).

Neural regulation of AP by baroreflex responses is reported to occur in many species of vertebrates including amphibians, reptiles, birds and mammals (Bagshaw, 1985; Altimiras et al., 1998; Crossley et al., 2003; Mueller et al., 2013). Anurans are known to have three populations of mechanoreceptors monitoring changes in AP that are located in the pulmocutaneous artery, carotid labyrinth, and aortic arch (Millard and Moalli, 1980; Ishii et al., 1985; Van Vliet and West, 1987a,b; Bianchi-da-Silva et al., 2000; Kusakabe, 2002). There is evidence that the pulmocutaneous baroreceptors are essential for monitoring imbalances in blood pressure during excessive hydrostatic

pressure in order to protect the delicate pulmonary microvasculature (Smits et al., 1986; Van Vliet and West, 1989; Smits, 1994). Bianchi-da-Silva et al. (2000) have addressed the importance of the contribution of aortic arch baroreceptors to cardiac buffer during lower pressure events, thereby avoiding decreases in tissue perfusion.

Amphibians are subjected to a wide range of environmental changes, and temperature is one of the most important factors that directly affect all physiological and biochemical processes; among them, cardiovascular functions (Glass et al., 1997; Bicego-Nahas and Branco, 1999; Bicego-Nahas et al., 2001; Seebacher and Franklin, 2011). Temperature changes seem to influence heart rate (HR) more than AP (Glass et al., 1997; Rocha and Branco, 1998; Bicego-Nahas and Branco, 1999; Gamperl et al., 1999; Liu and Li, 2005). Elevations in body temperature can increase HR mainly by direct effects on the sinoatrial node of the heart (Courtice, 1990; Liu and Li, 2005). A relatively unchanged AP during temperature elevation may occur as cardiac output increases with accompanying reductions in vascular resistance arising from vasodilation in the peripheral vascular beds (Lillywhite, and Seymour, 1978; Gamperl et al., 1999).

Across vertebrates there is little evidence of thermal influences on baroreflex sensitivity. As far as we know, there are studies in mammals (Masset et al., 2000; Sabharwal et al., 2004; Horwitz et al., 2013), and in the broad-nosed caiman *Caiman latirostres* (Hagensen et al., 2010); both are animals with two completely separated ventricles. In rats, both

* Corresponding author at: Via de acesso Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brazil. Tel.: +55 16 32092656; fax: +55 16 32024275.

E-mail addresses: kenciab@yahoo.com.br, kenciab@fcav.unesp.br (K.C. Bicego).

hypothermia during anesthesia (Sabharwal et al., 2004) and hyperthermia (Massett et al., 2000) attenuate the baroreflex–HR curve. It is interesting to note that for some mammals such as the Syrian Hamster it is quite normal for core temperature to approach environmental temperature during torpor events, during which baroreflex–HR sensitivity is reduced (Horwitz et al., 2013). In the broad-nosed caiman the cardiac limb of the baroreflex is temperature-dependent whereby changes in temperature from 15 to 30 °C shift the baroreflex–HR curve up and to the right (Hagensen et al., 2010). No studies have examined the effect of temperature on the cardiac baroreflex in anuran amphibians. In contrast to mammals, birds, and crocodylians, an incomplete separation in amphibians' ventricle may expose the pulmonary vasculature to imbalances in blood pressure unless an effective compensatory response blunts those changes. This compensation could be strongly affected by changes in temperature.

Based on the considerations presented above, the aim of this study was to characterize the effect of temperature on baroreflex responses in the South American toad *Rhinella schneideri* (formerly known as *Bufo paracnemis* or *Chauanus schneideri*; Frost et al., 2006). This species is a large toad widely distributed in open vegetation areas throughout the Brazilian central savanna region to the Argentine Chaco (Pramuk, 2006) although it occurs mainly in open and urban areas. All of these regions are subject to temperature changes on a daily and annual basis.

2. Material and methods

2.1. Animals

We used toads, *R. schneideri* (Werner, 1894), of both sexes, weighing 180–350 g. Toads were collected in swampy areas in the Ribeirão Preto region of São Paulo, Brazil (approximately 21° 10' S and 47° 48' W). In our laboratory at the Department of Animal Morphology and Physiology, UNESP, Jaboticabal, Brazil, all animals were maintained at 25 °C in a light/dark cycle of 12:12 h with free access to tap water from an artesian well and a basking area. They were housed in containers containing coconut fibers as a substrate with PVC tubes for hiding and were held under laboratory conditions at least three weeks before experimentation. Animals were fed with Darkling beetle larvae (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and captive bred crickets (*Gryllus sp*) two to three times a week.

All the experiments were performed from September to March, which matches the activity season of this species characterized by the rainy season (Glass et al., 1997; Bicego-Nahas et al., 2001). Animal collection was approved by the Brazilian environmental agency (SISBIO-ICMBio/n. 35484-1), and the study was conducted with the approval of the local Animal Care and Use Committee (CEUA-FCAV-UNESP; Protocol n. 017204/12).

2.2. Surgical procedures

Animals were anesthetized by immersion in an aqueous 0.25% solution of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222, Sigma, St. Louis, USA), buffered to pH 7.7 with sodium bicarbonate, for approximately 10 min until loss of the eye reflex. To measure pulsatile arterial pressure (PAP), a polyethylene cannula (PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA), filled with heparinized Ringer's solution (100 i.u. mL⁻¹ heparin) was occlusively inserted into the iliac artery and sutured in place. The same procedure was used to cannulate the femoral vein (100 i.u. mL⁻¹ heparin in Ringer's solution) for infusion of drugs. After surgery, toads were treated with a prophylactic antibiotic (enrofloxacin, Flotril®; Schering-Plough, 5.0 mg kg⁻¹ s.c.) and an analgesic (Flunixinina Meglumina, Banamine®; Schering-Plough, 1.0 mg kg⁻¹ s.c.), according to recommended dosages for amphibians (Gentz, 2007; Smith, 2007). After recovery from anesthesia, each animal was individually placed in a temperature controlled chamber at 25 °C in the experimental room where it was kept for a

minimum of 24 h without disturbance, until the beginning of the experimental procedure.

2.3. Drugs

Sodium nitroprusside dihydrate (SNP, nitric oxide donor), phenylephrine hydrochloride (PE, agonist of α -1 adrenergic receptors), atropine sulfate (antagonist of muscarinic receptors), and sotalol hydrochloride (antagonist of β -adrenergic receptors) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All drugs were dissolved in amphibian Ringer's solution.

2.4. Measurements of arterial blood pressure (AP)

Arterial cannulae were connected to a pressure transducer (MLT1199, ADInstruments®, Sydney, Australia), calibrated against a mercury column. The transducer was connected to a data acquisition system (PowerLab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sydney, Australia) via a bridge amplifier (FE221, ADInstruments®, Sydney, Australia). Heart rate was calculated from the PAP recording in real-time using the cyclic measurements tool from the Chart Software. Mean arterial pressure was automatically calculated from the PAP recording in real-time using the same tool from Chart Software.

2.5. Baroreflex assessment

The reflex response was evaluated as changes in MAP induced by intravenous infusion of PE (150 μ g mL⁻¹ at 0.1 mL min⁻¹) and the nitric oxide donor SNP (100 μ g mL⁻¹ at 0.1 mL min⁻¹) using an infusion pump (K.D. Scientific, Holliston, MA, USA) (Crestani et al., 2010). The drug infusions were randomized and adjusted to last 60 s, resulting in the injection of a total dose of 60 μ g kg⁻¹ for PE and 40 μ g kg⁻¹ for SNP, which caused maximal increase and decrease, respectively, of ~1.33 kPa (~10 mm Hg) at 25 °C. Gradual increases and decreases in MAP were matched with reflex HR changes beat-by-beat (see Fig. 2). The MAP and HR values obtained for each animal at each temperature across SNP and PE ramp infusions were plotted against each other and the four variable logistic function was fitted to the changes in MAP and HR (see Analysis of cardiac baroreflex). The baroreflex response resulted of combining the beat-by-beat data from both drug infusions stopped when pressure was maximal for PE and minimum for SNP. All doses were chosen based on a previous report using the same species (SNP and PE; Bianchi-da-Silva et al., 2000).

2.6. Experimental protocols

Experiments were conducted in unanesthetized, unrestrained and undisturbed toads. During the experiments, the toads were housed in an acrylic water-jacketed chamber kept at the experimental temperature of 15, 25 or 30 °C using a constant-temperature circulator bath (PolyScience 9112A11B Programmable Model 9112 Refrigerated Circulator). The toads were acclimated to each temperature for 12 h (starting at 24 h after surgery). The experimental chamber was continuously flushed with humidified room air and the temperature inside was continuously measured using a temperature sensor (MLT415/M Thermistor temperature sensor, ADInstruments®, Sydney, Australia).

After 60 min of basal recording of PAP, Ringer's solution (0.4 mL kg⁻¹) was infused into the femoral vein in order to verify any possible influence of the volume injection in MAP and HR. Toads used in this study received two sets of PE and SNP infusion to determine values of baroreflex activity at 15, 25, and 30 °C randomly. Each temperature was randomly tested over three consecutive days to allow the 12 h of acclimation to each one. Five animals from the experimental group at 25 °C were also tested for the full autonomic blockade of the heart (Altimiras et al., 1998; Hagensen et al., 2010). To this end the toads were pretreated intravenously with the β -adrenergic antagonist

sotalol (3.0 mg kg⁻¹) and the antagonist of muscarinic receptors atropine sulfate (3.0 mg kg⁻¹), and, following the full blockade, the protocol to quantify baroreflex sensitivity was again performed.

2.7. Analysis of cardiac baroreflex

Cardiac baroreflex function was investigated by analysis of the sigmoidal baroreflex curve. Using GraphPad Prism, MAP (kPa) plotted against HR (bpm) data were fitted to a four-variable sigmoidal logistic function as described previously (Reid, 1996):

$$HR = \frac{(A - D)}{1 + (MAP/C)^B} + D \tag{1}$$

where *A* is the maximum HR of the curve, and *D* is the minimum HR. *B* is the slope coefficient (a coefficient describing the distribution of gain along the curve). *C* is the MAP at the midpoint of the HR range (MAP₅₀), which represents the set-point of the baroreflex. The range of the baroreflex was calculated as the difference between the maximum and minimum HR (*A* – *D*). The maximum gain (Gain₅₀; in beats min⁻¹ kPa⁻¹) of the curve, which occurs when MAP equals *C*, was calculated by the equation below:

$$Gain_{50} = \frac{-B(A-D)}{4C} \tag{2}$$

The maximal gain was then normalized (unitless) for control MAP and HR (Berger et al., 1980; Crossley et al., 2003) in order to establish meaningful comparisons between treatments:

$$Gain_{50, norm} = Gain_{50}(MAP/HR) \tag{3}$$

2.8. Data analysis and statistics

Data are shown as means ± S.E.M. The effect of the pharmacological treatments on MAP and HR in different temperatures was analyzed through repeated measures two-way ANOVA (factors: time and temperature). The effect of temperature on basal MAP and HR as well as on maximal HR, minimal HR, HR range, slope coefficient, maximum gain, normalized gain, and MAP at the midpoint in the HR range was analyzed through one way-ANOVA. The effect of full autonomic blockade

on baroreflex responses to PE and SNP was also analyzed through one way-ANOVA. All statistical analyses were carried out using SigmaPlot version 11. In all cases of ANOVA analyses, the differences among means were further assessed by Tukey's post-hoc test and were considered to be significant where *P* < 0.05.

3. Results

3.1. Baroreflex recordings

Fig. 1 shows representative recordings of PAP, MAP and HR during phenylephrine and sodium nitroprusside infusions at 15, 25, and 30 °C. Notice that at 15 °C the whole effect of both drugs lasted longer than at higher temperatures (25 and 30 °C).

3.2. Effects of temperature on basal cardiovascular variables

Mean systemic arterial pressure and HR of toads at 15, 25, and 30 °C were 3.01 ± 0.26; 3.88 ± 0.25; 4.20 ± 0.44 kPa and 16.7 ± 1.81; 27.7 ± 2.59; 31.7 ± 2.72 beats min⁻¹, respectively (Table 1 and Fig. 4). Resting MAP was not significantly different among temperatures, and resting HR at 25 and 30 °C were statistically higher from 15 °C (*P* < 0.01; Table 1).

3.3. Effects of temperature on cardiovascular changes induced by phenylephrine (PE)

At 15, 25 and 30 °C, PE infusion caused a significant increase in MAP (15 °C: *P* < 0.001; 25 °C: *P* < 0.001; 30 °C: *P* < 0.001; Fig. 2A). Heart rate did not fall significantly after PE infusion (Fig. 2B). The increase in MAP by PE was not significantly different between 25 and 30 °C, but it was lower at 15 °C (15 vs 25 °C; *P* < 0.05, and 15 vs 30 °C; *P* < 0.05; Fig. 2A). HR values over time were lower at 15 °C compared to 25 and 30 °C (*P* < 0.01; Fig. 2B).

3.4. Effects of temperature on cardiovascular changes induced by sodium nitroprusside (SNP)

SNP infusions at different temperatures (15, 25, and 30 °C) caused a significant hypotensive effect (15 °C: *P* < 0.001; 25 °C: *P* < 0.001; 30 °C: *P* < 0.001; Fig. 2C) and tachycardia (15 °C: *P* < 0.001; 25 °C: *P* < 0.001;

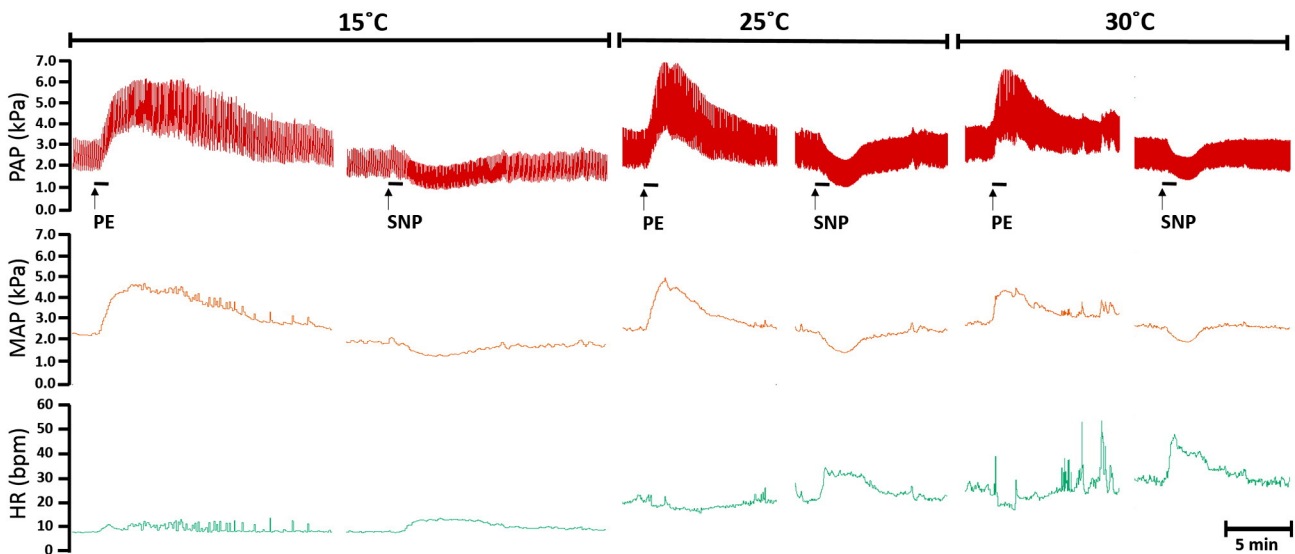


Fig. 1. Representative recordings of pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) of a toad illustrating reflex responses to the blood pressure increase and decrease caused by intravenous infusion (black lines represent the duration of infusion) of phenylephrine (PE) and sodium nitroprusside (SNP) at three different temperatures (15, 25, and 30 °C).

Table 1
Resting cardiovascular variables and baroreflex variables derived from sigmoidal baroreflex–HR curves generated after infusions of phenylephrine and sodium nitroprusside (Eq. (1)) at 15, 25, and 30 °C in toads *Rhinella schneideri*.

	15 °C	25 °C	30 °C
Resting variables			
MAP (kPa)	3.01 ± 0.26	3.88 ± 0.25	4.20 ± 0.44
HR (bpm)	16.7 ± 1.81 ^a	27.7 ± 2.59 ^b	31.7 ± 2.72 ^b
Baroreflex variables			
Minimum HR (bpm)	13.2 ± 1.75 ^a	22.3 ± 2.49 ^b	25.1 ± 1.61 ^b
Maximum HR (bpm)	23.8 ± 2.63 ^a	49.9 ± 3.97 ^b	57.1 ± 4.73 ^b
HR range (bpm)	10.6 ± 1.92 ^a	27.6 ± 4.10 ^b	32.0 ± 4.47 ^b
R ²	0.88 ± 0.02	0.87 ± 0.02	0.80 ± 0.03
Slope coefficient	9.89 ± 3.16	9.37 ± 1.61	12.7 ± 2.05
MAP ₅₀ (kPa)	2.83 ± 0.32	3.31 ± 0.20	3.88 ± 0.40
Gain ₅₀ (beats min ⁻¹ kPa ⁻¹)	-7.27 ± 1.44 ^a	-19.6 ± 3.27 ^b	-24.4 ± 4.15 ^b
Normalized gain ₅₀ (no units)	-1.33 ± 0.30 ^a	-2.90 ± 0.58 ^{ab}	-3.45 ± 0.84 ^b

Values indicated by different letters are significantly different among temperatures (one-way ANOVA, Tukey's test; $P < 0.05$). HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; R², correlation coefficient; slope coefficient, maximum slope of the linear portion of the curve; MAP₅₀, mean arterial pressure at the midpoint of the curve; gain₅₀, maximum gain. Data are expressed as mean ± S.E.M. $N = 7-10$.

30 °C: $P < 0.001$; Fig. 2D). The decrease in MAP over time was significantly reduced at 15 °C compared to 30 °C ($P < 0.01$), and the reflex tachycardia was statistically lower at 15 °C than 25 °C ($P < 0.001$) and 30 °C ($P < 0.001$).

3.5. Baroreflex control of HR: effects of temperature

Fig. 3 depicts the response to change in MAP with PE and SNP in baroreflex–HR curves at the three temperatures and measured for each animal. In all animals, decreases in MAP caused reflex tachycardia at all temperatures, but did not evoke a consistent bradycardic response with the increase of MAP.

Fig. 4 shows mean baroreflex–HR curves generated from all curves that are represented in Fig. 3 at 15, 25 and 30 °C. Decreases in temperature from 25 to 15 °C attenuated the baroreflex response, and

thereby shifted the curve to the left and down. Moreover, it caused a reduction of minimum and maximum HR by 40% ($P < 0.01$) and 52% ($P < 0.001$), respectively, and the HR range decreased by 62% ($P < 0.05$; Table 1). Maximum gain was 63% lower at 15 °C versus 25 °C ($P < 0.05$), while normalized gain was 54% lower at 15 °C; however it was not significantly different over this temperature range (Table 1). The MAP at the midpoint of the HR range (MAP₅₀) did not change at 15 °C compared to 25 °C (Table 1).

In animals exposed to 30 °C, a baroreflex–HR curve slightly shifted up and to the right was observed (Fig. 4); however, there were no significant changes in all variables derived from sigmoidal baroreflex curves between 25 and 30 °C (Table 1). Nevertheless, changes from 15 to 30 °C influenced the baroreflex variables: minimum and maximum HR increased by 86% ($P < 0.01$) and 140% ($P < 0.001$), respectively. The HR range, maximal gain and

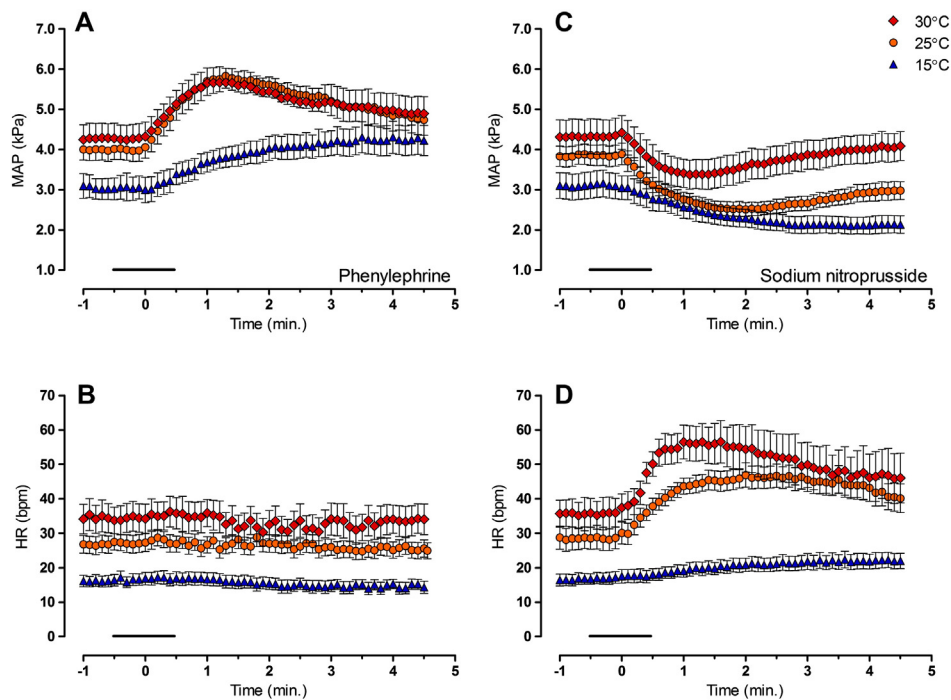


Fig. 2. Effects of intravenous infusion (black lines represent the duration of infusion) of 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of phenylephrine (PE; A and B) or 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of sodium nitroprusside (SNP; C and D) on mean arterial blood pressure (MAP; A and C) and heart rate (HR; B and D) in the toad *Rhinella schneideri* at 15 (blue triangle), 25 (yellow circles), and 30 °C (red square), respectively. $N = 7-10$. Data are expressed as means ± S.E.M. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

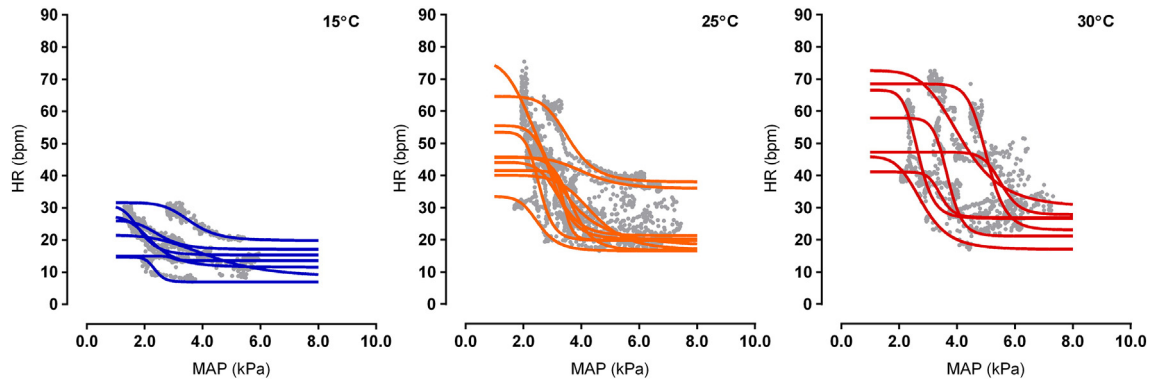


Fig. 3. Baroreflex curves of each animal at 15, 25 and 30 °C ($N = 7-10$) after pharmacologically induced changes in blood pressure in the toad *Rhinella schneideri*.

normalized gain increased by 206% ($P < 0.01$), 235% ($P < 0.01$) and 160% ($P < 0.05$), respectively (Table 1), while the MAP_{50} increased by 38%, which was not significantly different.

3.6. Effect of full autonomic blockade on baroreflex responses to PE and SNP

Fig. 5 depicts the effects of the full autonomic blockade of the heart with sotalol and atropine on the cardiovascular responses to PE and SNP at 25 °C. The reflex changes in HR were blunted by the full autonomic blockade ($P < 0.01$).

4. Discussion

The present study describes for the first time the effects of temperature on baroreflex regulation in the toad *R. schneideri*. Our results are consistent with a clear baroreflex–HR response primarily to hypotension at 15, 25 and 30 °C.

4.1. Critique of the method

The use of vasoactive drugs to change vascular resistance is the most common approach used to study baroreflex sensitivity in vertebrates; however, the method has some limitations: it is only possible to

evaluate the cardiac limb of the baroreflex (HR reflex response). Despite this, the pharmacological approach has the advantage of assessing the combined effect of all baroreceptor regions, which can be important because three distinct baroreceptive areas are described in amphibians, namely the aortic arch, carotid arch and pulmocutaneous artery (PCA) (Millard and Moalli, 1980; Ishii et al., 1985; Van Vliet and West, 1987a,b; Bianchi-da-Silva et al., 2000; Kusakabe, 2002).

Phenylephrine is widely used in baroreflex studies in mammals (Masset et al., 2000; Sabharwal et al., 2004) as well as in other vertebrates such as amphibians (Millard and Moalli, 1980; Bianchi-da-Silva et al., 2000) and reptiles (Berger et al., 1980; Millard and Moalli, 1980; Altimiras et al., 1998; Crossley et al., 2003; Hagensen et al., 2010). It was previously suggested that PE interferes with the assessment of baroreflex sensitivity by exerting a small direct positive chronotropic effect on the heart of mammals (Williamson et al., 1994). The absence of the reflex bradycardia, or minimum response, in our toads (Fig. 2) might suggest a positive chronotropic effect of PE in the heart which could mask the reflex response during vascular loading. In the case of anuran amphibians, some studies demonstrate small or no reflex reduction in HR by PE in *R. schneideri* (Bianchi-da-Silva et al., 2000) and *Rhinella marina* (Smith et al., 1981) but others show significant effects on HR in *Lithobates catesbeianus* (Millard and Moalli, 1980; Herman and Sandoval, 1983; Zena et al., 2013). We previously found a significant reflex bradycardia (decrease in HR of 10 bpm) after an intravenous bolus injection of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ PE (increase in AP of 10 mmHg) in *L. catesbeianus* (Zena et al., 2013). Thus, contrasting results among studies may underlie differences in the reflex responses among the anuran species.

4.2. Effects of temperature on baroreflex activity in the toad *R. schneideri*

Ectothermic vertebrates experience fluctuations in body temperature naturally, and they can avoid potential damage to the body from extreme temperatures by employing behavioral thermoregulation: shuttling between environments to lose or gain heat (Lillywhite, 1970; Bicego et al., 2007). It has been shown that the toad *R. schneideri* has a preferred body temperature around 23 to 27 °C in a thermal gradient ranging from 10 to 40 °C (Bicego-Nahas et al., 2001; Guerra et al., 2008). In the field demographic patterns for toads are mostly dependent on climatic factors such as rainfall and ambient temperature (Vasconcellos and Colli, 2009). Depending on the season in São Paulo State, Brazil, body temperatures are observed ranging from $\sim 13-17$ °C (minimum) to $\sim 27-31$ °C (maximum) of *R. schneideri* maintained in semi-natural, outdoor captivity (unpublished results).

In *R. schneideri*, temperature decrease from 25 to 15 °C caused a shift of the HR–baroreflex curve down and to the left while warming from 25 to 30 °C shifted the curve up and to the right (Fig. 4). Q_{10} effects of some baroreflex variables, such as HR range, gain₅₀, and

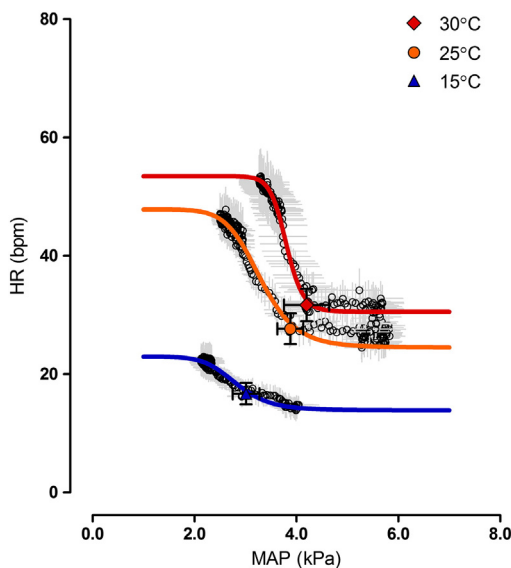


Fig. 4. Average baroreflex curves in the toad *Rhinella schneideri* obtained at 15, 25, and 30 °C. The relationship between mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) was generated from the mean values of the curve-fit variables for each animal (see Table 1). Each symbol is resting HR and MAP. $N = 7-10$. Data are expressed as means \pm S.E.M.

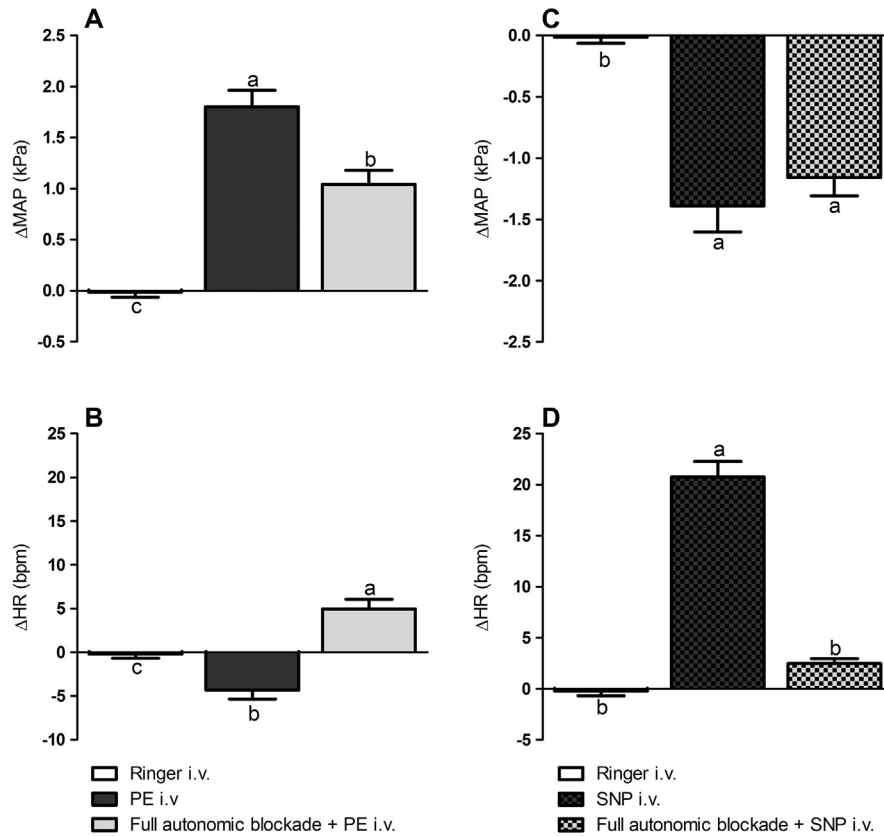


Fig. 5. Mean arterial blood pressure (Δ MAP; A and C) and heart rate (Δ HR; B and D) changes caused by intravenous infusion of Ringer's (vehicle), phenylephrine (PE; $60 \mu\text{g kg}^{-1}$) and sodium nitroprusside (SNP; $40 \mu\text{g kg}^{-1}$) before and after full autonomic blockade with atropine (3.0 mg kg^{-1}) plus sotalol (3.0 mg kg^{-1}) at 25°C in the toad *Rhinella schneideri*. Values indicated by different letters are significantly different from each other by Tukey's test ($P < 0.05$); $N = 5\text{--}10$. Data are expressed as means \pm S.E.M.

normalized gain₅₀, at $25\text{--}15^\circ\text{C}$ (8.3 ± 6.1 , 3.7 ± 1.7 , and 1.9 ± 0.9 , respectively) and $25\text{--}30^\circ\text{C}$ (2.3 ± 0.4 , 4.1 ± 2.1 , and 2.1 ± 0.8 , respectively) were higher than Q_{10} values for MAP₅₀, which presented a smaller thermal dependence for both temperature ranges ($15\text{--}25^\circ\text{C}$: $Q_{10} = 1.1 \pm 0.1$; $25\text{--}30^\circ\text{C}$: $Q_{10} = 1.5 \pm 0.4$). This is in agreement with small effects of temperature on MAP compared to HR previously reported in amphibians and reptiles (Lillywhite and Seymour, 1978; Rocha and Branco, 1998; Bicego-Nahas and Branco, 1999; Overgaard et al., 2012). As previously demonstrated in ectotherms, small or no changes in MAP may reflect alterations in vascular peripheral resistance in the opposite direction of the temperature changes (Lillywhite and Seymour, 1978; Stinner, 1987; Galli et al., 2004; Overgaard et al., 2012). It is important to mention that in our preliminary experiments a few animals were subjected to 35°C for baroreflex–HR sensitivity assessment (data not shown). PE infusions at this temperature changed the PAP pattern, which made baroreflex curve fitting difficult. The PE hypertensive peak was followed by few sparse beats interspersed with higher heart rate intervals, which may indicate an excess of vagal firing rate; however, according to Courtice (1990), increasing temperature causes a lower vagal effectiveness in reducing heart rate in pithed *R. marina* (a species phylogenetically close to *R. schneideri*; Maciel et al., 2010). Further studies are needed to clarify heart rate control at higher temperatures.

Temperature affected the latency of cardiovascular responses to PE and SNP. At 15°C PE took 4 min to reach maximum hypertensive effect in comparison with 1 min for 25 and 30°C (Fig. 2A). A maximum hypotensive effect of SNP at 15°C was reached in 2.5 min, 1 min longer than the maximum effect at 25 and 30°C (Fig. 2C). Changes in blood vessel reactivity to pharmacological treatments have previously been demonstrated during hyperthermia in rats (Massett et al., 1998; Massett et al.,

2000). In fact, both hypothermia and hyperthermia can change α -adrenergic responsiveness of blood vessels in mammals (cf. Ives et al., 2011). Besides thermal effects on central and peripheral components of the cardiovascular reflex in our toads, blood vessel reactivity to PE and SNP is also affected by temperature; this fits with the short and long-term effects of α -adrenergic agonists in the arterial system reported to be temperature dependent (5 and 22°C) in bullfrogs (Herman and Mata, 1985).

Complete separation between pulmonary and systemic circulations is only observed in mammals and birds; thus, pulmonary capillary pressures can be maintained low enough to avoid lesions in pulmonary tissue (West, 2009). In the evolutionary progression, crocodylians are the only ectotherms with complete anatomical separation of ventricles. In animals with four-chambered heart such as rats (Crestani et al., 2010) and crocodylians (Altimiras et al., 1998; Hagensen et al., 2010) cardiac reflex to decreases in AP is more pronounced than with hypertension. In contrast, the amphibian heart has an undivided ventricle which might expose pulmonary capillaries to a relatively high blood pressure resulting in pulmonary lesions (Van Vliet and West, 1989). In this case, changes in pulmonary arterial resistance can be adjusted by cholinergic vagal innervation of the PCA regulating pulmonary blood flow and changes in the net shunt flow (Emilio and Shelton, 1972; Langille and Jones, 1977; de Saint-Aubain and Wingstrand, 1979; Gamperl et al., 1999). Electrical stimulation of the recurrent laryngeal nerve, in which PCA baroreceptor afferents are contained, is capable of increasing pulmocutaneous resistance by 76% in parallel with a fall in pulmocutaneous blood pressure (Van Vliet and West, 1986). Moreover, denervation of PCA baroreceptors leads to transient increases in systemic AP, HR and pulmonary arterial blood flow which means they are tonically active, but not essential, for long-term regulation in AP (Hoffmann and de Souza, 1982; Smits et al., 1986; Van Vliet and West, 1989; Smits,

1994). In this scenario, potential risks for pulmonary edema might be avoided with an efficient lung atrial natriuretic factor (ANF) system (Glass et al., 1996), which together with other mechanisms, like an effective pulmonary lymph mobilization, may protect the lungs against changes in pulmonary blood flow (Smits, 1994).

It was previously suggested that anurans are capable of regulating systemic AP oscillations primarily under hypertension (Van Vliet and West, 1989); however, Bianchi-da-Silva et al. (2000) showed a significant tachycardic reflex to systemic AP falling by SNP in the toad *R. schneideri* which was reported to be regulated by the aortic arch baroreceptors since this response is inhibited by aortic arch, but not PCA, baroreceptor denervation. In *Lithobates catesbeianus*, despite the fact PE induces reflex bradycardia (Zena et al., 2013), SNP induced a prominent reflex tachycardia (Zena, unpublished data), indicating a strong cardiac compensation to hypotension in this species. Our results are clearly consistent with a vigorous response to systemic hypotension rather than hypertension in *R. schneideri* that is more pronounced at 25–30 °C than 15 °C (resting MAP lies above MAP₅₀ value on the curve, corresponding to the maximum gain) (Fig. 4 and Table 1). Our results and the evidence for reduced systemic and especially pulmonary resistances in resting *R. marina* at 30 °C compared to 20 and 10 °C (Hedrick et al., 1999) give support to the idea that baroreflex responses to hypotension play a major role in avoiding further reductions in resistance in anurans during warm conditions. Moreover, the minimum non-significant reflex bradycardia observed at all temperatures tested (Figs. 2 and 4) might be accompanied by vagal activity contracting smooth muscle on the PCA (de Saint-Aubain and Wingstrand, 1979; Emilio and Shelton, 1972; Gamperl et al., 1999; Langille and Jones, 1977). At least in resting *R. marina* at 25 °C, Gamperl et al. (1999) reported a sustained two-fold increase of pulmocutaneous blood flow (from 30.3 ± 3.8 to 63.8 ± 7.4 ml min⁻¹ kg⁻¹) and just a slight increase in HR (from 49.3 ± 6.5 to 53.4 ± 5.8 min⁻¹) following arterial injection of atropine. They also demonstrated a greatly reduced pulmonary-to-systemic shunt after atropine injection that the authors interpreted as a strong vagal tone on the pulmocutaneous artery in their animals. Whether there is differential vagal control of heart and PCA resistance during hypertension in different temperatures remains to be investigated.

In conclusion, the present study provides evidence that baroreflex sensitivity in toads *R. schneideri* is temperature dependent, shifting the HR–baroreflex curve up and to the right from 15 to 30 °C. These cardiac compensatory responses can be very important for a species of Bufonidae that is widespread and found in various habitats like the Chaco, Cerrado, and Atlantic Forest regions in South America besides being easily found in open and urban areas. All of these environments have variable circadian and circannual temperatures. Furthermore, our data is in agreement with previously baroreflex closed-loop data in *R. schneideri* (Bianchi-da-Silva et al., 2000), in which indicate a more prominent cardiac reflex compensation to AP unloading than to loading—like crocodilians and mammals—in order to match oxygen delivery and metabolic demands mainly in warm conditions. In contrast, the cardiac baroreflex response to AP loading previously suggested for amphibians might be different among anuran species.

Acknowledgment

The present study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP [08/57712-4 (INCT-Fisiologia Comparada); 2012/17379-0 (2nd year PhD fellowship to LAZ)] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 1st year PhD fellowship to LAZ). This study was part of the activities developed by L.A. Zena during his PhD at the Joint Graduate Program in Physiological Sciences (PIPGCF) from UFSCar/UNESP. We are grateful to Lynn Hartzler for grammatical corrections to the manuscript, Matheus Henrique Marconi and Francine de Campos Silvério (PIBIC-Jr-CNPq) for contributing to maintenance of the

animals, and Carlos Crestani for suggestions to some experimental protocols. Additionally, we are grateful to Dane Crossley for discussion on data analysis and many helpful suggestions as well as anonymous reviewers for improvements to our manuscript.

References

- Altimiras, J., Franklin, C.E., Axelsson, M., 1998. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. *J. Exp. Biol.* 201, 2235–2242.
- Bagshaw, R.J., 1985. Evolution of cardiovascular baroreceptor control. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 60, 121–162.
- Berger, P.J., Evans, B.K., Smith, D.G., 1980. Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard *Trachydosaurus rugosus*. *J. Exp. Biol.* 86, 197–209.
- Bianchi-da-Silva, L.M., Menescal-de-Oliveira, L., Hoffmann, A., 2000. Baroreceptor control of heart rate in the awake toad: peripheral autonomic effectors and arterial baroreceptor areas. *J. Auton. Nerv. Syst.* 80, 31–39.
- Bicego, K.C., Barros, R.C., Branco, L.G., 2007. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 147, 616–639.
- Bicego-Nahas, K.C., Branco, L.G., 1999. Seasonal changes in the cardiorespiratory responses to hypercarbia and temperature in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 124, 221–229.
- Bicego-Nahas, K.C., Gargaglioni, L.H., Branco, L.G., 2001. Seasonal changes in the preferred body temperature, cardiovascular, and respiratory responses to hypoxia in the toad, *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Zool.* 289, 359–365.
- Courtice, G.P., 1990. Effect of temperature on cardiac vagal action in the toad *Bufo marinus*. *J. Exp. Biol.* 149, 439–447.
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Busnardo, C., Resstel, L.B., Correa, F.M., 2010. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neurosci. Res.* 67, 317–326.
- Crossley II, D.A., Hicks, J.W., Altimiras, J., 2003. Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Biol.* 206, 2895–2902.
- de Saint-Aubain, M.L., Wingstrand, K.G., 1979. A sphincter in the pulmonary artery of the frog *Rana temporaria* and its influence on blood flow in skin and lungs. *Acta Zool.* 60, 163–172.
- Emilio, M.G., Shelton, G., 1972. Factors affecting blood flow to the lungs in the amphibian, *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.* 56, 67–77.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., Sa, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., Wheeler, W.C., 2006. The amphibian tree of life. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 297, 1–371.
- Galli, G., Taylor, E.W., Wang, T., 2004. The cardiovascular responses of the freshwater turtle *Trachemys scripta* to warming and cooling. *J. Exp. Biol.* 207, 1471–1478.
- Gamperl, A.K., Milson, W.K., Farrell, A.P., Wang, T., 1999. Cardiorespiratory responses of the toad (*Bufo marinus*) to hypoxia at two different temperatures. *J. Exp. Biol.* 202, 3647–3658.
- Gentz, E.J., 2007. Medicine and surgery of amphibians. *ILAR J.* 48, 255–259.
- Glass, M.L., Branco, L.G., Antunes-Rodrigues, J., Gutkowska, J., 1996. Characterization of the atrial natriuretic factor system in lungs of the toad *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Biol.* 199, 1493–1499.
- Glass, M.L., Fernandes, M.S., Soncini, R., Glass, H., Wasser, J.S., 1997. Effects of dry season dormancy on oxygen uptake, heart rate, and blood pressures in the toad, *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Zool.* 279, 330–336.
- Guerra, A.R., Gargaglioni, L.H., Noronha-De-Souza, C.R., Abe, A.S., Branco, L.G., Bicego, K.C., 2008. Role of central nitric oxide in behavioral thermoregulation of toads during hypoxia. *Physiol. Behav.* 95, 101–107.
- Hagensen, M.K., Abe, A.S., Wang, T., 2010. Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 156, 458–462.
- Hedrick, M.S., Palioca, W.B., Hillman, S.S., 1999. Effects of temperature and physical activity on blood flow shunts and intracardiac mixing in the toad *Bufo marinus*. *Physiol. Biochem. Zool.* 72, 509–519.
- Herman, C.A., Mata, P.L., 1985. Catecholamine effects on blood pressure and heart rate in warm- and cold-acclimated American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 434–441.
- Herman, C.A., Sandoval, E.J., 1983. Catecholamine effects on blood pressure and heart rate in the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 52, 142–148.
- Hoffmann, A., de Souza, M.B., 1982. Cardiovascular reflexes in conscious toads. *J. Auton. Nerv. Syst.* 5, 345–355.
- Horwitz, B.A., Chau, S.M., Hamilton, J.S., Song, C., Gorgone, J., Saenz, M., Horowitz, J.M., Chen, C.Y., 2013. Temporal relationships of blood pressure, heart rate, baroreflex function, and body temperature change over a hibernation bout in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R759–R768.
- Ishii, K., Ishii, K., Kusakabe, T., 1985. Chemo- and baroreceptor innervation of the aortic trunk of the toad *Bufo vulgaris*. *Respir. Physiol.* 60, 365–375.
- Ives, S.J., Andbacka, R.H., Noyes, R.D., McDaniel, J., Amann, M., Witman, M.A., Symons, J.D., Wray, D.W., Richardson, R.S., 2011. Human skeletal muscle feed arteries studied in vitro: the effect of temperature on alpha(1)-adrenergic responsiveness. *Exp. Physiol.* 96, 907–918.
- Kusakabe, T., 2002. Carotid labyrinth of amphibians. *Microsc. Res. Tech.* 59, 207–226.
- Langille, B.L., Jones, D.R., 1977. Dynamics of blood flow through the hearts and arterial systems of anuran amphibia. *J. Exp. Biol.* 68, 1–17.

- Lillywhite, H.B., 1970. Behavioral temperature regulation in the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1970, 158–168.
- Lillywhite, H.B., Seymour, R.S., 1978. Regulation of arterial blood pressure in Australian tiger snakes. *J. Exp. Biol.* 75, 65–79.
- Liu, C.B., Li, R.D., 2005. Electrocardiogram and heart rate in response to temperature acclimation in three representative vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 142, 416–421.
- Maciel, N.M., Collevatti, R.G., Colli, G.R., Schwartz, E.F., 2010. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 787–797.
- Massett, M.P., Lewis, S.J., Kregel, K.C., 1998. Effect of heating on the hemodynamic responses to vasoactive agents. *Am. J. Physiol.* 275, R844–R853.
- Massett, M.P., Lewis, S.J., Stauss, H.M., Kregel, K.C., 2000. Vascular reactivity and baroreflex function during hyperthermia in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1282–R1289.
- Millard, R.W., Moalli, R., 1980. Baroreflex sensitivity in an amphibian, *Rana catesbeiana*, and a reptilian, *Pseudemys scripta elegans*. *J. Exp. Zool.* 213, 283–288.
- Mueller, C.A., Burggren, W.W., Crossley II, D.A., 2013. ANG II and baroreflex control of heart rate in embryonic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R855–R863.
- Overgaard, J., Andersen, J.L., Findsen, A., Pedersen, P.B., Hansen, K., Ozolina, K., Wang, T., 2012. Aerobic scope and cardiovascular oxygen transport is not compromised at high temperatures in the toad *Rhinella marina*. *J. Exp. Biol.* 215, 3519–3526.
- Pramuk, J.B., 2006. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zool. J. Linnean Soc.* 146, 407–452.
- Reid, I.A., 1996. Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. *News Physiol. Sci.* 11, 270–274.
- Rocha, P.L., Branco, L.G., 1998. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Biol.* 201, 761–768.
- Sabharwal, R., Coote, J.H., Johns, E.J., Egginton, S., 2004. Effect of hypothermia on baroreflex control of heart rate and renal sympathetic nerve activity in anaesthetized rats. *J. Physiol.* 557, 247–259.
- Seebacher, F., Franklin, C.E., 2011. Physiology of invasion: cane toads are constrained by thermal effects on physiological mechanisms that support locomotor performance. *J. Exp. Biol.* 214, 1437–1444.
- Smith, S.A., 2007. Appendix: compendium of drugs and compounds used in amphibians. *ILAR J.* 48, 297–300.
- Smith, D.G., Berger, P.J., Evans, B.K., 1981. Baroreceptor control of heart rate in the conscious toad *Bufo marinus*. *Am. J. Physiol.* 241, R307–R311.
- Smits, A.W., 1994. Lack of edema in toad lungs after pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 266, R1338–R1344.
- Smits, A.W., West, N.H., Burggren, W.W., 1986. Pulmonary fluid balance following pulmocutaneous baroreceptor denervation in the toad. *J. Appl. Physiol.* 61, 331–337.
- Stinner, J.N., 1987. Cardiovascular and metabolic responses to temperature in *Coluber constrictor*. *Am. J. Physiol.* 253, R222–R227.
- Van Vliet, B.N., West, N.H., 1986. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the recurrent laryngeal nerve in conscious toads (*Bufo marinus*). *J. Comp. Physiol. B.* 156, 363–375.
- Van Vliet, B.N., West, N.H., 1987a. Response characteristics of pulmocutaneous arterial baroreceptors in the toad, *Bufo marinus*. *J. Physiol.* 388, 55–70.
- Van Vliet, B.N., West, N.H., 1987b. Responses to circulatory pressures, and conduction velocity, of pulmocutaneous baroreceptors in *Bufo marinus*. *J. Physiol.* 388, 41–53.
- Van Vliet, B.N., West, N.H., 1989. Cardiovascular responses to denervation of pulmocutaneous baroreceptors in toads. *Am. J. Physiol.* 256, R946–R954.
- Van Vliet, B.N., West, N.H., 1994. Phylogenetic trends in the baroreceptor control of arterial blood pressure. *Physiol. Zool.* 67, 1284–1304.
- Vasconcellos, M.M., Colli, G.R., 2009. Factors affecting the population dynamics of two toads (Anura: Bufonidae) in a seasonal neotropical savanna. *Copeia* 266–276.
- Werner, F., 1894. *Herpetologische Nova. Zool. Anz.* 17, 410–415.
- West, J.B., 2009. Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: the unique avian solution. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1625–R1634.
- Williamson, A.P., Seifen, E., Lindemann, J.P., Kennedy, R.H., 1994. Alpha 1a-adrenergic receptor mediated positive chronotropic effect in right atria isolated from rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72, 1574–1579.
- Zena, L.A., Gargaglioni, L.H., Bicego, K.C., 2013. Role of brain nitric oxide in the cardiovascular control of bullfrogs. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 165, 263–271.

Apêndice B

“Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*”

RESEARCH ARTICLE

Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*

Lucas A. Zena^{1,2,*}, Valter Dantonio^{1,2,*}, Luciane H. Gargaglioni^{1,2}, Denis V. Andrade^{2,3}, Augusto S. Abe^{2,3} and Kênia C. Bicego^{1,2,†}

ABSTRACT

Baroreflex regulation of blood pressure is important for maintaining appropriate tissue perfusion. Although temperature affects heart rate (f_H) reflex regulation in some reptiles and toads, no data are available on the influence of temperature-independent metabolic states on baroreflex. The South American tegu lizard *Salvator merianae* exhibits a clear seasonal cycle of activity decreasing f_H along with winter metabolic downregulation, independent of body temperature. Through pharmacological interventions (phenylephrine and sodium nitroprusside), the baroreflex control of f_H was studied at $\sim 25^\circ\text{C}$ in spring–summer- and winter-acclimated tegus. In winter lizards, resting and minimum f_H were lower than in spring–summer animals (respectively, 13.3 ± 0.82 versus 10.3 ± 0.81 and 11.2 ± 0.65 versus 7.97 ± 0.88 beats min^{-1}), while no acclimation differences occurred in resting blood pressure (5.14 ± 0.38 versus 5.06 ± 0.56 kPa), baroreflex gain (94.3 ± 10.7 versus $138.7 \pm 30.3\%$ kPa^{-1}) or rate-pressure product (an index of myocardial activity). Vagal tone exceeded the sympathetic tone of f_H , especially in the winter group. Therefore, despite the lower f_H , winter acclimation does not diminish the f_H baroreflex responses or rate-pressure product, possibly because of increased stroke volume that may arise because of heart hypertrophy. Independent of acclimation, f_H responded more to hypotension than to hypertension. This should imply that tegus, which have no pressure separation within the single heart ventricle, must have other protection mechanisms against pulmonary hypertension or oedema, presumably through lymphatic drainage and/or vagal vasoconstriction of pulmonary artery. Such a predominant f_H reflex response to hypotension, previously observed in anurans, crocodylians and mammals, may be a common feature of tetrapods.

KEY WORDS: Adrenergic receptors, Baroreceptor, Blood pressure, Cholinergic tone, Hibernation, Seasonal changes

INTRODUCTION

Baroreflex regulation of arterial blood pressure is important to the maintenance of adequate tissue perfusion and thus matching oxygen and nutrient delivery to metabolic demands (Bagshaw, 1985; Hagensen et al., 2010; Zena et al., 2015). With respect to ectothermic reptiles, there is evidence of baroreceptors that monitor blood pressure in turtles (Millard and Moalli, 1980;

Stephens et al., 1983; Crossley et al., 2015), snakes (Lillywhite and Seymour, 1978; Lillywhite and Gallagher, 1985), the lizard *Tiliqua rugosa* (formerly known as *Trachydosaurus rugosus*; Berger et al., 1980) and crocodylians (Altimiras et al., 1998; Crossley et al., 2003; Hagensen et al., 2010).

Baroreflex regulation in crocodylians is characterized by a pronounced heart rate (f_H) reflex response to hypotension, as has been reported for the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*, and the broad-snouted caiman, *Caiman latirostris* (Altimiras et al., 1998; Hagensen et al., 2010). It is interesting to note that baroreflex sensitivity is enhanced at a high temperature (30°C) in *C. latirostris* (Hagensen et al., 2010), and also in the toad *Rhinella schneideri* (Zena et al., 2015), but the ability to respond mainly to hypotension is preserved regardless of temperature in both species. Temperature is known to directly influence metabolic rate and the cardiovascular adjustments to the new metabolic demands seem to be a proportional response (Piercy et al., 2015). In contrast, there are situations when metabolic rate can be downregulated independent of temperature in ectotherms; for example, when they are seasonally exposed to adverse environmental conditions and enter the physiological/behavioural state of hibernation or aestivation (Abe, 1995; Glass et al., 1997; Bicego-Nahas et al., 2001; Andrade et al., 2004; Milsom et al., 2008; Navas and Carvalho, 2010). Seasonal reductions in metabolic rate of ectotherms is marked by profound temperature-independent suppression of many physiological and biochemical processes (Navas and Carvalho, 2010), including reduction in f_H (Delaney et al., 1974; Glass et al., 1997; Bicego-Nahas et al., 2001; da Silva et al., 2008; Sanders et al., 2015).

The South American tegu lizard *Salvator merianae* (Harvey et al., 2012), formerly known as *Tupinambis merianae* (Duméril and Bibron 1938), exhibits a pronounced seasonal cycle of activity/inactivity. During spring and summer, tegus are diurnally active (Klein et al., 2006). As winter approaches, animals retreat to underground burrows and actively suppress metabolism (Lopes and Abe, 1999; Sanders et al., 2015) even though ambient temperatures in winter in southeastern Brazil are relatively benign (tegu burrows can reach $\sim 17^\circ\text{C}$; Abe, 1995; Andrade et al., 2004; Sanders et al., 2015). Investigations of seasonal energy metabolism, ventilation and cardiac morphology in tegus have focused on the underlying mechanism(s) of metabolic suppression (Abe, 1983; Andrade and Abe, 1999; de Souza et al., 2004; Milsom et al., 2008; Toledo et al., 2008; da Silveira et al., 2013) and have elucidated reduced thermal sensitivity of metabolic rate in dormant tegus (Abe, 1995; Milsom et al., 2008; Sanders et al., 2015). Therefore, this species is especially important as a model for investigating f_H baroreflex responses independent of temperature because it may undergo changes in cardiovascular autonomic balance across seasons.

In the present study, we hypothesize that the metabolic reduction of winter-acclimated *S. merianae* decreases f_H baroreflex sensitivity along with the suppression of other cardiovascular variables in

¹Department of Animal Morphology and Physiology, College of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil. ²National Institute of Science and Technology – Comparative Physiology (INCT – Fisiologia Comparada), 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil. ³Department of Zoology, Institute of Bioscience, São Paulo State University, Rio Claro, São Paulo 13506-900, Brazil.

*These authors contributed equally to this study

†Author for correspondence (keniacb@yahoo.com.br, keniabcf@fca.unesp.br)

List of symbols and abbreviations

f_H	heart rate
PAP	pulsatile arterial pressure
P_D	diastolic pressure
PE	phenylephrine
P_{MA}	mean arterial blood pressure
P_S	systolic pressure
RPP	rate-pressure product
SNP	sodium nitroprusside

comparison to the spring–summer-acclimated animals at the same ambient temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$). To this end, peripheral injections of sodium nitroprusside (SNP), a vasodilator, and the $\alpha 1$ -adrenergic agonist phenylephrine (PE), a vasoconstrictor, were performed to evaluate the reflex responses of f_H against changes in blood pressure. In addition, adrenergic and cholinergic tones on the heart were determined, and a full autonomic blockade was performed to test the relative role of sympathetic and parasympathetic modulation on the tegu f_H response to hypotension and hypertension. In addition, the underlying influences of α - and β -adrenergic receptors in the tegu cardiovascular system were measured.

MATERIALS AND METHODS**Animals**

Experiments were conducted on unanaesthetized tegu lizards *S. merianae*. Tegus of both sexes had been captive bred at the Jacarezário, São Paulo State University, in Rio Claro, São Paulo state (IBAMA permit no. 02001-000412/94-28 and SISBIO-ICMBio/n. 26677-1). Different young animals, during their second year cycle, were used for the spring–summer (from October to February; 586.2 ± 72.2 g body mass) versus the winter (July; 392 ± 30.67 g) experiments, which were performed in two consecutive years. At least 3 weeks before the experiments were initiated, animals were group-housed indoors in plastic boxes ($70 \times 70 \times 100$ cm) lined with wood shavings and containing PVC tubes for sheltering. During the spring–summer season, tegus were maintained under a natural photoperiod and fed with chicken eggs and fruits three times per week until 7 days before surgery. Water was available *ad libitum*. A source of heat for thermoregulation was provided by a heating lamp programmed to turn on at 09:00 h and turn off at 17:00 h, except for the week before surgery. Temperatures varied from 23 – 25°C (lamp off) to 33 – 35°C (lamp on). During winter months, tegus were maintained in darkness at 23 – 25°C with no source of heat and no food. These animals, even in captivity, voluntarily stop eating at the beginning of winter (K.C.B., personal observations; Andrade and Abe, 1999; de Souza et al., 2004). This study was conducted with the approval of the local ethical committee of São Paulo State University (CEUA; protocol no. 021802-07).

Drugs

SNP (nitric oxide donor), PE (agonist of $\alpha 1$ -adrenergic receptors), atropine (antagonist of muscarinic receptors), sotalol (antagonist of β -adrenergic receptors), prazosin (antagonist of $\alpha 1$ -adrenergic receptors) and isoproterenol (agonist of β -adrenergic receptors) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). All drugs were dissolved in sterile saline.

Surgery

Lizards were anaesthetized with 5% isoflurane in 100% oxygen, via face mask, in an open circuit. After induction, the trachea was intubated with an endotracheal tube inserted through the mouth; the endotracheal tube was fitted for the animal's trachea. Isoflurane (~ 1 Vol%) was

Table 1. Resting cardiovascular and baroreflex variables derived from sigmoidal baroreflex–heart rate (f_H) curves generated after bolus injections of phenylephrine and sodium nitroprusside (Eqn 1) for spring–summer- and winter-acclimated tegus, *Salvator merianae*

	Spring– summer	Winter
Resting variables		
P_{MA} (kPa)	5.14 ± 0.38	5.06 ± 0.56
f_H (beats min^{-1})	13.3 ± 0.82	$10.3 \pm 0.81^*$
RPP (kPa min^{-1})	86.0 ± 10.5	70.6 ± 12.4
Baroreflex variables		
Minimum f_H (beats min^{-1})	11.2 ± 0.65	$7.97 \pm 0.88^*$
Maximum f_H (beats min^{-1})	35.9 ± 2.10	33.5 ± 5.43
f_H range (beats min^{-1})	24.7 ± 1.97	25.5 ± 4.67
R^2	0.92 ± 0.02	0.86 ± 0.06
Slope coefficient (beats min^{-1} kPa^{-1})	10.7 ± 1.21	10.2 ± 1.63
$P_{MA,50}$ (kPa)	3.38 ± 0.17	3.86 ± 0.29
G_{50} (beats min^{-1} kPa^{-1})	20.1 ± 3.21	17.4 ± 4.56
Normalized gain (% kPa^{-1})	94.3 ± 10.7	138.7 ± 30.3

*Indicates a significant difference between seasons (Student's *t*-test; $P < 0.05$). P_{MA} , mean arterial blood pressure; RPP, rate-pressure product; R^2 , coefficient of determination; slope coefficient, slope of the linear portion of the curve; $P_{MA,50}$, mean arterial blood pressure at the midpoint of the curve; G_{50} , maximum gain. Winter ($N=5$); spring–summer ($N=11$).

delivered with 0.5 l min^{-1} oxygen flow from an agent-specific vaporizer (VetCase, Brasmed, São Paulo, Brazil). The depth of anaesthesia was monitored during the surgical procedure by maintaining breathing frequency at 1 – 2 breaths min^{-1} . A polyethylene cannula (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) made from a connection between a PE-10 cannula and a PE-50 cannula filled with heparinized 0.9% NaCl solution (100 i.u. ml^{-1} heparin) was occlusively inserted into the femoral artery for the measurement of pulsatile arterial pressure (PAP). The same procedure was followed to cannulate the femoral vein for drug injections. After surgery, animals received intramuscular injections of an analgesic (flunixin meglumine; 1 mg kg^{-1}) and an antibiotic (enrofloxacin; 5 mg kg^{-1}) agent according to recommended dosages for reptiles (Martinez-Jimenez and Hernandez-Divers, 2007; Mosley, 2011). After recovery from anaesthesia, each animal was individually placed in an experimental chamber, where it was kept for a minimum of 24 h without disturbance until the beginning of the experimental procedure.

Measurements of blood pressure and heart rate

The arterial cannula was connected to a pressure transducer (TSD 104A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA) calibrated against a mercury column. The signal from the pressure transducer was collected by an acquisition system (Biopac Systems model MP 100A-CE). Heart rate was derived from the PAP signal and mean arterial blood pressure (P_{MA}) was calculated as $P_{MA} = P_D + 1/3(P_S - P_D)$, where P_D is the diastolic pressure and P_S is the systolic pressure. Rate-pressure product (RPP), as a measure of myocardial activity, was calculated as $f_H \times P_S$ (kPa min^{-1}).

Experimental protocols

All experiments were conducted in tegus at an ambient temperature of $25.5^\circ\text{C} \pm 1.5^\circ\text{C}$, measured by a temperature sensor connected to an acquisition system (Biopac Systems model MP 100A-CE). After a 30–40 min basal recording of PAP, 0.5 ml kg^{-1} of saline was injected into the femoral vein to verify the possibility that the injection per se may influence P_{MA} and f_H . Serial increasing doses of SNP (2.5 , 5.0 , 10.0 and $25.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) and PE (5.0 , 10.0 , 25.0 and $50.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) were then injected (0.25 ml kg^{-1} followed by

0.25 ml kg⁻¹ of saline during 1 min). Each dose was injected only after the recorded cardiovascular variables had returned to the pre-injection values. This baroreflex protocol was performed in both spring–summer- and winter-acclimated animals. Because no difference in baroreflex sensitivity was observed between groups (Table 1), the pharmacological autonomic blockade of the f_H reflex responses was only performed in spring–summer tegus. To this end, atropine (1.5 mg kg⁻¹; muscarinic antagonist) plus sotalolol (6.0 mg kg⁻¹; β -adrenergic antagonist) were injected before PE (25.0 μ g kg⁻¹) or SNP (10.0 μ g kg⁻¹). Spring–summer animals were further tested to verify the influence of α 1- and β -adrenergic receptors on P_{MA} and f_H (the mechanism that underlies the hypertensive response to PE, the tachycardic response to isoproterenol, as well as the effectiveness of drugs): (1) injection of prazosin (0.2 mg kg⁻¹; α 1-adrenergic antagonist) alone or combined with PE (25.0 μ g kg⁻¹) and (2) injection of sotalolol (6.0 mg kg⁻¹) alone or combined with isoproterenol (2.5 μ g kg⁻¹; β -adrenergic antagonist). All doses were chosen on the basis of preliminary experiments and previous reports on reptiles (Altimiras et al., 1998; Skovgaard et al., 2005; Hagensen et al., 2010).

Analysis of the baroreflex

f_H (beats min⁻¹) was plotted against P_{MA} (kPa) data for each serial increasing dose of SNP and PE for each individual animal. The relationship between P_{MA} and f_H for each tegu was analyzed using a four-variable sigmoidal logistic function as described previously by Reid (1996):

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

where A is the maximum f_H (beats min⁻¹), D is the minimum f_H of the curve, B is the slope coefficient (beats min⁻¹ kPa⁻¹), and C is the P_{MA} at the midpoint of the f_H range ($P_{MA,50}$; kPa), which represents the set-point of the baroreflex. The range of the baroreflex was calculated as the difference between the maximum and minimum f_H ($A - D$). The maximum gain (G_{50} ; in beats min⁻¹ kPa⁻¹) of the curve, which occurs when P_{MA} equals C , was determined by taking

the first derivative of the Eqn 1 resulting in the gain equation below:

$$G_{50} = \frac{-B(A - D)}{4C}. \quad (2)$$

In addition, to establish meaningful comparisons between groups (spring–summer versus winter), gain was normalized by recalculating it as the percentage change in f_H per unit change in P_{MA} relative to the minimum heart rate (D) (Berger et al., 1980; Altimiras et al., 1998):

$$G = \frac{100B}{D}. \quad (3)$$

Calculation of adrenergic and cholinergic tones

The adrenergic and cholinergic tones on the heart were calculated based on the cardiac interval ($1/f_H$; in s) derived from the P_S pulse. For this, changes in the cardiac interval induced by atropine (1.5 mg kg⁻¹) or sotalolol (6.0 mg kg⁻¹) were expressed relative to the intrinsic cardiac interval obtained after full autonomic blockade (atropine+sotalolol) of the heart (Altimiras et al., 1997).

Statistical analysis

Data are shown as means \pm s.e.m. The effect of the pharmacological treatments on P_{MA} and f_H between winter and spring–summer animals was analyzed through two-way repeated-measures ANOVA (factors: PE or SNP serial doses and season), and the differences among means were assessed by Tukey's *post hoc* test. A two-way ANOVA was used to compare adrenergic and cholinergic tonus between seasons. The effect of season on resting P_{MA} and f_H as well as on all baroreflex parameters derived from sigmoidal baroreflex– f_H curves was analyzed through a Student's *t*-test. The full autonomic blockade on baroreflex responses and the influence of α 1- and β -adrenergic receptors on P_{MA} and f_H were analyzed through one-way ANOVA or one-way repeated-measures ANOVA (factor: treatment), respectively, and the differences among means were assessed by Tukey's *post hoc* test. Means were considered to be different at $P \leq 0.05$.

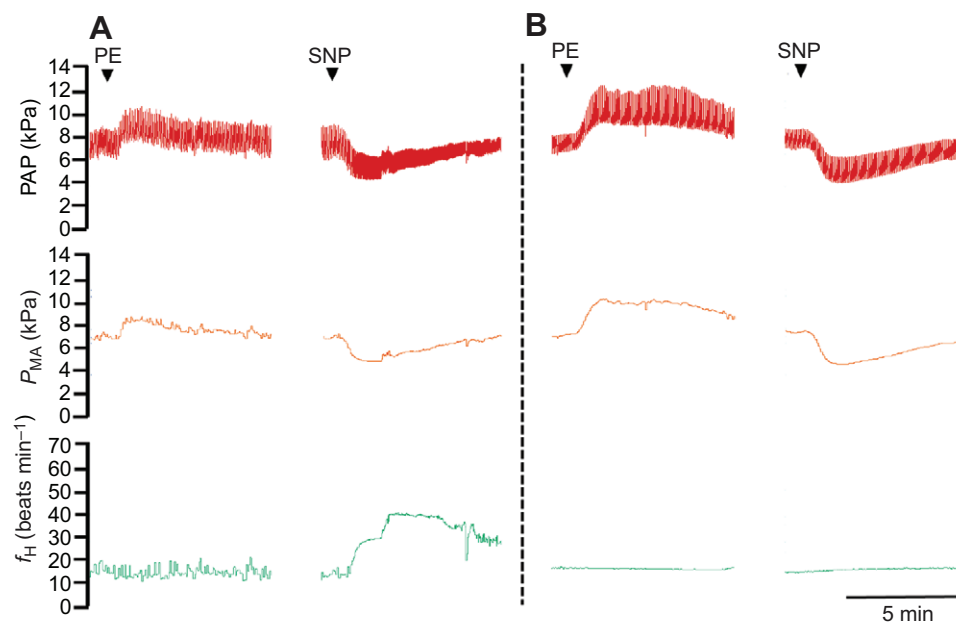


Fig. 1. Pulsatile arterial blood pressure (PAP), mean arterial blood pressure (P_{MA}) and heart rate (f_H) of original traces from a spring–summer-acclimated tegu, *Salvator merianae*. Intravenous injections of phenylephrine (PE; 25.0 μ g kg⁻¹) and sodium nitroprusside (SNP; 10.0 μ g kg⁻¹) before (A) and after (B) full autonomic blockade with atropine (1.5 mg kg⁻¹) and sotalolol (6.0 mg kg⁻¹). Arrowheads indicate the moment of injections.

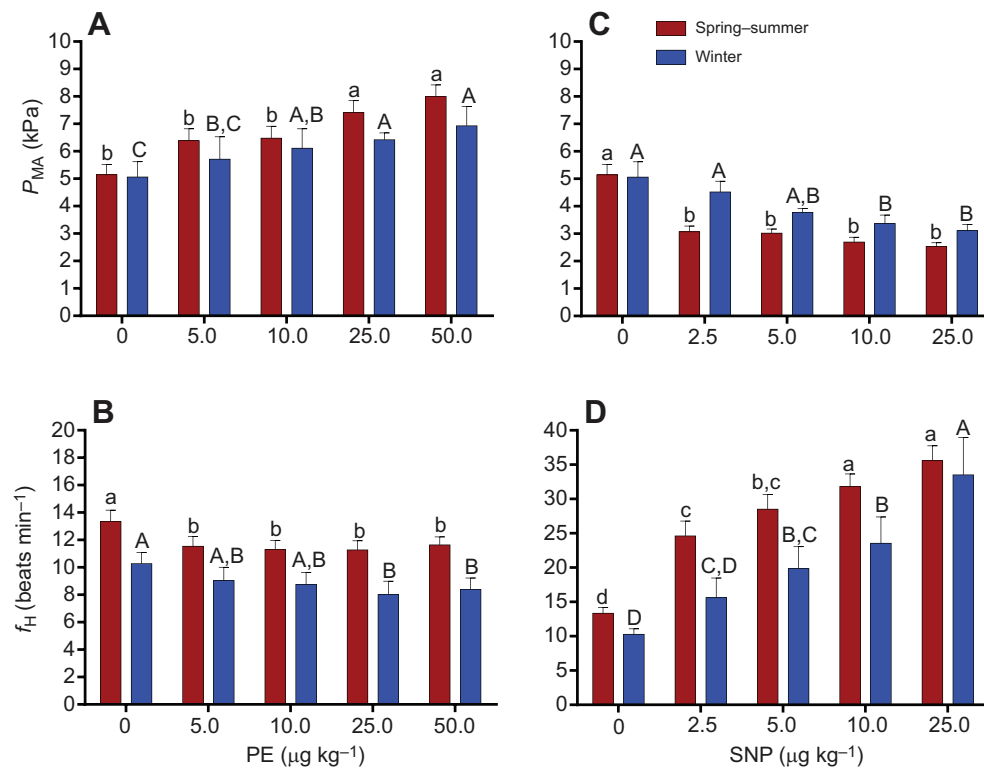


Fig. 2. Haemodynamic effects of pharmacological manipulation of P_{MA} in spring-summer- and winter-acclimated tegus, *S. merianae*, by injections of SNP and PE. Effect of different doses of (A,B) PE and (C,D) SNP on P_{MA} and f_H in winter ($N=5$; blue) and spring-summer tegus ($N=11$; red). Different uppercase (lowercase) letters indicate a significant effect of drugs in winter (spring-summer) tegus ($P<0.05$; Tukey's test). Data are means \pm s.e.m.

RESULTS

Mean resting cardiovascular parameters for spring-summer and winter tegus are shown in Table 1. No significant seasonal difference in P_{MA} was observed ($P=0.91$), whereas f_H was significantly lower during winter ($P=0.039$).

Fig. 1A depicts original traces of PAP of a tegu exhibiting a typical tachycardic reflex response to reduction in P_{MA} after injection of SNP ($10.0 \mu\text{g kg}^{-1}$), and an increase in P_{MA} after a bolus injection of PE ($25.0 \mu\text{g kg}^{-1}$). In contrast to a prominent tachycardia induced by hypotension, hypertension caused a very small bradycardia. In Fig. 1B, an abolition of reflex changes of f_H is shown after animals' pre-treatment with atropine and sotalol (full autonomic blockade).

PE caused significant increases in P_{MA} in both winter and spring-summer animals (effect of treatment: $P<0.001$; Fig. 2A). The

hypertensive effect of PE did not differ between groups ($P=0.38$). Additionally, PE caused a small reflex bradycardia for all doses tested in spring-summer ($P<0.001$; Fig. 2B), and for the two higher doses (10.0 and $25.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) in winter animals ($P<0.05$; Fig. 2B); winter animals reached significantly lower values for reflex bradycardia compared with spring-summer ($P<0.01$).

SNP induced a significant decrease in P_{MA} at all doses tested in spring-summer animals (effect of treatment: $P<0.001$; Fig. 2C). During winter, only the two higher doses of SNP (10.0 and $25.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) decreased P_{MA} ($P<0.001$). The hypotensive effects of SNP were always followed by tachycardia in both groups ($P<0.001$; Fig. 2D), although spring-summer animals showed higher values (effect of season: $P=0.026$).

Fig. 3 depicts the responses to changes in P_{MA} with PE and SNP in baroreflex- f_H curves at the two groups for each animal and the

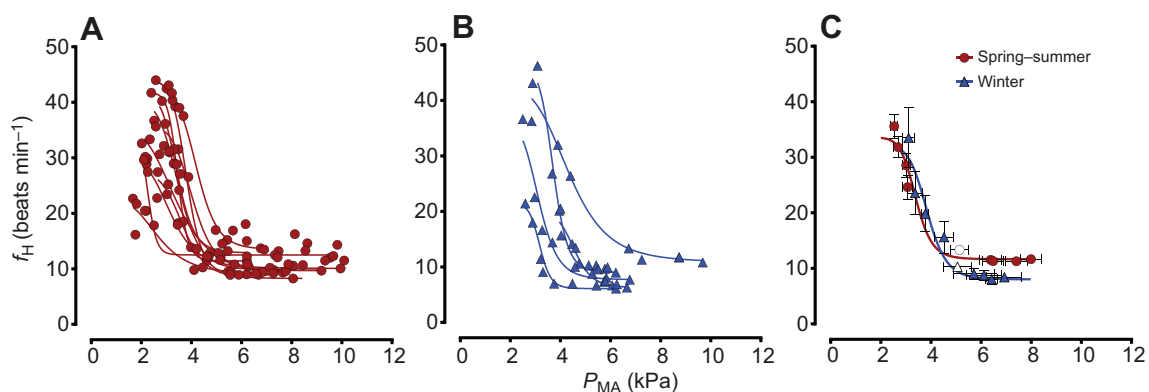


Fig. 3. Individual and mean baroreflex curves of spring-summer- and winter-acclimated tegus, *S. merianae*. Shown are curves of each animal for (A) spring-summer and (B) winter groups, and (C) mean (\pm s.e.m.) baroreflex curves for both groups at $\sim 25^\circ\text{C}$. Blue triangles and red circles represent winter ($N=5$) and spring-summer ($N=11$) groups, respectively. In C, the relationship between P_{MA} and f_H was generated from the mean values of the curve-fit parameters for each animal (see Table 1). Resting f_H and P_{MA} are represented by an open triangle (winter) and an open circle (spring-summer).

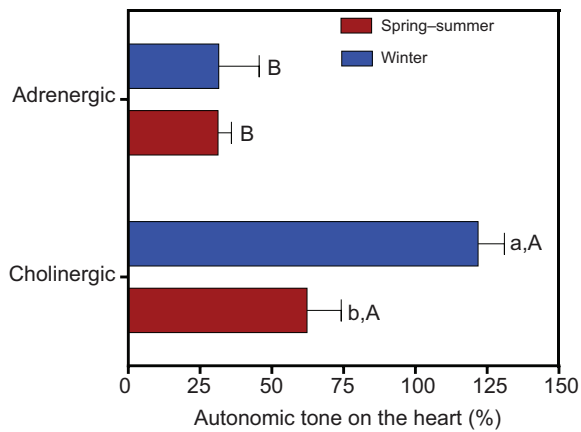


Fig. 4. Calculated autonomic tones on the heart of resting spring-summer- and winter-acclimated tegus, *S. merianae*. Regardless of acclimation, the cholinergic tone was always higher than the adrenergic tone; however, winter tegus ($N=3$) exhibited higher cholinergic tone than spring-summer tegus ($N=5$). Different uppercase letters indicate a significant difference between cholinergic and adrenergic tone, and different lowercase letters indicate a significant difference between winter and spring-summer groups ($P<0.05$; Tukey's test). Data are means \pm s.e.m.

mean P_{MA}/f_H relationships. The coefficients of determination (R^2) of the mean curves were 0.92 ± 0.02 (spring-summer) and 0.86 ± 0.06 (winter), indicating that 92% and 86% of the f_H variations in the respective seasons are explained by P_{MA} changes. In addition, resting f_H values were at the low end of the reflex curves. As for the baroreflex parameters derived from sigmoidal baroreflex- f_H curves, the maximal f_H , the slope of the linear part of the curve, the P_{MA} at the midpoint in the f_H range, the maximal gain and the normalized gain were not different between groups (Table 1). In contrast,

minimum f_H was significantly higher during spring-summer compared with winter tegus ($P=0.013$; Table 1).

Cholinergic and adrenergic tones on the heart in winter and spring-summer tegus are shown in Fig. 4. Resting and undisturbed tegus from both groups were characterized by a large cholinergic tone (winter: $122\pm 9.2\%$; spring-summer: $62.3\pm 11.9\%$) in comparison to a low adrenergic tone (winter: $31.5\pm 14.1\%$; spring-summer: $31.3\pm 4.6\%$; $P<0.001$). Winter animals had the highest parasympathetic modulation of f_H ($P=0.015$).

Pharmacological autonomic blockade attenuated the reflex bradycardia ($P<0.05$; Fig. 5B) and further increased P_{MA} ($P<0.01$; Fig. 5A) after PE injection. Reflex tachycardia induced by hypotension was completely inhibited in those animals pretreated with atropine plus sotalol ($P<0.001$; Fig. 5D); in contrast, there was no change in hypotensive effect evoked by SNP ($P=0.06$; Fig. 5C).

The antagonism of α_1 -adrenergic receptors with prazosin alone ($0.2\ \mu\text{g}\ \text{kg}^{-1}$) did not decrease P_{MA} ($P=0.16$), but inhibited the hypertensive effect induced by PE ($25.0\ \mu\text{g}\ \text{kg}^{-1}$, $P<0.001$; Fig. 6A); prazosin did not change f_H ($P=0.56$; Fig. 6B). Antagonism of β -adrenergic receptors with sotalol had no effect on resting P_{MA} or f_H ($P=0.36$; Fig. 6C,D); however, it was able to inhibit the great β -adrenergic stimulation on the heart induced by isoproterenol ($P<0.001$; Fig. 6D).

DISCUSSION

The main findings of the present study are that resting winter tegu lizards, even exhibiting lower f_H and higher cardiac parasympathetic tone, maintain unchanged f_H baroreflex sensitivity in comparison with spring-summer animals at the same temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$); moreover, both winter and spring-summer tegus have higher vagal over sympathetic tone on the heart, allowing them to mount a

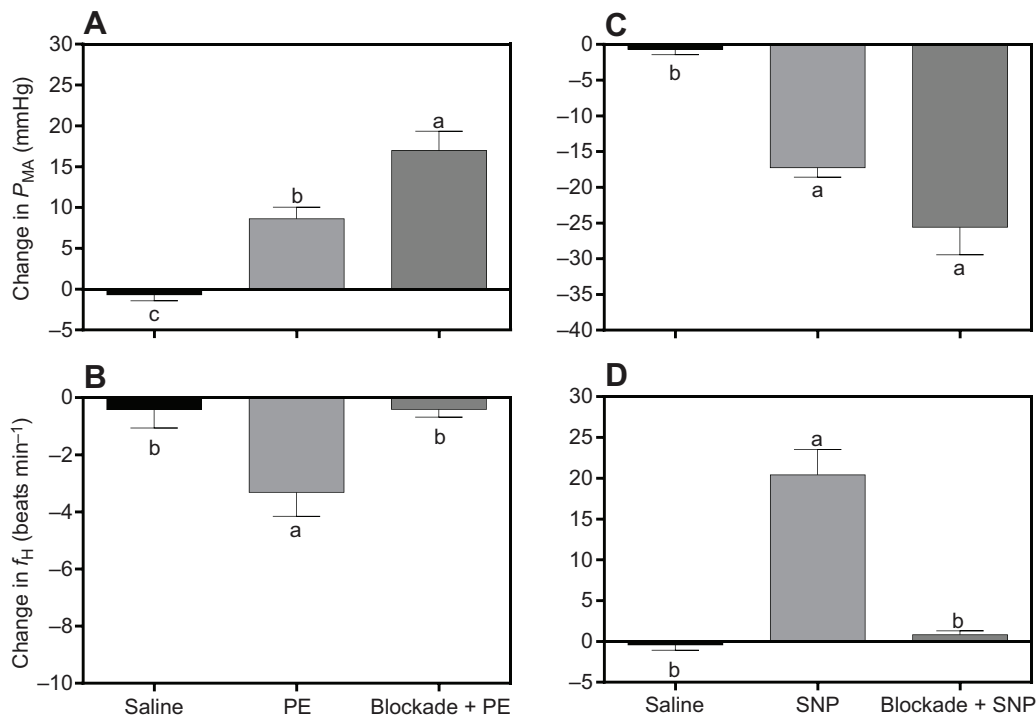


Fig. 5. Changes in P_{MA} and f_H of spring-summer-acclimated tegus, *Salvator merianae* before and after full autonomic blockade effect in hypotension and hypertension. Shown are changes in (A,C) P_{MA} and (B,D) f_H after i.v. injections of saline (vehicle), PE ($25.0\ \mu\text{g}\ \text{kg}^{-1}$) and SNP ($10.0\ \mu\text{g}\ \text{kg}^{-1}$) before and after full autonomic blockade with atropine ($1.5\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$) and sotalol ($6.0\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$) ($N=7$). Values indicated by different letters are significantly different from each other as determined by Tukey's test. Data are means \pm s.e.m.

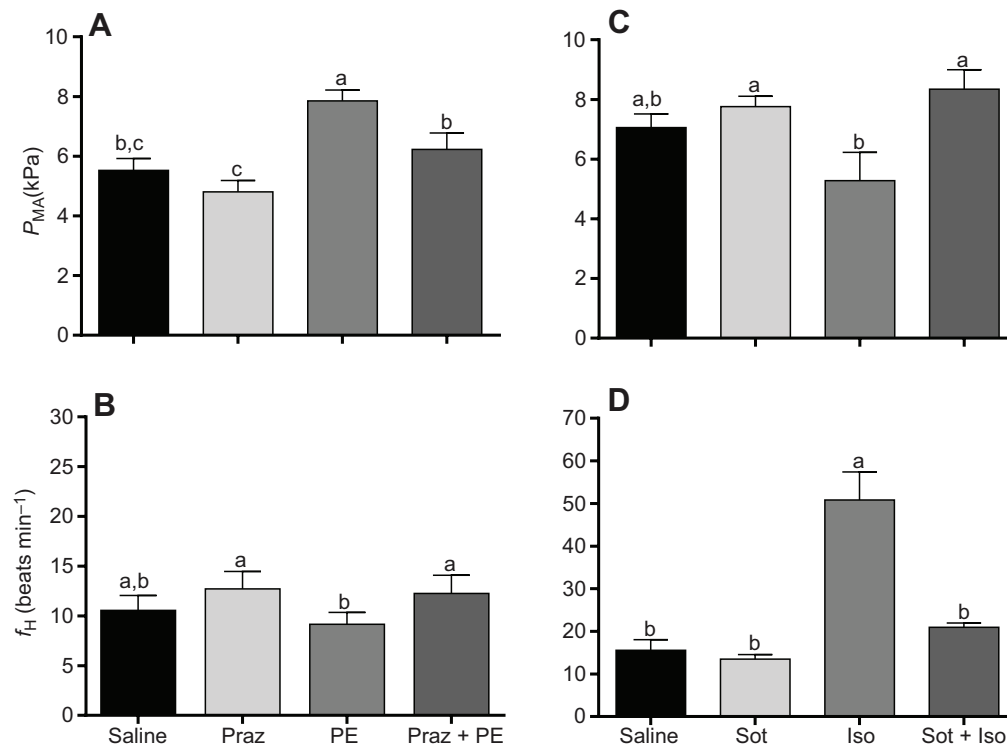


Fig. 6. Influence of α - and β -adrenergic receptors on P_{MA} and f_H of spring–summer-acclimated tegus, *S. merianae*. (A,B) Intravenous injections of saline (vehicle), prazosin (Praz; 0.2 mg kg^{-1}), PE ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$) or Praz+PE ($N=7$) on P_{MA} and f_H . (C,D) Intravenous injections of saline (vehicle), sotalol (Sot; 6.0 mg kg^{-1}), isoproterenol (Iso; $2.5 \mu\text{g kg}^{-1}$) or Sot+Iso ($N=4-7$) on P_{MA} and f_H . Values indicated by different letters are significantly different from each other as determined by Tukey's test. Data are means \pm s.e.m.

pronounced reflex tachycardia against hypotension over a negligible bradycardia against hypertension.

Resting cardiovascular variables and seasonal variation

In winter tegus, f_H was $\sim 23\%$ lower than in spring–summer tegus at the same temperature (Table 1), which is in agreement with a higher parasympathetic drive on the heart (Fig. 4). Interestingly, it was recently reported that tegus implanted with a telemetry ECG device and kept under semi-natural conditions anticipate the winter season through a gradual monthly decrease in f_H at constant body temperatures (Sanders et al., 2015). Collectively, these results indicate a certain degree of metabolic depression, which is supported by observations in reptiles, including tegu lizards, of a linear correlation between f_H and metabolic rate under steady-state conditions (Butler et al., 2002; Piercy et al., 2015). Therefore, gas exchange and f_H are seasonally adjusted to match the differing steady-state metabolic demands (Andrade et al., 2004; Clark et al., 2005; Piercy et al., 2015). In fact, hibernation in *S. merianae* is characterized by an active metabolic reduction during the winter season (Abe, 1983, 1995; Andrade and Abe, 1999; Lopes and Abe, 1999; de Souza et al., 2004; Sanders et al., 2015), which, in southeastern Brazil, is synchronized with the driest phase of the year. The rate of oxygen consumption reported for winter tegus can be 32% lower than values reported for resting animals during the active season at the same temperature (Abe, 1995).

Besides significant decrease in f_H in winter tegus, RPP (Table 1), as a measure of myocardial activity (Glass et al., 1997; da Silva et al., 2008), remained unchanged between spring–summer and winter groups. Juvenile tegu lizards undergo cardiac hypertrophy in anticipation of winter hibernation (da Silveira et al., 2013), which could be a compensatory mechanism to maintain blood pressure at low f_H by sustaining stroke volume; however, the maintenance of blood pressure during dormancy in tegu lizards does not exclude a possible contribution from increased peripheral vascular resistance. It is interesting to note that hibernating golden-

mantled ground squirrels (*Callospermophilus lateralis*) undergo an $\sim 30\%$ increase in the left ventricular chamber mass maintaining extremely low f_H , while stroke volume is significantly increased (Nelson and Rourke, 2013). Heart hypertrophy has also been reported in the Andean lizard, *Liolaemus nigroviridis*, during hibernation (Naya et al., 2009). Therefore, adjustments in cardiac function that allow lower f_H and sustained blood pressure in winter tegus remain to be explored in the context of heart hypertrophy in anticipation of the winter season. Furthermore, a reduction in f_H without changes in blood pressure is also observed in aestivating toads and lungfish at constant body temperature (Glass et al., 1997; Bicego-Nahas et al., 2001; da Silva et al., 2008), which might indicate a pattern of cardiovascular regulation in ectotherms that face seasonal metabolic reductions such as hibernation and aestivation.

Baroreflex control of f_H and seasonal variation

The reflex responses of f_H against changes in blood pressure in tegus were accessed by pharmacological manipulation of arterial pressure, which is a common method of studying baroreflex in vertebrates (Bagshaw, 1985; Altimiras et al., 1998; Crossley et al., 2003; Hagensen et al., 2010). Although this 'closed-loop study' tends to overestimate the reflex sensitivity, it offers the advantages of both being performed with minimal instrumentation on unanaesthetized animals and providing an integrated response caused by activation of all relevant receptors (Altimiras et al., 1998; Crossley et al., 2003; Hagensen et al., 2010). This was an appropriate study to be performed in tegus because the baroreceptor locations as well as their characterization have not previously been demonstrated in these animals.

Even at reduced metabolic rate, suggested by smaller resting f_H in our winter tegus, f_H baroreflex sensitivity appeared to be preserved. In semi-natural conditions, the abandonment of thermoregulatory behaviour and the commitment to dormancy during winter in tegus allow body temperature to decline to an ambient temperature of

approximately 17°C (Abe, 1995; Andrade et al., 2004; Sanders et al., 2015). At that point, lower body temperatures could affect the central nervous system's capacity for regulating the cardiovascular system, thereby preventing tegus from responding to hypotension, as is seen in other ectotherms such as caimans (Hagensen et al., 2010), turtles (Crossley et al., 2015) and toads (Zena et al., 2015), where low temperature decreases f_H baroreflex sensitivity. Overall, these data indicate that seasonal variations in baroreflex sensitivity of *S. merianae* in the field, should they exist, are likely explained by differences in body temperature during the different seasons rather than an endogenous seasonal cycle of cardiovascular control.

Salvator merianae showed a clear tachycardic response to decreases in blood pressure with SNP, whereas PE-induced hypertension caused a negligible bradycardia in both winter and spring–summer tegus. The observed low resting f_H positioned at the low end of the baroreflex curves is compatible with the presence of low sympathetic and high parasympathetic drives on the heart. This is supported by a great increase in f_H induced by sympathetic activation in response to hypotension, which was confirmed by abolition of the reflex tachycardia after β -adrenergic blockade. Accordingly, the minimal bradycardia induced by PE hypertension is compatible with an already high parasympathetic drive operating on the heart (Fig. 4) that prevents these animals from further f_H reductions in response to increases in blood pressure. In fact, many species of undisturbed and resting reptiles are normally characterized by high vagal tone on the heart (Taylor et al., 2014).

The reduced ability of tegus to decrease f_H in response to high pressures raises the question of why some ectotherms defend hypotension more than hypertension. Studies on anurans have recently demonstrated the presence of a specialized lymphatic system that has the ability to return excessive transcapillary fluids back to the venous system and thereby maintain blood volume homeostasis; these animals are capable of lymph fluid formation 10 times higher than mammals (Hedrick et al., 2007; Hillman et al., 2010). Therefore, the importance of baroreceptors for defending against increases in blood pressure seems not to be the case for anurans (Hedrick et al., 2015; Zena et al., 2015). Like anurans, tegus have cardiac ventricles that are anatomically and functionally undivided, and hence there is no pressure separation within the ventricle (Jensen et al., 2014). At least in the turtle *Chrysemys picta*, which also has a three-chambered heart, the net loss of plasma through the lung capillaries accounts for 10 to 20 times greater flow than in mammals because of a high pulmonary arterial blood pressure, a variable pulmonary blood flow and/or low plasma colloid osmotic pressure (Zweifach and Intaglietta, 1971; Burggren, 1982). In tegus, the absence of a meaningful bradycardic response against hypertension may expose their pulmonary capillaries to a relatively higher pressure, increasing the rate of fluid formation, which might be avoided by a protective mechanism, such as the lymphatic system. Among ectothermic reptiles, besides the presence of lymphatic vessels and lymph heart structure, which have been identified in some snakes, lizards, turtles and crocodylians, there is not sufficient information available regarding the function of this system in fluid volume homeostasis (for a review, see Hedrick et al., 2013). More studies are necessary to clarify the effect of lymph mobilization capacity on blood pressure homeostasis in reptiles. Besides this mechanism, one cannot rule out the possibility of vagal activity increasing pulmonary vascular resistance (Burggren, 1977; Milsom et al., 1977; Taylor et al., 2009), which could shunt blood away from the lungs during hypertensive episodes.

The normalized baroreflex gain in tegus (spring–summer: 94% kPa⁻¹; winter: 139% kPa⁻¹; Table 1) is similar to that of

another squamate, the lizard *T. rugosa* (98% kPa⁻¹; Berger et al., 1980), at the same temperature (~25°C), but is higher than that observed in anurans (ranging from 33.6 to 46% kPa⁻¹; temperature range: 21–25°C; Hedrick et al., 2015; Zena et al., 2015). Thus, in comparison with the anurans, the higher f_H baroreflex sensitivity of these lizards may be related to their higher P_{MA} and lower f_H (Crossley et al., 2003).

The presence of $\alpha 1$ -adrenoreceptors in the vasculature of tegus with a vasoconstrictor function as described for mammals and other reptiles (Overgaard et al., 2002; Breno et al., 2007) was revealed by the blockade of the hypertensive effect of PE by the $\alpha 1$ -adrenergic antagonist prazosin (0.2 mg kg⁻¹ i.v.). We also tested two other doses of prazosin (0.5 and 1 mg kg⁻¹; data not shown) in a few animals, and similar results on P_{MA} were observed, in addition to a long-lasting inhibition of the PE effect up to 4 h. Thus, resting *S. merianae* seems not to have a net $\alpha 1$ -adrenergic tone in its vasculature, at least under our experimental conditions. Regarding β -adrenergic receptors, the pharmacological stimulation with isoproterenol increased f_H more than threefold from saline values (~227% increase), which was almost completely blunted by previous injection of sotalol, a response mediated by β -adrenergic receptors on the heart. In resting tegus with low f_H , β -adrenergic blockade did not further reduce it; a result similar to that observed in awake and fully recovered rattlesnakes, which have a high parasympathetic tone on the heart (Campbell et al., 2006).

In summary, contrary to our initial hypothesis, the South American tegu *S. merianae*, known to have an annual cycle of metabolic change, seems to maintain relatively unchanged f_H baroreflex sensitivity at a temperature-independent low metabolic state. Even with lower resting f_H and higher vagal tone on the heart, the preserved baroreflex response of f_H in winter tegus may be related to a cardiac hypertrophy (da Silveira et al., 2013) and, thus, the maintenance of cardiac activity. Independent of acclimation, the predominant tachycardic response against hypotension, similar to what happens in anurans (Zena et al., 2015), crocodylians (Altimiras et al., 1998; Hagensen et al., 2010) and mammals (Crestani et al., 2010), indicates a possible pattern of baroreflex regulation in tetrapods. Finally, the absence of a meaningful bradycardic response to hypertension might account for the presence of an efficient lymphatic system that pulls back transcapillary fluid loss into the venous system, avoiding lung oedema, a mechanism that remains to be explored in reptiles.

Acknowledgements

We thank the veterinarian André Escobar, who kindly assisted us in the anaesthesia procedures, and Lynn Hartzler for grammatical corrections to an earlier version of the manuscript. We are grateful for many suggestions provided by two anonymous referees, and thank Jacopo Mortola and C. Loren Buck for critically reading the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

V.D., L.A.Z. and K.C.B. conceived and designed the experiments; V.D. performed the experiments; V.D., L.A.Z. and K.C.B. analyzed and interpreted the data; L.A.Z., K.C.B., V.D., D.V.A., L.H.G. and A.S.A. wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; INCT-Fisiologia Comparada, 573921/2008-3 to A.S.A. and K.C.B.) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 07/54113-0 to K.C.B.). V.D. and L.A.Z. were the recipients of FAPESP undergraduate (nos 09/00806-0 and 10/05063-2) and PhD (no. 12/17379-0) fellowships, respectively.

References

- Abe, A. S.** (1983). Observations on dormancy in tegu lizard, *Tupinambis teguixin* (Reptilia, Teiidae). *Naturalia* **8**, 135-139.
- Abe, A. S.** (1995). Estivation in South American amphibians and reptiles. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**, 1241-1247.
- Altamiras, J., Aissaoui, A., Torta, L. and Axelsson, M.** (1997). Cholinergic and adrenergic tones in the control of heart rate in teleosts. How should they be calculated? *Comp. Biochem. Physiol. A* **118**, 131-139.
- Altamiras, J., Franklin, C. E. and Axelsson, M.** (1998). Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. *J. Exp. Biol.* **201**, 2235-2242.
- Andrade, D. V. and Abe, A. S.** (1999). Gas exchange and ventilation during dormancy in the tegu lizard *Tupinambis merianae*. *J. Exp. Biol.* **202**, 3677-3685.
- Andrade, D. V., Sanders, C., Milsom, W. K. and Abe, A. S.** (2004). Overwintering in tegu lizards. In *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application, Twelfth International Hibernation Symposium* (ed. B. M. Barnes and H. V. Carey), pp. 339-348. Fairbanks, AK: Institute of Arctic Biology.
- Bagshaw, R. J.** (1985). Evolution of cardiovascular baroreceptor control. *Biol. Rev.* **60**, 121-162.
- Berger, P. J., Evans, B. K. and Smith, D. G.** (1980). Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard *Trachydosaurus rugosus*. *J. Exp. Biol.* **86**, 197-209.
- Bicego-Nahas, K. C., Gargaglioni, L. H. and Branco, L. G.** (2001). Seasonal changes in the preferred body temperature, cardiovascular, and respiratory responses to hypoxia in the toad, *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Zool.* **289**, 359-365.
- Breno, M. C., Prezoto, B. C., Borgheresi, R. A. M. B., Lazari, M. F. M. and Yamanouye, N.** (2007). Characteristics of neural and humoral systems involved in the regulation of blood pressure in snakes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 766-778.
- Burggren, W. W.** (1977). The pulmonary circulation of the chelonian reptile: morphology, haemodynamics and pharmacology. *J. Comp. Physiol.* **116**, 303-323.
- Burggren, W. W.** (1982). Pulmonary blood plasma filtration in reptiles: a 'wet' vertebrate lung? *Science* **215**, 77-78.
- Butler, P. J., Frappell, P. B., Wang, T. and Wikelski, M.** (2002). The relationship between heart rate and rate of oxygen consumption in Galapagos marine iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*) at two different temperatures. *J. Exp. Biol.* **205**, 1917-1924.
- 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.** (2006). 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.
- Clark, T. D., Butler, P. J. and Frappell, P. B.** (2005). Digestive state influences the heart rate hysteresis and rates of heat exchange in the varanid lizard *Varanus rosenbergi*. *J. Exp. Biol.* **208**, 2269-2276.
- Crestani, C. C., Alves, F. H. F., Busnardo, C., Resstel, L. B. and Correa, F. M. A.** (2010). N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neurosci. Res.* **67**, 317-326.
- Crossley, D. A., II, Hicks, J. W. and Altamiras, J.** (2003). Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Biol.* **206**, 2895-2902.
- Crossley, D. A., II, Wearing, O. H., Platzack, B., Hartzler, L. K. and Hicks, J. W.** (2015). Acute and chronic temperature effects on cardiovascular regulation in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *J. Comp. Physiol. B* **185**, 401-411.
- da Silva, G. S. d. S. F., Giusti, H., Sanchez, A. P., do Carmo, J. M. and Glass, M. L.** (2008). Estivation in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: effects on cardiovascular function, blood gases, osmolality and leptin levels. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **164**, 380-385.
- da Silveira, L. C., do Nascimento, L. F., Colquhoun, A., Abe, A. S. and de Souza, S. C. R.** (2013). Cardiac hypertrophy and structural and metabolic remodeling related to seasonal dormancy in the first annual cycle in tegu lizards. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **165**, 371-380.
- de Souza, S. C., de Carvalho, J. E., Abe, A. S., Bicudo, J. E. P. W. and Bianconcini, M. S.** (2004). Seasonal metabolic depression, substrate utilisation and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). *J. Exp. Biol.* **207**, 307-318.
- Delaney, R. G., Lahiri, S. and Fishman, A. P.** (1974). Estivation of the African lungfish *Protopterus aethiopicus*: cardiovascular and respiratory functions. *J. Exp. Biol.* **61**, 111-128.
- Glass, M. L., Fernandes, M. S., Soncini, R., Glass, H. and Wasser, J. S.** (1997). Effects of dry season dormancy on oxygen uptake, heart rate, and blood pressures in the toad, *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Zool.* **279**, 330-336.
- Hagensen, M. K., Abe, A. S. and Wang, T.** (2010). Baroreflex control of heart rate in the broad-nosed caiman *Caiman latirostris* is temperature dependent. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **156**, 458-462.
- Harvey, M. B., Ugueto, G. N. and Gutberlet, R. L.** (2012). Review of teiid morphology with a revised taxonomy and phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata). *Zootaxa* **3459**, 1-156.
- Hedrick, M. S., Drewes, R. C., Hillman, S. S. and Withers, P. C.** (2007). Lung ventilation contributes to vertical lymph movement in anurans. *J. Exp. Biol.* **210**, 3940-3945.
- Hedrick, M. S., Hillman, S. S., Drewes, R. C. and Withers, P. C.** (2013). Lymphatic regulation in nonmammalian vertebrates. *J. Appl. Physiol.* **115**, 297-308.
- Hedrick, M. S., McNew, K. A. and Crossley, D. A. II** (2015). Baroreflex function in anurans from different environments. *Comp. Biochem. Physiol. A* **179**, 144-148.
- Hillman, S. S., Hedrick, M. S., Drewes, R. C. and Withers, P. C.** (2010). Lymph flux rates from various lymph sacs in the cane toad *Rhinella marina*: an experimental evaluation of the roles of compliance, skeletal muscles and the lungs in the movement of lymph. *J. Exp. Biol.* **213**, 3161-3166.
- Jensen, B., Moorman, A. F. and Wang, T.** (2014). Structure and function of the hearts of lizards and snakes. *Biol. Rev.* **89**, 302-336.
- Klein, W., Perry, S. F., Abe, A. S. and Andrade, D. V.** (2006). Metabolic response to feeding in *Tupinambis merianae*: circadian rhythm and a possible respiratory constraint. *Physiol. Biochem. Zool.* **79**, 593-601.
- Lillywhite, H. B. and Seymour, R. S.** (1978). Regulation of arterial blood pressure in Australian tiger snakes. *J. Exp. Biol.* **75**, 65-79.
- Lillywhite, H. B. and Gallagher, K. P.** (1985). Hemodynamic adjustments to head-up posture in the partly arboreal snake, *Elaphe obsoleta*. *J. Exp. Zool.* **235**, 325-334.
- Lopes, H. R. and Abe, A. S.** (1999). Biologia reprodutiva e comportamento do teiú, *Tupinambis merianae*, em cativeiro (Reptilia, Teiidae). In *Manejo y Conservación de Fauna Silvestre en América Latina* (ed. T. G. Fang, O. L. Montenegro and R. E. Bodmer), pp. 259-272. La Paz, Bolivia: Editorial Instituto e Ecología.
- Martinez-Jimenez, D. and Hernandez-Divers, S. J.** (2007). Emergency care of reptiles. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* **10**, 557-585.
- Millard, R. W. and Moalli, R.** (1980). Baroreflex sensitivity in an amphibian, *Rana catesbeiana*, and a reptilian, *Pseudemys scripta elegans*. *J. Exp. Zool.* **213**, 283-288.
- Milsom, W. K., Langille, B. L. and Jones, D. R.** (1977). Vagal control of pulmonary vascular resistance in the turtle, *Chrysemys scripta*. *Can. J. Zool.* **55**, 359-367.
- Milsom, W. K., Andrade, D. V., Brito, S. P., Toledo, L. F., Wang, T. and Abe, A. S.** (2008). Seasonal changes in daily metabolic patterns of tegu lizards (*Tupinambis merianae*) placed in the cold (17°C) and dark. *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 165-175.
- Mosley, C.** (2011). Pain and nociception in reptiles. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* **14**, 45-60.
- Navas, C. A. and Carvalho, J. E.** (2010). *Aestivation: Molecular and Physiological Aspects*. Berlin: Springer.
- Naya, D. E., Veloso, C., Sabat, P. and Bozinovic, F.** (2009). Seasonal flexibility of organ mass and intestinal function for the Andean lizard *Liolaemus nigroviridis*. *J. Exp. Zool. A Ecol. Physiol.* **311A**, 270-277.
- Nelson, O. L. and Rourke, B. C.** (2013). Increase in cardiac myosin heavy-chain (MyHC) alpha protein isoform in hibernating ground squirrels, with echocardiographic visualization of ventricular wall hypertrophy and prolonged contraction. *J. Exp. Biol.* **216**, 4678-4690.
- Overgaard, J., Stecyk, J. A., Farrell, A. P. and Wang, T.** (2002). Adrenergic control of the cardiovascular system in the turtle *Trachemys scripta*. *J. Exp. Biol.* **205**, 3335-3345.
- Piercy, J., Rogers, K., Reichert, M., Andrade, D. V., Abe, A. S., Tattersall, G. J. and Milsom, W. K.** (2015). The relationship between body temperature, heart rate, breathing rate, and rate of oxygen consumption, in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*) at various levels of activity. *J. Comp. Physiol. B* **185**, 891-903.
- Reid, I. A.** (1996). Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. *News Physiol. Sci.* **1**, 270-274.
- Sanders, C. E., Tattersall, G. J., Reichert, M., Andrade, D. V., Abe, A. S. and Milsom, W. K.** (2015). Daily and annual cycles in thermoregulatory behaviour and cardio-respiratory physiology of black and white tegu lizards. *J. Comp. Physiol. B* **185**, 905-915.
- Skovgaard, N., Galli, G., Abe, A., Taylor, E. W. and Wang, T.** (2005). The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. A* **142**, 205-214.
- Stephens, G. A., Shirer, H. W., Trank, J. W. and Goetz, K. L.** (1983). Arterial baroreceptor reflex control of heart rate in two species of turtle. *Am. J. Physiol.* **244**, R544-R552.
- Taylor, E. W., Andrade, D. V., Abe, A. S., Leite, C. A. C. and Wang, T.** (2009). 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.
- Taylor, E. W., Leite, C. A. C., Sartori, M. R., Wang, T., Abe, A. S. and Crossley, D. A. II** (2014). The phylogeny and ontogeny of autonomic control of

the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. *J. Exp. Biol.* **217**, 690-703.

Toledo, L. F., Brito, S. P., Milsom, W. K., Abe, A. S. and Andrade, D. V. (2008). Effects of season, temperature, and body mass on the standard metabolic rate of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 158-164.

Zena, L. A., Gargaglioni, L. H. and Bicego, K. C. (2015). Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **179**, 81-88.

Zweifach, B. W. and Intaglietta, M. (1971). Measurement of blood plasma colloid osmotic pressure. II. Comparative study of different species. *Microvasc. Res.* **3**, 83-88.

Apêndice C

**“Effect of temperature on chemosensitive locus coeruleus neurons
of Savannah monitor lizards *Varanus exanthematicus*”**

RESEARCH ARTICLE

Effect of temperature on chemosensitive locus coeruleus neurons of savannah monitor lizards, *Varanus exanthematicus*

Lucas A. Zena^{1,2,3}, Elisa M. Fonseca^{1,2,3}, Joseph M. Santin², Lays Porto^{1,2,3}, Luciane H. Gargaglioni^{1,3}, Kênia C. Bicego^{1,3} and Lynn K. Hartzler^{2,*}

ABSTRACT

Savannah monitor lizards (*Varanus exanthematicus*) are unusual among ectothermic vertebrates in maintaining arterial pH nearly constant during changes in body temperature in contrast to the typical α -stat regulating strategy of most other ectotherms. Given the importance of pH in the control of ventilation, we examined the CO_2/H^+ sensitivity of neurons from the locus coeruleus (LC) region of monitor lizard brainstems. Whole-cell patch-clamp electrophysiology was used to record membrane voltage in LC neurons in brainstem slices. Artificial cerebral spinal fluid equilibrated with 80% O_2 , 0.0–10.0% CO_2 , balance N_2 , was superfused across brainstem slices. Changes in firing rate of LC neurons were calculated from action potential recordings to quantify the chemosensitive response to hypercapnic acidosis. Our results demonstrate that the LC brainstem region contains neurons that can be excited or inhibited by, and/or are not sensitive to CO_2 in *V. exanthematicus*. While few LC neurons were activated by hypercapnic acidosis (15%), a higher proportion of the LC neurons responded by decreasing their firing rate during exposure to high CO_2 at 20°C (37%); this chemosensitive response was no longer exhibited when the temperature was increased to 30°C. Further, the proportion of chemosensitive LC neurons changed at 35°C with a reduction in CO_2 -inhibited (11%) neurons and an increase in CO_2 -activated (35%) neurons. Expressing a high proportion of inhibited neurons at low temperature may provide insights into mechanisms underlying the temperature-dependent pH-stat regulatory strategy of savannah monitor lizards.

KEY WORDS: Chemosensitivity, Brainstem, CO_2 inhibition, Ventilation, Ectothermic vertebrates, pH regulation

INTRODUCTION

Regulation of intracellular and extracellular pH is a fundamental homeostatic requirement for vertebrates. Animals primarily compensate for perturbations to acid–base status of metabolic origin by adjusting the depth and rhythm of breathing through a negative feedback loop where O_2 , CO_2 and pH are the main signals for ventilatory adjustments (Sundin et al., 2007). The negative feedback system that drives ventilation has been mainly elucidated in mammals that tightly regulate arterial pH. Specifically, chemosensory structures are well defined and the cellular mechanisms underlying

chemosensitivity have been extensively studied in mammals (Guyenet and Bayliss, 2015; Hartzler and Putnam, 2009; Huckstepp and Dale, 2011), where the CO_2/pH -sensitive brainstem areas involved in respiratory chemosensing are located in regions surrounding the fourth ventricle (Coates et al., 1993; Huckstepp and Dale, 2011).

Chemosensitive regions contributing to the control of breathing have not been identified in reptiles. Nevertheless, at least one chemosensitive region, the locus coeruleus (LC), has been described in amphibians (toads and bullfrogs: Noronha-de-Souza et al., 2006; Santin and Hartzler, 2013) and mammals (reviewed in Hartzler and Putnam, 2009 and Gargaglioni et al., 2010), suggesting that CO_2/pH chemosensitivity of the LC may be conserved across air-breathing vertebrates. Anatomical studies have identified noradrenergic cells of the LC in a variety of reptiles (Kiehn et al., 1992; Lopez et al., 1992; Smeets and González, 2000; Wolters et al., 1984), including savannah monitor lizard brainstems (Wolters et al., 1984), showing tyrosine hydroxylase-containing cell bodies in the LC neurons as observed in anurans and rats (Biancardi et al., 2008; Noronha-de-Souza et al., 2006).

Temperature is an important variable affecting nearly all physiological processes, including neuronal activity, ventilation, cardiovascular function, metabolic rate and central chemoreception, among others, in ectothermic vertebrates (Bicego-Nahas and Branco, 1999; Branco et al., 1993; Branco and Wood, 1993; Santin et al., 2013; Stinner et al., 1998; Wood et al., 1977; Zena et al., 2015). In order to deal with environmental fluctuations of temperature, many vertebrates have developed autonomic, biochemical and behavioral strategies to handle changes in temperature. Despite these strategies, ectotherms can face large fluctuations in body temperature (T_b) that can introduce metabolic acid–base regulatory challenges for ectotherms (Stinner et al., 1998), and given the fundamental importance of pH regulation, we expect that ectothermic vertebrates would have a well-defined set of mechanisms to compensate for the effects of temperature on acid–base balance (da Silva et al., 2013). Therefore, regulation of pH requires an ability to sense pH perturbations within the brain and peripheral sites and to adjust the depth and rhythm of breathing to appropriately regulate temperature-dependent pH. For example, ventilatory requirements for acid–base balance in anuran amphibians vary proportionally with temperature (Branco et al., 1993; Gottlieb and Jackson, 1976; Mackenzie and Jackson, 1978; Santin et al., 2013; Tattersall and Boutilier, 1999a,b). Bullfrogs exhibit large ventilatory, central and cellular responses to CO_2 at high temperatures (>25°C), but no ventilatory, central or cellular chemosensitivity at low temperatures (10°C; Bicego-Nahas and Branco, 1999; Morales and Hedrick, 2002; Santin et al., 2013). Thus, the cellular basis for central chemoreception matches the ventilatory requirements of acid–base regulation of bullfrogs across its temperature range.

¹Department of Animal Morphology and Physiology, College of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil. ²Department of Biological Sciences, Wright State University, Dayton, OH, USA. ³National Institute of Science and Technology in Comparative Physiology (INCT Fisiologia Comparada), Brazil.

*Author for correspondence (lynn.hartzler@wright.edu)

 L.K.H., 0000-0002-2355-0174

List of symbols and abbreviations

aCSF	artificial cerebral spinal fluid
CI	chemosensitivity index
HA	hypercapnic acidosis
LC	locus coeruleus
Q_{10}	effect of temperature
T_b	body temperature
V_m	membrane voltage

Central chemoreceptors that induce changes in ventilation represent the principal sensory elements in the negative feedback loop that regulates pH, and, at least in bullfrogs, those chemosensitive neurons are known to be sensitive to temperature (Santin et al., 2013). Arterial pH is inversely related to temperature, so an increase in T_b decreases pH and, conversely, a decrease in T_b increases pH. For reptiles and amphibians, therefore, changes in T_b entail regulated, inversely proportional acid–base balance through adjusting ventilation; however, the temperature dependence of arterial pH regulatory strategies varies more than an order of magnitude between species of ectotherms (*Scaphiopus couchii*: $\Delta\text{pH}/\Delta T_b = -0.03 \text{ U } ^\circ\text{C}^{-1}$ to *Varanus exanthematicus*: $\Delta\text{pH}/\Delta T_b = -0.001 \text{ U } ^\circ\text{C}^{-1}$; Withers, 1978 and Wood et al., 1977, respectively). The α -stat regulatory strategy is assumed to be the normal acid–base regulating mechanism among amphibians and reptiles, and posits that pH is adjusted with temperature to achieve a constant protonation state of critical histidine residues to maintain tertiary protein conformation, thus maintaining cell function (Reeves, 1972); therefore, savannah monitor lizards, *V. exanthematicus*, are unusual among air-breathing ectothermic vertebrates in maintaining arterial pH nearly constant during changes in T_b (from -0.001 to $-0.003 \text{ U } ^\circ\text{C}^{-1}$; Wood et al., 1977; Wood et al., 1981). We hypothesized that LC neurons from *V. exanthematicus* exhibit depressed sensitivity to CO_2/pH changes at cooler temperatures because they retain CO_2 when cooled (Stinner et al., 1998). To test this hypothesis, we used the whole-cell patch-clamp technique to measure membrane voltage (V_m) and changes in action potential firing frequency of LC neurons in brainstem slices from *V. exanthematicus* upon exposure to hypercapnic acidosis (HA) across a physiological range of temperatures.

MATERIALS AND METHODS**Brainstem slice preparation**

Juvenile savannah monitor lizards, *Varanus exanthematicus* (Bosc 1792) ($N=46$; $62.8 \pm 6.09 \text{ g}$) of both sexes were housed in tanks with access to basking areas for thermoregulation (temperature range: $25\text{--}48^\circ\text{C}$), exposed to 12 h:12 h light:dark cycles, and fed with crickets and rat pups twice weekly to satiety, with water available *ad libitum*. Experiments were approved by Wright State University's Institutional Animal Care and Use Committee. Methods were similar to those previously described (Santin et al., 2013). Lizards were anesthetized with isoflurane and, after the loss of the toe and tail withdrawal reflex, animals were rapidly decapitated. The head was submerged in 4°C artificial cerebral spinal fluid (aCSF; see 'aCSF preparation', below, for composition) equilibrated with 97.5% O_2 and 2.5% CO_2 and the brainstem was dissected. Following dissection, the brainstem was adhered to an agar block using cyanoacrylate glue then sectioned into $\sim 400 \mu\text{m}$ transverse slices using a Vibratome tissue slicer (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Slices containing the LC were identified using topographical distribution as previously described for *V. exanthematicus* (ten Donkelaar et al.,

1987). Brainstem slices containing the LC were given 1 h to recover at room temperature in control aCSF equilibrated with 80% O_2 , 2.5% CO_2 , balance N_2 (pH ~ 7.6). Following recovery, a transverse slice containing the LC was transferred to a polyethylene recording chamber with a glass coverslip base, immobilized with a nylon grid, and superfused with aCSF at a rate of $\sim 2.5 \text{ ml min}^{-1}$.

Temperature control

The temperature of the chamber was controlled with a Warner Instruments bipolar temperature controller (model CL-100, Hamden, CT, USA). The measured temperature of the bath varied $\pm 1^\circ\text{C}$ depending on the location of the thermocouple. To ensure precise temperature measurements at the exact location of the slice, the thermocouple was placed where the slice would be positioned during the experiments, and the objective was kept in touch with the bath to ensure that experimental temperatures were determined under identical conditions prior to experiments.

aCSF preparation

aCSF was composed of (in mmol l^{-1}): 134.0 NaCl, 5.0 KCl, 1.3 MgSO_4 , 10.0 D-glucose, 26.0 NaHCO_3 , 2.4 CaCl_2 and 1.24 KH_2PO_4 (Liu et al., 2006). Gases were mixed using an MFC-4 mass flow controller and gas mixer (Sable Systems International, Las Vegas, NV, USA) and continuously diffused in aCSF. Control aCSF at 20°C (pH 7.61), 30°C (pH 7.66) and 35°C (pH 7.68) was equilibrated with 80% O_2 , 2.5% CO_2 , balance N_2 . The solubility of gases is inversely related to temperature, so the expected increase in pH of aCSF with cooling was countered by a decrease in pH due to an increase in dissolved CO_2 . Hypercapnic aCSF was identical to control aCSF except that CO_2 was elevated to 7% or 10%, displacing N_2 , depending on the experimental protocol. The pH changes during HA with 7% CO_2 were similar at all temperatures (ΔpH from control aCSF at 20, 30 and 35°C was 0.29, 0.29 and 0.28 pH units, respectively). The ΔpH from control aCSF solution at 20°C during HA with 10% CO_2 and during hypocapnia (0% CO_2) was 0.44 and 1.02 pH units, respectively.

Electrophysiological recordings

Whole-cell patch-clamp recordings were obtained as previously described (Santin et al., 2013). Briefly, micropipettes with resistances of 4–7 M Ω were back-filled with mock-intracellular solution (composition in mmol l^{-1} : 110 potassium gluconate, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 1 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 0.1 $\text{Na}_2\text{-GTP}$, 2.5 EGTA; pH 7.2) and placed over a AgCl_2 -coated Ag wire connected to an Axon Instruments CV 203BU headstage (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The slice was visualized at $4\times$ magnification with a Nikon FN1 fixed stage microscope (Nikon, Elgin, IL, USA) using NIS-Elements imaging software (Nikon). The LC was identified by its bilateral location adjacent to the fourth ventricle (for anatomy, see references in 'Brainstem slice preparation', below). Individual neurons of interest were visualized at $60\times$ magnification prior to recording. A 10 ml syringe was connected to the headstage and was used to apply positive pressure through the pipette tip in order to keep the tip free of debris. A micromanipulator (Burleigh PCS 5000, Thorlabs, Newton, NJ, USA) was used to position the pipette adjacent to the neuron of interest and the pipette offset was zeroed prior to entering the on-cell configuration to ensure accurate V_m measurements. Positive pressure was removed and suction was applied until a $\geq 1 \text{ G}\Omega$ seal was obtained between the pipette tip and cell membrane in the on-cell configuration. Further gentle negative pressure was applied to rupture the seal and obtain whole-cell electrochemical access to the neuron. Changes in V_m were recorded

in current-clamp mode (Axopatch 200 B integrating patch-clamp amplifier, Molecular Devices) and collected using Molecular Devices P10 Clampex software. Current-clamp recordings were analyzed off-line using pCLAMP software (Molecular Devices).

Experimental procedures

Determination of LC chemosensitivity

As a general procedure, LC neurons were exposed to hypercapnic aCSF to determine CO₂/pH sensitivity. Upon entering the whole-cell current-clamp mode, V_m was recorded for 2–5 min under control conditions, where aCSF was equilibrated with control gas mixture (80% O₂, 2.5% CO₂, balance N₂) to establish baseline firing rate. Neurons were then exposed to 7% CO₂ or 10% CO₂ for 5 min to elicit changes in firing rate in response to HA and then returned to control aCSF solution. Only neurons returning to near-control firing rates following HA were included in the analysis. aCSF equilibrated with control gas mixture was used to determine the baseline firing rate and the CO₂ composition of the hypercapnic gas mixture was increased to 7.0% and/or 10.0%, and/or decreased to 0%. Neurons unresponsive after 5 min of HA exposure in all described experiments were considered non-chemosensitive. Neurons were considered activated or inhibited by HA if their chemosensitivity index (CI) was $\geq 120\%$ or $\leq 80\%$ than control firing rate, respectively (Wang et al., 1998).

Effect of temperature on firing rate and chemosensitivity of LC neurons

The preferred T_b of *V. exanthematicus* is about 35°C based on their behavioral preference in a thermal gradient (Hallman et al., 1990), so to investigate the effect of temperature (35°C) on lizard LC neurons, the chamber was heated to 35°C and maintained at this temperature for the duration of the experiment. Using a whole-cell current-clamp configuration, baseline firing rate was recorded for 2–5 min from LC neurons ($N=26$; $N=12$ chemosensitive, $N=14$ non-chemosensitive) in aCSF equilibrated with control gas mixture (80% O₂, 2.5% CO₂, balance N₂), at 35°C. Once control firing rates and V_m were established, the LC neurons were exposed to 7% CO₂ for 3–5 min. Only neurons that recovered firing rate and V_m after the return to control aCSF were included in this dataset.

To determine the effect of both warming and HA on firing rate and V_m of LC, we varied the chamber solution from 20 to 30°C ($N=14$). Well-sealed patches last longer at cooler temperatures, so for these longer experiments we decreased the temperature at which we held our slices. In whole-cell current-clamp mode, baseline firing rate was recorded for 2–5 min from LC neurons in aCSF equilibrated with control gas mixture (80% O₂, 2.5% CO₂, balance N₂) at a lower temperature, 20°C. Once control firing rate and V_m were established, LC neurons were exposed to 7% CO₂ for 3–5 min. Neurons that recovered firing rate and V_m after the return to control aCSF were used in subsequent experiments and included in this dataset.

The influence of warming on both firing rate and chemosensitivity was investigated in a subset of LC neurons ($N=10$ chemosensitive, $N=4$ non-chemosensitive). Once stable firing rates of LC neurons at 30°C were recorded, temperature was returned to 20°C and firing rate was allowed to return to near-initial values at 20°C for at least 3 min; after this, a slow warm ramp to 30°C was again applied. Once the chamber temperature reached 30°C (in ~ 2 min), a new baseline firing rate at the new temperature was established for ~ 2 min, and the neuron was exposed to 7% CO₂ for 3–5 min at the higher temperature ($N=7$). Only neurons that

recovered firing rate and V_m after the return to control aCSF at 20°C were included in this dataset.

Data analysis

All values are reported as means \pm s.e.m. Nine LC slices at 35°C yielded nine neurons excited by HA, three inhibited by HA and 14 non-chemosensitive neurons. Fourteen additional slices recorded at 20°C had four excited, 20 inhibited and 13 non-chemosensitive neurons. The mean firing rate in control, 7% or 10% CO₂, and the return to control (washout) are reported for 20°C; mean firing rate during control, 7% CO₂ and washout are also reported for 30 and 35°C. A repeated measures analysis of variance (RM-ANOVA) was used to determine differences among control, 7% or 10% CO₂, and washout neuronal firing rates at 20, 30 and 35°C. Percentage changes in chemosensitivity (excited and inhibited LC neurons) between 20 and 35°C were accessed by a Fisher's exact test. The magnitude of the response to HA was quantified as the CI, which expresses the percentage change in firing rate due to HA normalized for a pH change of 0.2 pH units. The effect of temperature on firing rate during normocapnia was assessed by comparing the average firing rate 1 min before warming with the first minute of average firing rate once the new temperature was achieved. One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test were used to determine firing rate differences among 0% (hypocapnia), 2.5% (control), 7.0% and 10.0% CO₂ (hypercapnia) values. A two-way RM-ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test was used for evaluating temperature effects on firing rate in chemosensitive and non-chemosensitive LC neurons. A Student's *t*-test was applied to compare the effect of temperature (Q_{10} effect) on basal firing rate between chemosensitive and non-chemosensitive LC neurons and between recovery time from HA for excited and inhibited LC neurons at 20 and 35°C. All graphics were made using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and statistical analysis was carried out using SigmaPlot version 11. Significance was accepted with $P \leq 0.05$. Data were tested for unequal variance and normality, and, when necessary, log transformation was performed.

RESULTS

Chemosensitivity in savannah monitor lizard LC neurons

LC neurons in savannah monitor lizards exhibit chemosensitivity to changes in CO₂/H⁺ (Fig. 1). Fig. 1A depicts the CI that was used to categorize LC neurons as excited, inhibited or non-chemosensitive in the savannah monitor lizards, while Fig. 1B shows the percentage of each response type at 35°C. On exposure to HA (7% CO₂) at 35°C, 35% (9/26) of the LC neurons increased their firing rate (2.22 ± 0.57 versus 4.06 ± 0.92 Hz; RM-ANOVA, $P < 0.01$; Fig. 1C), 11% of the LC neurons (3/26) showed an inhibitory response (1.24 ± 0.05 versus 0.09 ± 0.09 Hz; RM-ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 1D) and 54% (14/26) were non-chemosensitive when exposed to HA (2.53 ± 0.27 versus 2.49 ± 0.25 Hz; RM-ANOVA, $P = 0.38$; Fig. 1E). HA caused a significant depolarization in the cell membrane of excited LC neurons at 35°C (-46.6 ± 1.7 versus -41.4 ± 2.0 mV; paired *t*-test, $P < 0.05$), while CO₂-inhibited LC neurons had no significant change in V_m (-47.1 ± 4.1 versus -51.7 ± 7.4 mV; paired *t*-test, $P = 0.3$). While there was a significant depolarization in the cell membrane of non-chemosensitive neurons (-46.4 ± 1.3 versus -45.1 ± 1.4 mV; paired *t*-test, $P < 0.01$), the absolute change in V_m was less in comparison to CO₂-excited cells.

Although there was no apparent effect of a lower temperature (20°C) on the magnitude of the chemosensitive response (two-way ANOVA, $P = 0.3$; Fig. 2A), LC neurons had a different distribution of

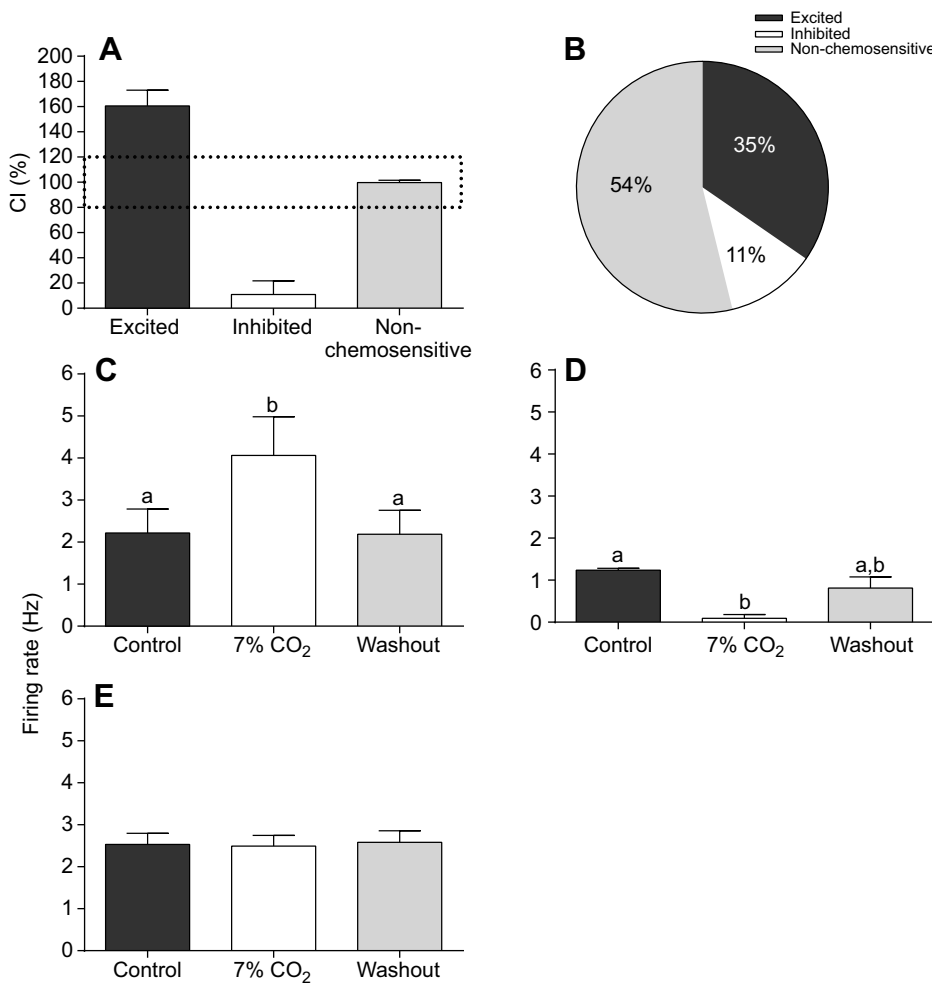


Fig. 1. *Varanus exanthematicus* locus coeruleus (LC) neurons show three types of firing rate response to hypercapnic acidosis (HA) at 35°C. (A) Neurons were considered activated (or excited), inhibited and non-chemosensitive based on their chemosensitivity index (CI). Dotted lines delineate the CI above and below which neurons are classified as excited (CI $\geq 120\%$ of baseline firing rate) or inhibited (CI $\leq 80\%$ of baseline firing rate) by HA, respectively. (B) The three types of chemosensitive responses to HA are shown as a percentage of chemosensitive and non-chemosensitive LC neurons. (C) Firing rate significantly increases upon exposure to 7% CO₂ ($N=9$) in excited neurons (RM-ANOVA, $P<0.05$). (D) In inhibited LC neurons, firing rate significantly decreases upon exposure to 7% CO₂ ($N=3$; RM-ANOVA, $P<0.05$). (E) Non-chemosensitive LC neurons do not change their firing rate upon 7% CO₂ exposure ($N=14$; $P=0.38$). Different lowercase letters indicate significant differences between treatments. Data are means \pm s.e.m.

responses to CO₂ (Fig. 2B). Most of the chemosensitive LC neurons were inhibited by HA (10/27, 37% of total population; Fisher's exact test; $P=0.047$). Only 15% (4/27) of LC neurons were excited by HA, but because baseline firing rate was so variable, a statistically significant change was not observed during HA (RM-ANOVA, $P=0.13$; Fig. 2C). If we normalize frequency, these excited neurons expressed a significant increase of $116.8\pm 15.5\%$ in firing frequency relative to baseline values ($P=0.005$, paired t -test; data not shown), while inhibited neurons at 20°C had a control firing rate of 1.35 ± 0.38 Hz and HA decreased the firing rate to 0.33 ± 0.20 Hz (RM-ANOVA, $P=0.013$; Fig. 2D), returning (on washout) to a firing rate near control values (1.09 ± 0.41 Hz). Even when LC neurons to a greater HA, induced with 10% CO₂ ($N=7$), firing rate still decreased from 0.93 ± 0.31 to 0.13 ± 0.09 Hz, with washout firing rate increasing to 0.51 ± 0.11 Hz (RM-ANOVA, $P=0.02$; Fig. 2E). Most (48%, 13/27) of the LC neurons in the savannah monitor lizard at 20°C were unresponsive to HA (RM-ANOVA, $P=0.08$; Fig. 2F). Additionally, the effect of hypocapnic exposure (0% CO₂; $N=3$) was not significantly different from that of HA with 2.5% CO₂ (control CO₂; $N=10$); however, firing rate during both hypocapnia and control CO₂ was significantly different from that during hypercapnia (7% and 10% CO₂; one-way ANOVA, $P<0.001$; Fig. 3). Furthermore, HA caused no change in V_m of excited LC neurons at 20°C (-51.6 ± 9.1 versus -45.8 ± 10.2 mV; paired t -test, $P=0.08$) and a significant hyperpolarization in the V_m of inhibited LC neurons (-53.0 ± 2.8 versus -58.6 ± 3.6 mV; paired t -test, $P=0.007$), while non-chemosensitive neurons did not change V_m during

exposure to 7% CO₂ (-47.1 ± 2.3 versus -46.6 ± 2.7 mV; paired t -test, $P=0.5$).

Influence of temperature on chemosensitive and non-chemosensitive lizard LC neurons

In a separate set of LC neurons, we investigated the effects of changing temperature while recording V_m . Neurons inhibited by CO₂ at 20°C were thermosensitive ($N=10$). Increasing the temperature from 20 to 30°C caused an increase in firing rate from 0.79 ± 0.23 to 3.66 ± 0.63 Hz (RM-ANOVA, $P<0.001$; Fig. 4), and decreasing the temperature back to 20°C slowed firing rate back down to 1.15 ± 0.45 Hz. Elevation in temperature from 20 to 30°C caused a significant increase in V_m in those neurons that were chemosensitive (CO₂ inhibited) at 20°C (-47.2 ± 1.9 versus -40.5 ± 1.8 mV; paired t -test, $P=0.001$). Non-chemosensitive LC neurons ($N=4$) also increased their firing rate from 0.90 ± 0.23 Hz at 20°C to 3.0 ± 0.76 Hz at 30°C (RM-ANOVA, $P<0.05$; Fig. 4); firing rate slowed down to 0.38 ± 0.12 Hz after the return to 20°C with no significant change in V_m (-47.4 ± 2.5 versus -43.2 ± 3.8 mV; paired t -test, $P=0.08$).

Chemosensitive (inhibited) LC neurons were returned to 30°C and then exposed to HA (7% CO₂) for 3–5 min (Fig. 5). The inhibited pattern observed in chemosensitive LC neurons when exposed to HA at 20°C (1.47 ± 0.43 versus 0.33 ± 0.12 Hz; $N=10$; RM-ANOVA, $P<0.01$) was no longer observed at 30°C (2.88 ± 0.59 versus 2.77 ± 0.67 Hz; $N=7$; RM-ANOVA, $P=0.40$) (Fig. 5A), and a diminished membrane potential exhibited at 20°C during HA (-48.9 ± 1.5 versus

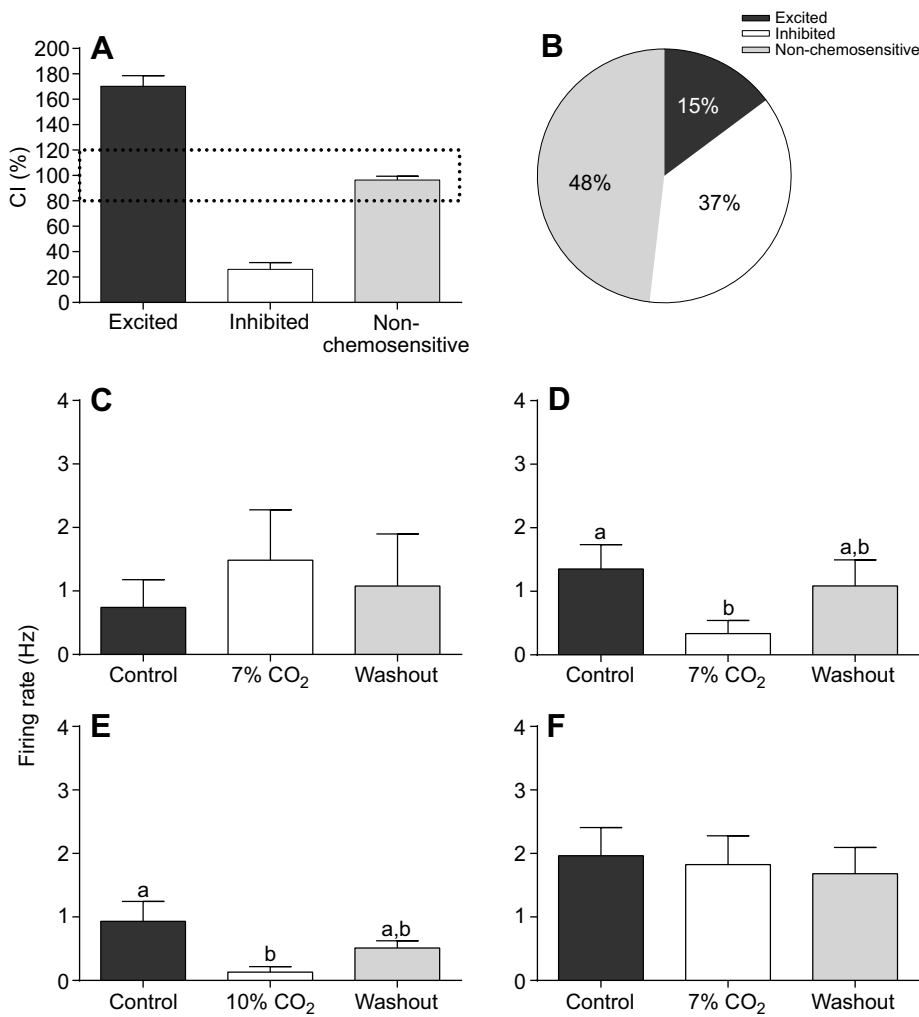


Fig. 2. *Varanus exanthematicus* LC neurons show three types of firing rate response to HA at 20°C. (A) Neurons were considered activated (or excited), inhibited and non-chemosensitive based on their CI. Dotted lines delineate the CI above and below which neurons are classified as excited (CI $\geq 120\%$ of baseline firing rate) or inhibited (CI $\leq 80\%$ of baseline firing rate) by HA, respectively. (B) The three types of chemosensitive responses to HA are shown as proportions of chemosensitive and non-chemosensitive LC neurons. Fewer excited neurons and more inhibited neurons were found at 20°C compared with 35°C. (C) Firing rate of excited LC neurons tends to increase upon exposure to 7% CO₂ ($N=4$). (D,E) Exposure to 7% CO₂ ($N=10$) and 10% CO₂ ($N=7$) induced significant decreases in firing rate in inhibited LC neurons (RM-ANOVA, $P<0.05$). (F) Non-chemosensitive LC neurons do not respond to 7% CO₂ exposure ($N=13$). Different lowercase letters indicate significant differences between treatments. Data are means+s.e.m.

-53.7 ± 2.0 mV; paired t -test, $P=0.001$) was also no longer observed during exposure to HA at 30°C (-41.4 ± 2.5 versus -40.7 ± 2.2 mV; paired t -test, $P=0.7$). An example of this pattern in integrated firing

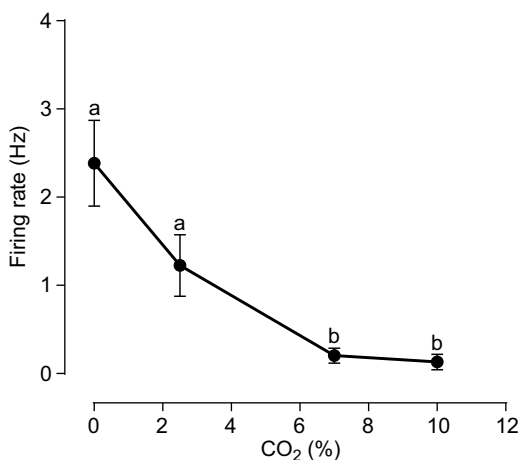


Fig. 3. LC neurons inhibited by HA have an increased integrated firing rate response to hypocapnic alkalosis (0% CO₂). Most chemosensitive LC neurons were inhibited by CO₂ at 20°C (see Fig. 2B). Control CO₂ was 2.5% ($N=10$), with two levels of HA (7.0%, $N=10$; and 10.0%, $N=7$), and hypocapnia at 0% CO₂ ($N=3$). There was no further decrease in firing rate with 10% CO₂ compared with 7% CO₂. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments. Data are means+s.e.m.

rate and V_m for one representative LC neuron inhibited by HA at 20°C and unresponsive to HA when exposed to 30°C is shown in Fig. 5B,C. Reversal of the response to HA took 3.6 ± 0.6 and 5.6 ± 2.4 min for excited and inhibited neurons at 35°C (t -test, $P=0.562$), respectively, while at 20°C, excited and inhibited neurons took 2.8 ± 0.4 and 9.4 ± 1.9 min for recovery (t -test, $P=0.004$), respectively.

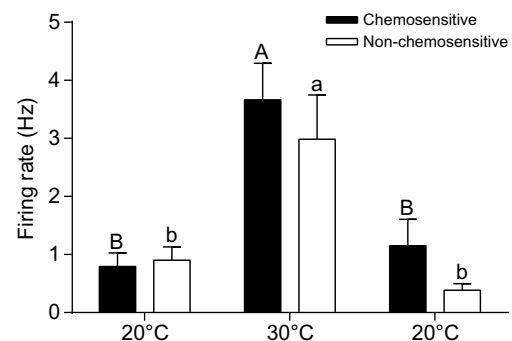


Fig. 4. Increasing the temperature increases the basal firing rate of *V. exanthematicus* LC neurons. A 10°C increase in temperature (from 20 to 30°C) induced the same magnitude rise in basal firing rate in chemosensitive ($N=10$; $Q_{10}=12.6 \pm 6.2$) and non-chemosensitive LC neurons ($N=4$; $Q_{10}=3.4 \pm 0.5$). Different lowercase letters indicate significant differences among treatments within non-chemosensitive LC neurons; and different uppercase letters indicate significant differences among treatments within chemosensitive LC neurons. Data are means+s.e.m.

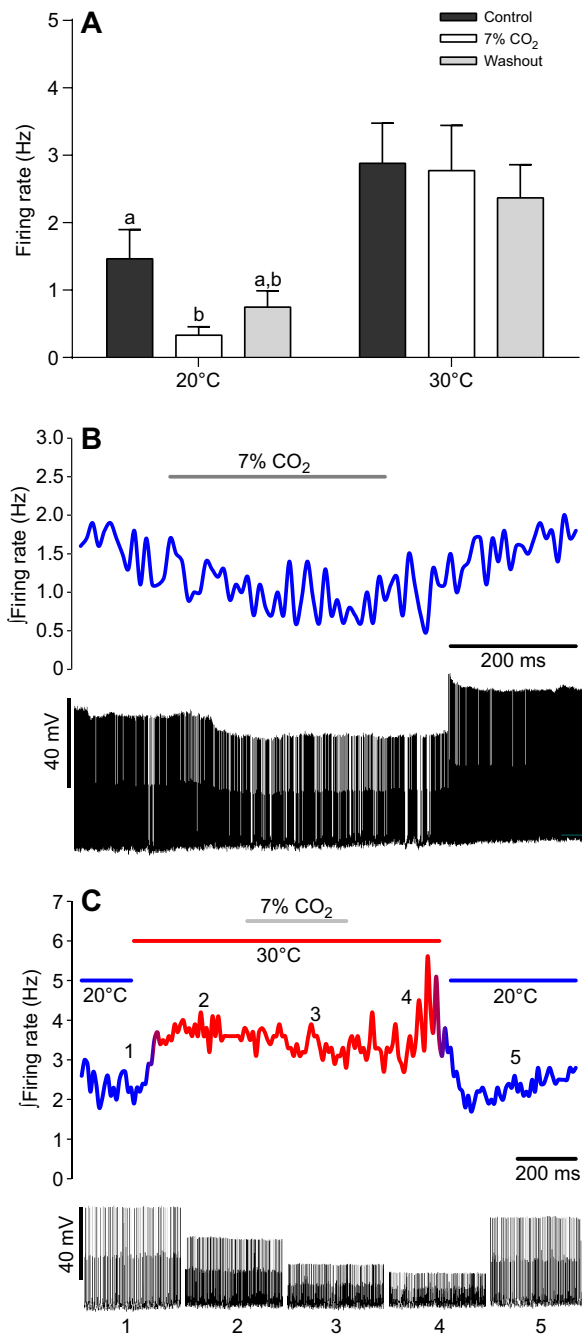


Fig. 5. The hypercapnic response of inhibited LC neurons in *V. exanthematicus* is temperature dependent within single neurons.

(A) The firing rate of LC neurons significantly decreased upon exposure to 7% CO₂ ($N=10$) in inhibited neurons at 20°C (RM-ANOVA, $P<0.01$), but no longer responded to HA (became non-chemosensitive) when temperature was increased to 30°C ($N=7$). Different lowercase letters indicate significant differences between treatments. Data are means+s.e.m. (B) Example integrated firing rate (top) and action potential trace (bottom) from an inhibited chemosensitive LC neuron showing the decrease in firing rate during HA at 20°C. (C) When temperature was increased to 30°C, previously inhibited LC neurons no longer changed firing rate upon exposure to 7% CO₂. The corresponding action potential trace (numbers 1–5) is shown below.

DISCUSSION

In the present study, we describe chemosensitive LC neurons in the lizard *V. exanthematicus*, a pH-stat regulating ectothermic vertebrate. We quantified how temperature affects LC neuron firing

rate activity under HA exposure. Relatively few lizard LC neurons were excited by HA (Figs 1 and 2), in marked contrast to a previous study from our laboratory (Santin et al., 2013) where we reported that LC neurons from bullfrogs, a classically α -stat regulating animal, have a high percentage of CO₂-activated LC neurons (>80%), and the percentage of chemosensitive neurons is not temperature dependent. In addition, in bullfrogs, increases and decreases in temperature influence the magnitude of the chemosensitive response; however, the CI in monitor lizards was not temperature dependent. Therefore, our study shows that in *V. exanthematicus*, despite fewer LC neurons being activated by HA, a higher proportion of the LC neurons responded by decreasing their firing rates during exposure to high CO₂ (7–10% CO₂) at 20°C (37%) – a response that was no longer exhibited at a higher temperature (30°C). Interestingly, further increases in temperature (35°C) again changed chemosensitive LC neurons in the monitor lizards: a reduction in the percentage of CO₂-inhibited LC neurons at 35°C (11%) and an increase in the percentage of LC neurons stimulated by HA (35%).

CO₂ chemosensitivity in vertebrates

Adjustments of ventilation are initiated via negative feedback where O₂, CO₂ and pH are the primary stimuli to which peripheral and central chemoreceptors are capable of responding through activation of O₂- and CO₂/pH-sensitive neurons. Central chemoreceptors are widely distributed in the brains of mammals, contributing to control of breathing and maintenance of systemic pH/CO₂ homeostasis (Guyenet and Bayliss, 2015; Huckstepp and Dale, 2011; Nattie, 1999). Studies investigating central respiratory chemoreceptors have focused mainly on neurons that are excited by HA, because some of the most studied chemosensitive areas like the nucleus tractus solitarius (NTS), retrotrapezoid nucleus (RTN) and the LC have a high percentage of HA-responsive neurons that are activated by CO₂ (Conrad et al., 2009; Mulkey et al., 2004; Nichols et al., 2009; Ritucci et al., 2005); however, CO₂-inhibited neurons also possibly play a role in the ventilatory control network in mammals (Iceman et al., 2014; Wang et al., 1998; Wang and Richerson, 1999). Extracellular recordings in the rat *in situ* preparation identified CO₂-inhibited GABAergic neurons in the medullary raphe (Iceman et al., 2014). CO₂-inhibited neurons of the raphe may be involved in central CO₂/pH chemoreception in mammals, providing a tonic inhibitory drive on respiratory output that is diminished as CO₂ is increased (Wang et al., 2001). Other chemosensitive regions contributing to the control of breathing also contain CO₂-inhibited neurons. The solitary complex [NTS and dorsal motor nucleus of the vagus (DVN); Conrad et al., 2009; Nichols et al., 2009] in adult rats seems to exhibit a significant plasticity when exposed to chronic hypoxia, increasing the percentage of CO₂-inhibited neurons from about 10% up to about 30% without any change in the proportion of CO₂-activated neurons (Nichols et al., 2009).

A significant gap in our knowledge of ventilatory control in vertebrates is that we know little of the fundamental cellular mechanisms of individual chemosensitive neurons in ectothermic vertebrates and how changes in their T_b would affect central cellular chemosensitivity. In mammals, LC neurons are of particular interest for CO₂ challenges as >80% of these neurons respond to HA by increasing their firing rate (Filosa et al., 2002; Oyamada et al., 1998; Pineda and Aghajanian, 1997). A CO₂-chemosensitive LC region may be conserved across vertebrates as it has been described in bullfrogs, toads and rats (Gargaglioni et al., 2010; Hartzler et al., 2008; Nichols et al., 2008; Noronha-de-Souza et al., 2006; Santin

and Hartzler, 2013). As in mammals, more than 80% of LC neurons in bullfrogs are CO₂ activated (Santin and Hartzler, 2013; Santin et al., 2013), reinforcing its importance as a site for central chemoreception in anurans (Noronha-de-Souza et al., 2006). Furthermore, given the similarities between LC responses in anurans and mammals in which focal acidification of the LC region stimulates ventilation and ablation reduces CO₂-induced increases in ventilation in *in vivo* experiments (Biancardi et al., 2008; Noronha-de-Souza et al., 2006), it is clear that the LC has an analogous role, and possibly a homologous role, in respiratory control in terrestrial vertebrates. The present study provides data showing that the LC in the savannah monitor lizard is also chemosensitive within a normal, physiological range of pH/P_{CO₂}, containing excited, inhibited and non-chemosensitive neurons, albeit in different proportions from those in rats and bullfrogs. In order to establish the function of the LC in respiratory control across air-breathing vertebrates, it is imperative that future *in vivo* studies show that the LC contributes to ventilatory control during CO₂ stimulation in reptiles.

The most striking finding in our study is how temperature is able to alter the proportion of LC neurons excited or inhibited by, or not sensitive to HA. The percentage of inhibited neurons was relatively high at 20°C (37%; Fig. 2B,C) compared with published data from bullfrogs and rats, none of which reported CO₂-inhibited LC neurons (Filosa et al., 2002; Santin and Hartzler, 2013; Santin et al., 2013), although we have observed some inhibited LC neurons in rats (L.K.H., J. B. Dean and R. W. Putnam, unpublished data). In addition, at 20°C, we found relatively few CO₂-activated LC neurons (15%; Fig. 2B,D), which is distinctly different from studies in bullfrogs at the same temperature (>80% activated by HA; Santin et al., 2013). The decrease in firing rate on exposure to 7% or 10% CO₂ is striking where the magnitude of the chemosensitive response is very low (CI <40%; Fig. 2A). Further, following washout (return to control CO₂), CO₂-inhibited LC neurons in aCSF solution equilibrated with 0% CO₂ (pH 8.6 at 20°C) increased their firing rate slightly higher than those neurons exposed only to control solution (2.5% CO₂; pH 7.6 at 20°C; L.A.Z., personal observation; combined data are shown in Fig. 3, but individual data are not shown). Surprisingly, inhibited neurons recorded at 20°C became unresponsive to HA at 30°C (Fig. 5). This pattern suggests that temperature has a differential modulatory effect on how CO₂ affects *in vitro* chemosensitive LC neurons in savannah monitor lizards at the cellular level. It is possible that the differences in the chemosensitive response to CO₂ could be due to whether that particular LC neuron is noradrenergic; however, given the temperature dependence of CO₂ chemosensitivity within the same neuron, it is unlikely that whether a neuron is noradrenergic is the only factor that determines whether a neuron will respond to CO₂ in savannah monitor lizards. It will be important to identify morphological characteristics and the ion channel/neurotransmitter phenotype of LC neurons in conjunction with electrophysiological recordings to address this point.

Maintaining the temperature at 35°C during the entire experiment resulted in a different scenario for chemosensitive LC neurons. The number of CO₂-inhibited neurons was lower (11%) compared with that at 20°C, but, still, the presence of inhibited LC neurons at even this higher temperature is in marked contrast to the absence of CO₂-inhibited neurons in mammals at a similar temperature (Filosa et al., 2002). Even the effect of temperature on basal firing rate (Q_{10}) was different between savannah monitor lizards (Figs 4 and 6) and bullfrogs (Santin and Hartzler, 2015; Santin et al., 2013). In lizards, warming increased basal firing rate in both chemosensitive and non-

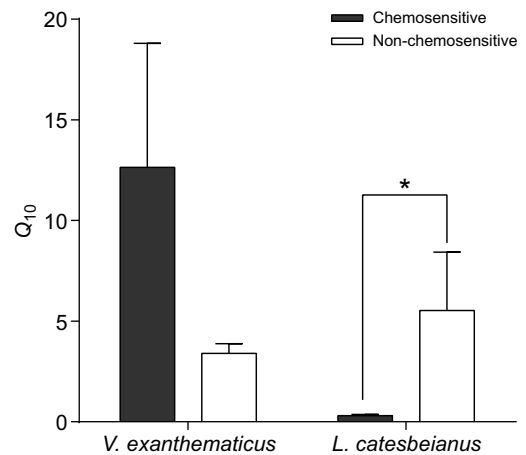


Fig. 6. The effect of temperature (Q_{10} effect) on the basal firing rate of chemosensitive LC neurons is completely different between *V. exanthematicus* and *Lithobates catesbeianus*. In lizards, warming increased the basal firing rate in both chemosensitive ($N=10$) and non-chemosensitive ($N=4$) LC neurons (shown in Fig. 4); in bullfrogs, chemosensitive LC neurons ($N=33$) were cold activated and warm inhibited, whereas non-chemosensitive LC neurons ($N=5$) increased firing rate with increases in temperature (data from Santin et al., 2013). *Significant difference between chemosensitive and non-chemosensitive LC neurons. Data are means+s.e.m.

chemosensitive LC neurons. In contrast, LC chemosensitive neurons in bullfrogs were cold activated and warm inhibited, allowing a very small Q_{10} effect, while non-chemosensitive LC neurons increased firing rate with increases in temperature, exhibiting a higher Q_{10} effect (Fig. 6). At present, it is unclear how these temperature responses, per se, affect the activity of the respiratory network.

Temperature effects on CO₂ chemosensitivity and pH regulation in savannah monitor lizards

Based on our data for LC chemosensitivity, temperature is of considerable importance as a modulatory factor of how LC neurons respond to hypercapnic stimuli in savannah monitor lizards. These animals exhibit a different modulatory pattern not previously reported in any of the putative chemosensitive areas that contribute to the respiratory network in vertebrates. Temperature influences on central chemosensitivity in ectothermic vertebrates have drawn attention to how chemosensitive areas respond to increases in environmental CO₂ across temperatures (Branco et al., 1993; Branco and Wood, 1993). For instance, in bullfrogs, a decrease or increase in the magnitude of the chemosensitive response (Santin et al., 2013) is the main effect of temperature and hypercapnic stimuli, which corroborates temperature effects in the whole-animal ventilatory response to general chemoreceptor stimulation by hypercapnia in amphibians (Bicego-Nahas and Branco, 1999; Branco et al., 1993). In contrast, there is a different chemosensitivity ratio between LC neurons activated or inhibited by CO₂ across temperatures in savannah monitor lizards; therefore, we emphasize the need to consider temperature when interpreting data of CO₂ stimuli on putative brainstem areas related to control of breathing, especially in ectothermic vertebrates. Experiments on some chemosensitive brainstem areas, such as the LC, NTS and RTN, in neonatal rats used physiological T_b for understanding how the respiratory network is modulated by CO₂ stimuli (Filosa et al., 2002; Filosa and Putnam, 2003; Nichols et al., 2008; Ritucci et al., 2005), while in others, recordings were obtained at room

temperature (Huang et al., 1997; Mulkey et al., 2004). Although no differences were found in the percentage of CO₂-activated neurons in the RTN between experiments performed at room temperature and 37°C in neonatal rats (46% and 42%, respectively; Mulkey et al., 2004; Ritucci et al., 2005), it is not clear whether those neurons were responding to a change in pH or CO₂, as both pH and the solubility of CO₂ are temperature dependent (the effects are opposite and may cancel each other out). Therefore, an appropriate temperature should be used, or at least considered, while studying CO₂ chemosensitivity within brainstem areas that may be involved in the control of breathing, especially in studies with ectothermic vertebrates that have the additional challenge of acid–base regulation during changes in T_b (Stinner et al., 1998).

The response to temperature-induced metabolic acid–base disturbances requires an ability to sense those perturbations and appropriately adjust the depth and rhythm of breathing. Mechanisms underlying the diverse acid–base regulating strategies of ectothermic vertebrates may be related to differences in the temperature dependence of central chemosensitivity at the cellular level. Uncovering differences in central respiratory chemoreception during changes in temperature in reptiles with distinct acid–base regulatory strategies has the potential to define a comprehensive, mechanistic explanation for a fundamental, but poorly understood, aspect of vertebrate homeostasis. Although we found strikingly different temperature-dependent mechanisms of chemosensitivity in the LC of monitor lizards compared with bullfrogs and rats, we cannot rule out possible contributions from other pH/CO₂-sensitive areas in the central nervous system. There are multiple CO₂/pH-sensitive areas in the brainstems of mammals (Nattie and Li, 2009), so it is likely there are also multiple CO₂/pH-sensitive areas in the brainstems of reptiles. Motor output to the breathing muscles would be modified by the networked chemosensory responses to CO₂/pH of all of the regions contributing to ventilatory control.

These are among the many remaining questions that need to be addressed, especially in closely related species that, despite phylogenetic proximity, differ from each other in pH-regulatory strategy. In addition, studies are necessary to determine the temperature dependence of hypercarbic stimuli and the contribution of the LC as a chemosensing brainstem region in the total ventilation of savannah monitor lizards in order to contextualize the neuronal CO₂ chemosensitivity found in our study within the functioning of the whole animal.

Contrary to our initial hypothesis, savannah monitor lizards do not exhibit a depressed LC chemosensitivity to pH/CO₂ changes at cooler temperatures. Instead, we found a more complex chemosensitivity pattern where LC neural sensory responses (activated/excited by HA versus inhibited by HA) in *V. exanthematicus* change with temperature, while in bullfrogs it is the magnitude of the chemosensitive response that is temperature dependent (Santin et al., 2013). Expressing a relatively high proportion of CO₂-inhibited LC neurons at low temperature may provide insight into mechanisms underlying the temperature-dependent pH-regulatory strategy of *V. exanthematicus* (Wood et al., 1977, 1981). Our findings on the chemosensory mechanisms affected by temperature are only the beginning of studies that should address whether differences in central CO₂ chemosensitivity are key mechanisms underlying differences in pH-regulatory strategies among ectothermic vertebrates. It is possible that the differences we see in chemosensitivity in lizard LC neurons are because they are pH-stat regulators while bullfrogs are α -stat regulators. Alternatively, it is possible that there are other chemosensitive

sites in lizard brainstem that have a greater influence in the total chemosensitive response to HA. We do not have sufficient information at this early stage to differentiate the reason for variable chemosensitivity, and further studies are necessary to address this question.

Acknowledgements

This study is part of the activities developed by L.A.Z. during his PhD at the Joint UFSCar-UNESP Graduate Program of Physiological Sciences, São Carlos, SP, Brazil. We would like to thank two anonymous reviewers for their comments and suggestions that have helped us improve our manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

L.A.Z., E.M.F., J.M.S., L.P., L.H.G., K.C.B. and L.K.H. designed the research, performed data analysis and prepared the manuscript prior to submission. L.A.Z., E.M.F., J.M.S. and L.P. performed the experiments.

Funding

This work was funded by a National Science Foundation Grant (IOS-1257338 to L.K.H.) and the Wright State Research Council (L.K.H.). L.A.Z. was the recipient of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Science Without Borders fellowship (CNPq-SWE no. 209933/2013-5).

References

- Biancardi, V., Bicego, K. C., Almeida, M. C. and Gargaglioni, L. H. (2008). Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflügers Arch.* **455**, 1119–1128.
- Bicego-Nahas, K. C. and Branco, L. G. S. (1999). Seasonal changes in the cardiorespiratory responses to hypercarbia and temperature in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **124**, 221–229.
- Branco, L. G. and Wood, S. C. (1993). Effect of temperature on central chemical control of ventilation in the alligator *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Biol.* **179**, 261–272.
- Branco, L. G., Glass, M. L., Wang, T. and Hoffmann, A. (1993). Temperature and central chemoreceptor drive to ventilation in toad (*Bufo paracnemis*). *Respir. Physiol.* **93**, 337–346.
- Coates, E. L., Li, A. and Nattie, E. E. (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J. Appl. Physiol.* **75**, 5–14.
- Conrad, S. C., Nichols, N. L., Ritucci, N. A., Dean, J. B. and Putnam, R. W. (2009). Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarius (NTS) of neonatal rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **166**, 4–12.
- da Silva, G. S. F., Glass, M. L. and Branco, L. G. S. (2013). Temperature and respiratory function in ectothermic vertebrates. *J. Therm. Biol.* **38**, 55–63.
- Filosa, J. A. and Putnam, R. W. (2003). Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K⁺ and Ca²⁺ channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C145–C155.
- Filosa, J. A., Dean, J. B. and Putnam, R. W. (2002). Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurons. *J. Physiol.* **541**, 493–509.
- Gargaglioni, L. H., Hartzler, L. K. and Putnam, R. W. (2010). The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **173**, 264–273.
- Gottlieb, G. and Jackson, D. C. (1976). Importance of pulmonary ventilation in respiratory control in the bullfrog. *Am. J. Physiol.* **230**, 608–613.
- Guyenet, P. G. and Bayliss, D. A. (2015). Neural control of breathing and CO₂ homeostasis. *Neuron* **87**, 946–961.
- Hallman, G. M., Ortega, C. E., Towner, M. C. and Muchlinski, A. E. (1990). Effect of bacterial pyrogen on three lizard species. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* **96**, 383–386.
- Hartzler, L. K. and Putnam, R. W. (2009). Central chemosensitivity in mammals. In *Cardio-Respiratory Control in Vertebrates: Comparative and Evolutionary Aspects* (ed. M. L. Glass and S. C. Wood), pp. 475–500. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hartzler, L. K., Dean, J. B. and Putnam, R. W. (2008). The chemosensitive response of neurons from the locus coeruleus (LC) to hypercapnic acidosis with clamped intracellular pH. *Adv. Exp. Med. Biol.* **605**, 333–337.
- Huang, R.-Q., Erlichman, J. S. and Dean, J. B. (1997). Cell–cell coupling between CO₂-excited neurons in the dorsal medulla oblongata. *Neuroscience* **80**, 41–57.
- Huckstepp, R. T. R. and Dale, N. (2011). Redefining the components of central CO₂ chemosensitivity - towards a better understanding of mechanism. *J. Physiol.* **589**, 5561–5579.
- Iceman, K. E., Corcoran, A. E., Taylor, B. E. and Harris, M. B. (2014). CO₂-inhibited neurons in the medullary raphe are GABAergic. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **203**, 28–34.

- Kiehn, O., Rostrup, E. and Møller, M.** (1992). Monoaminergic systems in the brainstem and spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans* as revealed by antibodies against serotonin and tyrosine hydroxylase. *J. Comp. Neurol.* **325**, 527-547.
- Liu, C., Li, R., Liu, Z., Yin, S. and Wang, Z.** (2006). The role of prostaglandins and the hypothalamus in thermoregulation in the lizard, *Phrynocephalus przewalskii* (Agamidae). *J. Comp. Physiol. B* **176**, 321-328.
- Lopez, K. H., Jones, R. E., Seufert, D. W., Rand, M. S. and Dores, R. M.** (1992). Catecholaminergic cells and fibers in the brain of the lizard *Anolis carolinensis* identified by traditional as well as whole-mount immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* **270**, 319-337.
- Mackenzie, J. A. and Jaccson, D. C.** (1978). The effect of temperature on cutaneous CO₂ loss and conductance in the bullfrog. *Respir. Physiol.* **32**, 313-323.
- Morales, R. D. and Hedrick, M. S.** (2002). Temperature and pH/CO₂ modulate respiratory activity in the isolated brainstem of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **132**, 477-487.
- Mulkey, D. K., Stornetta, R. L., Weston, M. C., Simmons, J. R., Parker, A., Bayliss, D. A. and Guyenet, P. G.** (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat. Neurosci.* **7**, 1360-1369.
- Nattie, E.** (1999). CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog. Neurobiol.* **59**, 299-331.
- Nattie, E. and Li, A.** (2009). Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J. Appl. Physiol.* **106**, 1464-1466.
- Nichols, N. L., Hartzler, L. K., Conrad, S. C., Dean, J. B. and Putnam, R. W.** (2008). Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* **605**, 348-352.
- Nichols, N. L., Wilkinson, K. A., Powell, F. L., Dean, J. B. and Putnam, R. W.** (2009). Chronic hypoxia suppresses the CO₂ response of solitary complex (SC) neurons from rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **168**, 272-280.
- Noronha-de-Souza, C. R., Bicego, K. C., Michel, G., Glass, M. L., Branco, L. G. and Gargaglioni, L. H.** (2006). Locus coeruleus is a central chemoreceptive site in toads. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R997-R1006.
- Oyamada, Y., Ballantyne, D., Mückenhoff, K. and Scheid, P.** (1998). Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J. Physiol.* **513**, 381-398.
- Pineda, J. and Aghajanian, G. K.** (1997). Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience* **77**, 723-743.
- Reeves, R. B.** (1972). An imidazole alaphastat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Respir. Physiol.* **14**, 219-236.
- Ritucci, N. A., Erlichman, J. S., Leiter, J. C. and Putnam, R. W.** (2005). Response of membrane potential and intracellular pH to hypercapnia in neurons and astrocytes from rat retrotrapezoid nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R851-R861.
- Santin, J. M. and Hartzler, L. K.** (2013). Respiratory signaling of locus coeruleus neurons during hypercapnic acidosis in the bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **185**, 553-561.
- Santin, J. M. and Hartzler, L. K.** (2015). Activation state of the hyperpolarization-activated current modulates temperature-sensitivity of firing in locus coeruleus neurons from bullfrogs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **308**, R1045-R1061.
- Santin, J. M., Watters, K. C., Putnam, R. W. and Hartzler, L. K.** (2013). Temperature influences neuronal activity and CO₂/pH sensitivity of locus coeruleus neurons in the bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R1451-R1464.
- Smeets, W. J. A. J. and González, A.** (2000). Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res. Rev.* **33**, 308-379.
- Stinner, J., Hartzler, L. and Grguric, M.** (1998). A protein titration hypothesis for the temperature-dependence of tissue CO₂ content in reptiles and amphibians. *J. Exp. Biol.* **201**, 415-424.
- Sundin, L., Burleson, M. L., Sanchez, A. P., Amin-Naves, J., Kinkead, R., Gargaglioni, L. H., Hartzler, L. K., Wiemann, M., Kumar, P. and Glass, M. L.** (2007). Respiratory chemoreceptor function in vertebrates comparative and evolutionary aspects. *Integr. Comp. Biol.* **47**, 592-600.
- Tattersall, G. J. and Boutilier, R. G.** (1999a). Constant set points for pH and P (CO₂) in cold-submerged skin-breathing frogs. *Respir. Physiol.* **118**, 49-59.
- Tattersall, G. J. and Boutilier, R. G.** (1999b). Does behavioural hypothermia promote post-exercise recovery in cold-submerged frogs? *J. Exp. Biol.* **202**, 609-622.
- ten Donkelaar, H. J., Bangma, G. C., Barbas-Henry, H. A., de Boer-van Huizen, R. and Wolters, J. G.** (1987). The brain stem in a lizard, *Varanus exanthematicus*. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **107**, 1-2.
- Wang, W. and Richerson, G. B.** (1999). Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. *Neuroscience* **90**, 1001-1011.
- Wang, W., Pizzonia, J. H. and Richerson, G. B.** (1998). Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. *J. Physiol.* **511**, 433-450.
- Wang, W., Tiwari, J. K., Bradley, S. R., Zaykin, R. V. and Richerson, G. B.** (2001). Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. *J. Neurophysiol.* **85**, 2224-2235.
- Withers, P. C.** (1978). Acid-base regulation as a function of body temperature in ectothermic toads, a heliothermic lizard, and a heterothermic mammal. *J. Therm. Biol.* **3**, 163-171.
- Wolters, J. G., ten Donkelaar, H. J. and Verhofstad, A. A. J.** (1984). Distribution of catecholamines in the brain stem and spinal cord of the lizard *Varanus exanthematicus*: an immunohistochemical study based on the use of antibodies to tyrosine hydroxylase. *Neuroscience* **13**, 469-493.
- Wood, S. C., Glass, M. L. and Johansen, K.** (1977). Effects of temperature on respiration and acid-base balance in a monitor lizard. *J. Comp. Physiol. B* **116**, 287-296.
- Wood, S. C., Johansen, K., Glass, M. L. and Hoyt, R. W.** (1981). Acid-base regulation during heating and cooling in the lizard, *Varanus exanthematicus*. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **50**, 779-783.
- Zena, L. A., Gargaglioni, L. H. and Bicego, K. C.** (2015). Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **179**, 81-88.

Apêndice D

“Baroreflex regulation affects ventilation in the cururu toad

***Rhinella schneideri*”**

RESEARCH ARTICLE

Baroreflex regulation affects ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri*

Lucas A. Zena^{1,2,*}, Glauber S. F. da Silva^{1,2}, Luciane H. Gargaglioni^{1,2} and Kênia C. Bicego^{1,2,*}

ABSTRACT

Anurans regulate short-term oscillations in blood pressure through changes in heart rate (f_H), vascular resistance and lymphatic f_H . Lung ventilation in anurans is linked to blood volume homeostasis by facilitating lymph return to the cardiovascular system. We hypothesized that the arterial baroreflex modulates pulmonary ventilation in the cururu toad *Rhinella schneideri*, and that this relationship is temperature dependent. Pharmacologically induced hypotension (sodium nitroprusside) and hypertension (phenylephrine) increased ventilation (25°C: 248.7±25.7 ml kg⁻¹ min⁻¹; 35°C: 351.5±50.2 ml kg⁻¹ min⁻¹) and decreased ventilation (25°C: 9.0±6.6 ml kg⁻¹ min⁻¹; 35°C: 50.7±15.6 ml kg⁻¹ min⁻¹), respectively, relative to control values from Ringer solution injection (25°C: 78.1±17.0 ml kg⁻¹ min⁻¹; 35°C: 137.7±15.5 ml kg⁻¹ min⁻¹). The sensitivity of the ventilatory response to blood pressure changes was higher during hypotension than during hypertension [25°C: -97.6±17.1 versus -23.6±6.0 breaths min⁻¹ kPa⁻¹; 35°C: -141.0±29.5 versus -28.7±6.4 breaths min⁻¹ kPa⁻¹, respectively; negative values indicate an inverse relationship between blood pressure and ventilation (or breathing frequency), i.e. as blood pressure increases, ventilation decreases, and vice versa], while temperature had no effect on these sensitivities. Hyperoxia (30%; 25°C) diminished ventilation, but did not abolish the ventilatory response to hypotension, indicating a response independent of peripheral chemoreceptors. Although there are previous data showing increased f_H baroreflex sensitivity from 15 to 30°C in this species, further increases in temperature (35°C) diminished f_H baroreflex gain (40.5±5.62 versus 21.6±4.64% kPa⁻¹). Therefore, besides an involvement of pulmonary ventilation in matching O₂ delivery to demand at higher temperatures in anurans, it also plays a role in blood pressure regulation, independent of temperature, possibly owing to an interaction between baroreflex and respiratory areas in the brain, as previously suggested for mammals.

KEY WORDS: Baroreceptors, Chemoreceptors, Lung ventilation, Hyperoxia, Autonomic blockade, Anuran amphibians

INTRODUCTION

Across vertebrates, the negative feedback mechanisms that drive short-term blood pressure regulation rely on mechanoreceptors (baroreceptors) located on the wall of the arterial system that detect fluctuations in blood pressure. The afferent baroreceptor

information is then relayed to and integrated in the central nervous system (CNS), where baroreflex buffering capacity is achieved by reflexively altering heart rate (f_H) and vascular resistance (Altimiras et al., 1998; Bianchi-da-Silva et al., 2000; Sandblom and Axelsson, 2005; Hedrick et al., 2015; Zena et al., 2015, 2016). Besides cardiovascular responses, the baroreflex also influences respiratory function in mammals (for a review, see McMullan and Pilowsky, 2010). Although there are some suggestive data for baroreflex modulation of the respiratory system in crocodylians and amphibians (Van Vliet and West, 1986; Altimiras et al., 1998; Hedrick et al., 2013), there is still no direct evidence of a respiratory component in the reflex regulation of blood pressure in non-mammalian vertebrates.

Amphibians' cardiorespiratory homeostatic mechanisms for monitoring blood pressure and blood gases involve sensory information from baroreceptors and chemoreceptors, respectively, located in their major arterial vessels: the pulmocutaneous artery, the carotid artery and the aortic arch (Bianchi-da-Silva et al., 2000; Reyes et al., 2014). While the identity of these receptors has already been described, their relative contributions to cardiorespiratory control remain under investigation. Arterial partial pressure of oxygen homeostasis is maintained by peripheral chemoreceptor regulation of breathing (Wang et al., 1994; Branco and Glass, 1995), whereas regulation of blood pressure by arterial baroreceptors is adjusted by changing vascular resistance and cardiac frequency. Furthermore, anurans possess lymph hearts (pulsatile organs), which are under baroreflex control, that function to pump lymph into the venous system (Crossley and Hillman, 1999).

Besides their role in gas exchange, amphibian lungs are associated with some ecophysiological functions including vocalization, buoyancy and defensive behavior (Hillman et al., 2009; Jared et al., 2009). In addition, lung ventilation has been directly linked to vertical lymph mobilization and, hence, blood volume homeostasis (Hedrick et al., 2007; Hillman et al., 2010). By transmitting pressure and volume changes to the surrounding lymph sacs, pulmonary ventilation in anuran amphibians facilitates lymph movement against gravitational forces towards dorsally located lymph hearts, thereby preventing lymph accumulation (Hedrick et al., 2013). As a component of the lymphatic system in anurans, dorsally located anterior and posterior lymphatic hearts participate in blood volume regulation by pumping lymphatic fluid generated by an increased net transcapillary flux back into the venous system (Crossley and Hillman, 1999). This is evident from the cane toad (*Rhinella marina*), which has an extraordinary ability to acutely compensate for high blood losses (78% of their initial blood volume), but destruction of both anterior and posterior lymph hearts critically impairs this ability, leading to hemoconcentration and death in few days (Baustian, 1988).

The cururu toad *Rhinella schneideri* is a widespread bufonid with a broad distribution in natural habitats in South America (Chaco, savanna-like Cerrado, and Atlantic Forest), and is also found in open

¹Department of Animal Morphology and Physiology, College of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil. ²National Institute of Science and Technology in Comparative Physiology (INCT Fisiologia Comparada), Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil.

*Authors for correspondence (lucaszena@yahoo.com.br; keniacb@fcav.unesp.br)

© L.A.Z., 0000-0002-4422-4458

List of symbols and abbreviations

CNS	central nervous system
f_H	heart rate
$F_{I_{O_2}}$	fraction of oxygen in the inspired air
f_R	breathing frequency
$P_{a_{O_2}}$	arterial partial pressure of oxygen
PAP	pulsatile arterial pressure
PE	phenylephrine
P_{MA}	mean arterial blood pressure
SNP	sodium nitroprusside
\dot{V}_E	total ventilation
V_T	tidal volume

and urban areas. Despite daily maximum air temperatures reaching over 35°C during the summer season in southeastern Brazil (CIIAGRO: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>), experiments have shown a preferred body temperature of around 23–27°C for this species (Bicego-Nahas et al., 2001; Guerra et al., 2008; Noronha-de-Souza et al., 2015). Therefore, in order to avoid potential damage due to extreme ambient temperatures, amphibians would seek places that maintain a more moderate humidity and temperature (Moreira et al., 2009; Noronha-de-Souza et al., 2015).

Based on the roles played by lung ventilation in blood volume homeostasis in anurans (Crossley and Hillman, 1999; Hedrick et al., 2007; Hillman et al., 2010, 2013) and in O₂ delivery to match metabolic demands, we tested the hypothesis that pulmonary ventilation contributes to the baroreflex responses to blood pressure imbalances in *R. schneideri*, and that this effect is modulated by changes in temperature. To this end, baroreflex function was assessed through pharmacological interventions on arterial blood pressure, i.e. the Oxford method, at 25 and 35°C. Heart rate buffering reflex responses were evaluated along with ventilation, breathing frequency and tidal volume. Considering that anuran peripheral chemoreceptors mainly adjust ventilation in response to changes in the partial pressure of arterial oxygen (Branco and Glass, 1995; Wang et al., 1994), toads were exposed to hyperoxia [fraction of oxygen in the inspired air ($F_{I_{O_2}}$)=0.30] to account for possible influences of peripheral chemoreceptors on the ventilatory response during hypotension at 25°C. Furthermore, ventilatory responses to hypotension were also tested after total autonomic blockade.

MATERIALS AND METHODS**Animals**

Cururu toads *Rhinella schneideri* (Werner 1894), of both sexes (159.5±7.7 g body mass), were collected in swampy areas in the Ribeirão Preto region of São Paulo State, Brazil (approximately 21°10'S and 47°48'W), and transported to our laboratory at the Department of Animal Morphology and Physiology, UNESP, Jaboticabal, Brazil (approximately 21°14'S and 48°17'W). All animals were maintained at 25°C on a 12 h:12 h light:dark cycle with free access to water from an artesian well and a basking area. They were housed in containers with coconut fiber as a substrate and tubes for hiding in, and were held under laboratory conditions for at least 3 weeks before experimentation. Animals were fed 2–3 times a week with captive-bred speckled cockroaches (*Nauphoeta cinerea*), which were dusted with calcium and vitamin D₃. All experiments were performed from September to March, which matches the activity season of this species (Bicego-Nahas et al., 2001; Glass et al., 1997). Animal collection was approved by the Brazilian environmental agency (SISBIO-ICMBio/no. 35484-1), and the study was conducted with the approval of our Institutional Animal

Care and Use Committee (CEUA-FCAV-UNESP; protocol no. 017204/12).

Surgical procedures

Procedures were performed as previously described (Zena et al., 2015). Briefly, anesthesia was performed through immersion in an aqueous 0.25% solution of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222; Sigma, St Louis, MO, USA), buffered to pH 7.7 with sodium bicarbonate, for 10 min or more until animals lost the palpebral reflex. A polyethylene cannula (PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA), filled with heparinized Ringer solution (100 i.u. ml⁻¹ heparin) was occlusively inserted into the iliac artery and sutured in place. The same procedure was used to cannulate the femoral vein (100 i.u. ml⁻¹ heparin in Ringer solution) for drug injections. Just after surgery, toads were treated with a prophylactic antibiotic (enrofloxacin, Flotril®, 5.0 mg kg⁻¹ s.c.; Schering-Plough) and an analgesic (flunixin meglumine, Banamine®, 1.0 mg kg⁻¹ s.c.; Schering-Plough) (Gentz, 2007; Smith, 2007). Each animal was then individually placed in a temperature-controlled chamber at 25°C in the experimental room, where it was allowed to recover for a minimum of 48 h without disturbance before the experimental procedure was begun.

Drugs

Phenylephrine hydrochloride (PE, agonist of α 1-adrenergic receptors), sodium nitroprusside dihydrate (SNP, nitric oxide donor), atropine sulfate (antagonist of muscarinic receptors) and sotalol hydrochloride (antagonist of β -adrenergic receptors) were purchased from Sigma. All drugs were dissolved in amphibian Ringer solution (mmol l⁻¹: 46.9 NaCl, 21.0 KCl, 2.40 CaCl, 1.29 MgCl, 3.14 NaHCO₃).

Ventilation and arterial blood pressure measurements

Pulmonary ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T) and breathing frequency (f_R) were calculated from the recordings of breathing using the pneumotachography method described by Glass et al. (1978). A facemask was built for each toad from 1.0 mm-thick silicon sheets (Bio-Art Equipamentos Odontológicos, São Carlos, Brazil) heat-molded on a plaster cast of the toad's head. The pneumotachograph was attached to the mask and subsequently fixed to the animal's snout (see below), allowing airflow to be measured continuously. A direct relationship exists between laminar airflow and the pressure difference across this tube, which was monitored with a differential pressure transducer (MLT141Spirometer, PowerLab System, ADInstruments) connected to a data acquisition system that included specific application software (PowerLab System, ADInstruments/Chart Software, v7.3, Sydney, Australia). Calibrations were performed for each mask by injecting 1, 3 and 5 ml volumes of air through the pneumotachograph using a graduated syringe. The arterial cannulae were connected to a physiological pressure transducer (MLT844, ADInstruments), calibrated against a mercury column. The transducer was connected to a data acquisition system (PowerLab System, ADInstruments/Chart Software, v7.3) via a bridge amplifier (FE221, ADInstruments). f_H and mean arterial blood pressure (P_{MA}) were calculated from the pulsatile arterial pressure (PAP) recorded in real-time using the cyclic measurements tool from the Chart Software.

Experimental protocol

Toads were housed in an acrylic water-jacketed chamber kept at the experimental temperature of 25°C using a constant-temperature

circulating water bath (PolyScience 9112A11B programmable model 9112 refrigerated circulator). A facemask attached to the pneumotachograph was glued to the animal's snout using a polyether impression material (Impregum Soft, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) 24 h after surgery. Experiments began 48 h after surgery and 24 h after facemask attachment. For experiments at high temperature, the toads were acclimated to 35°C for at least 6 h, beginning 48 h after surgery. The experimental chamber was continuously flushed with humidified room air, and the temperature inside was continuously measured using a temperature sensor (MLT415/M thermistor temperature sensor, ADInstruments). After 60 min of basal recordings of f_H , blood pressure and ventilation airflow, Ringer solution (0.4 ml kg⁻¹) was injected into the femoral vein in order to verify any influence of volume injection on all variables subsequently evaluated. Serial intravenous injections of increasing doses of PE and SNP were then performed (doses are given in 'Analysis and assessment of the baroreflex', below). All cardiorespiratory parameters were recorded throughout the experimental protocol. Between drug injections, cardiorespiratory parameters were always allowed to return to similar pre-injection values.

Five animals from the main experimental group described above had full autonomic blockade at 25°C, which was performed on the day after the baroreflex experiment. It consisted of injections of the β -adrenergic receptor antagonist sotalol (3.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and of the muscarinic receptor antagonist atropine (3.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Cardiorespiratory variables were recorded continuously in animals injected with SNP (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) before and after full autonomic blockade.

Five additional animals were subjected to hyperoxia ($F_{I\text{O}_2}=0.30$) to identify any possible involvement of the peripheral chemoreceptors in the respiratory responses to blood pressure

adjustments. For hyperoxia experiments, following the baroreflex protocol, animals were exposed to 30% O₂ for at least 30 min. After this interval, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SNP injection was repeated in order to identify respiratory responses under hypotension in the hyperoxic condition.

Analysis and assessment of the baroreflex

Reflex responses of f_H were evaluated by altering blood pressure through serial injections of increasing doses of PE (5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; eliciting blood pressure increases) and SNP (5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; eliciting blood pressure decreases) at both 25 and 35°C. f_H was plotted against P_{MA} (kPa) data obtained for each animal at each temperature and fitted to a four-variable sigmoidal logistic function as described previously by Reid (1996):

$$f_H = \frac{(A - D)}{1 + (P_{\text{MA}}/C)^B} + D, \quad (1)$$

where A is maximum f_H and D is minimum f_H (beats min⁻¹) of the curve, B is the slope coefficient (beats min⁻¹ kPa⁻¹) and C is the P_{MA} at the midpoint of the f_H range ($P_{\text{MA},50}$; kPa). The range of the baroreflex was calculated as the difference between A and D . The maximum gain of the curve (G_{50} ; beats min⁻¹ kPa⁻¹), which occurs when P_{MA} equals C , was determined by taking the first derivative of Eqn 1, resulting in the gain equation:

$$G_{50} = \frac{-B(A - D)}{4C}. \quad (2)$$

To allow meaningful comparisons between temperatures, the maximal gain was normalized as a percentage change in f_H per unit

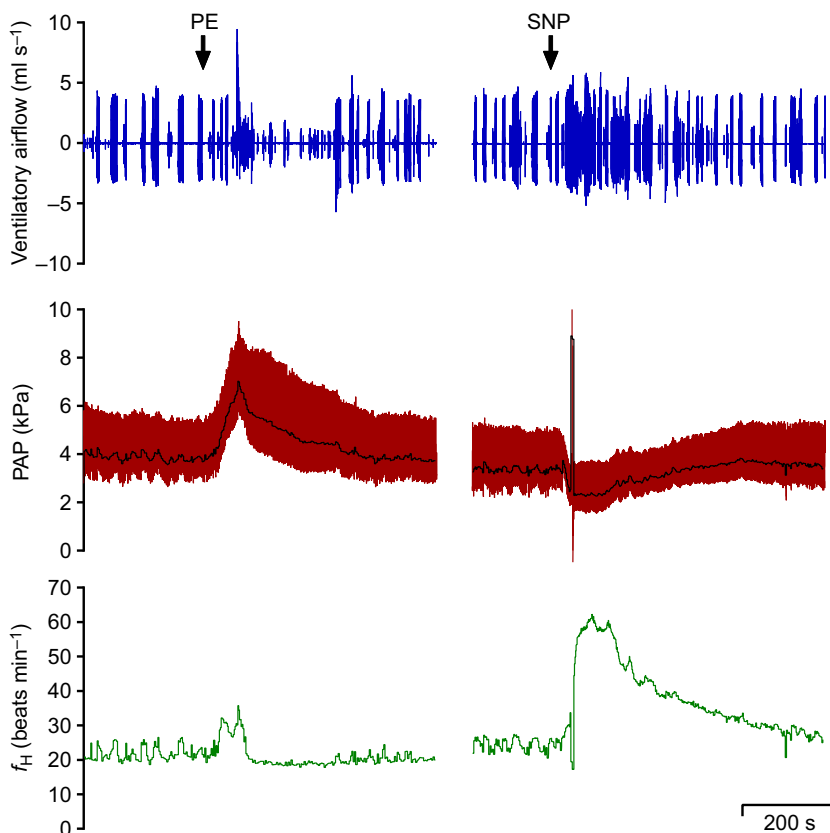


Fig. 1. Ventilatory airflow, pulsatile arterial blood pressure (PAP) and heart rate (f_H) of the cururu toad *Rhinella schneideri* at 25°C. Original traces from one toad. The arrows indicate the time of intravenous injection of phenylephrine (PE; 50.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and sodium nitroprusside (SNP; 50.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The black line in the PAP signal represents mean arterial blood pressure (P_{MA}).

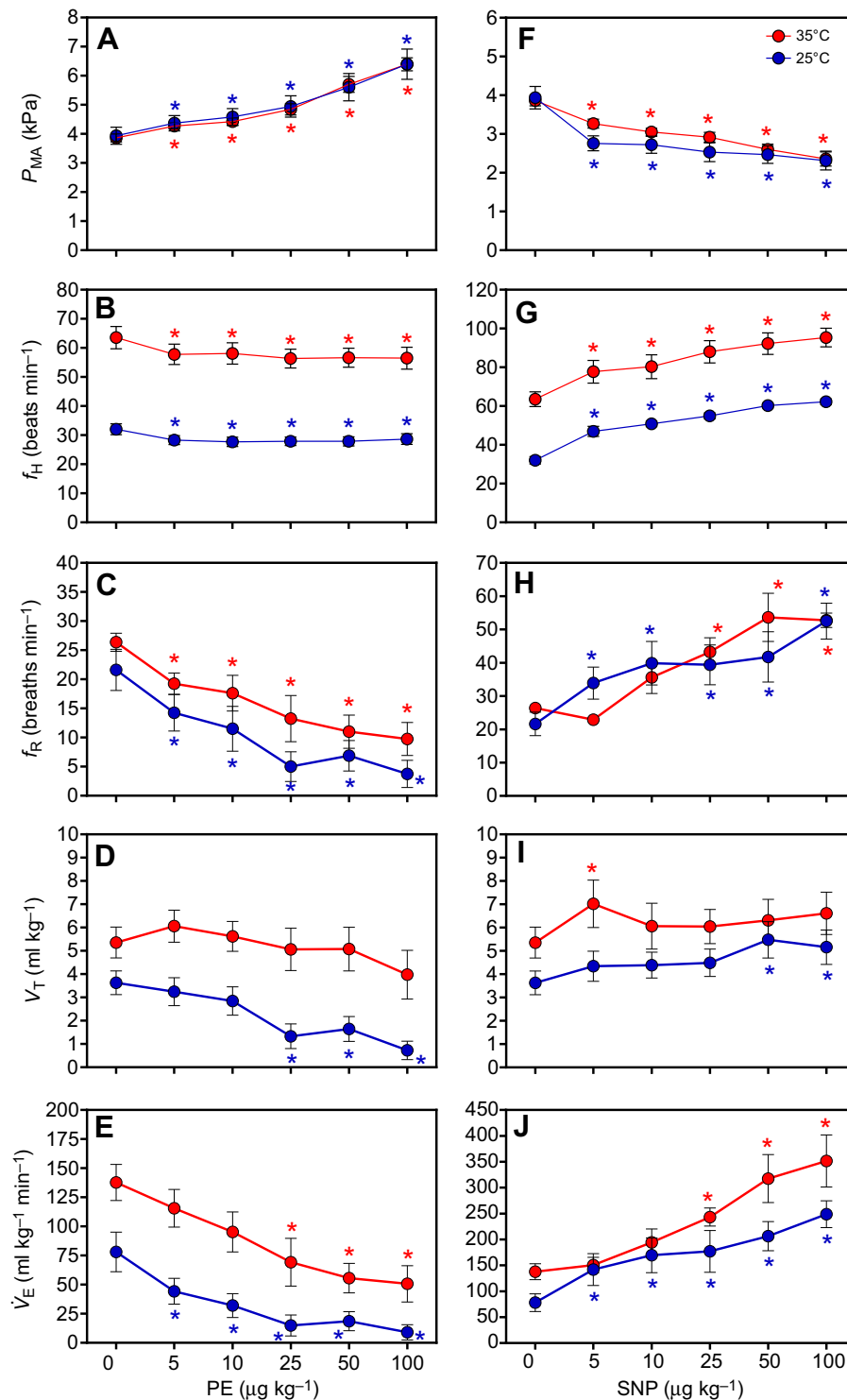


Fig. 2. Effect of pharmacological manipulations on P_{MA} , f_H , breathing frequency (f_R), tidal volume (V_T) and ventilation (\dot{V}_E) in *R. schneideri* at 25 and 35°C. Data are for intravenous injection of Ringer solution and serially increasing doses of PE (A–E) and SNP (F–J) at 25 and 35°C. Blue asterisks indicate a significant effect of drugs relative to Ringer solution at 25°C; red asterisks indicate a significant effect of drugs relative to Ringer solution at 35°C (two-way repeated measures ANOVA; $P < 0.05$; Holm–Šidák's *post hoc* test). Cardiovascular parameters, $N=9$; ventilatory parameters, $N=8$.

change in P_{MA} (% kPa^{-1}) relative to the minimum heart rate (D), as described by Altimiras et al. (1998):

$$G = \frac{100B}{D}. \quad (3)$$

Data analysis and statistics

Data are shown as means \pm s.e.m. The effect of temperature on baseline cardiorespiratory and baroreflex variables was analyzed through a Student *t*-test and Mann–Whitney *U*-test for parametric

and non-parametric data, respectively. The effects of Ringer solution and serial bolus injection of PE and SNP on P_{MA} , f_H , f_R , V_T and \dot{V}_E at 25 and 35°C were analyzed using a two-way repeated-measures ANOVA (factors: drugs and temperature). Different $F_{I_{O_2}}$ (0.21 and 0.30) before and after SNP-induced hypotension for \dot{V}_E and the effect of full autonomic blockade on hypotension induced by SNP were analyzed through two-way repeated-measures ANOVA. Regression analyses were used to evaluate temperature influences on f_R/P_{MA} and \dot{V}_E/P_{MA} relationships during hypotension and hypertension stimuli and a two-way ANOVA was used to

Table 1. Baseline cardiorespiratory and baroreflex variables derived from sigmoidal baroreflex–heart rate curves generated after serial bolus injections of phenylephrine and sodium nitroprusside (Eqn 1) at 25 and 35°C in the toad *Rhinella schneideri*

	25°C	35°C	<i>P</i>
Baseline variables			
P_{MA} (kPa)	3.95±0.31	3.83±0.15	0.73
f_H (beats min ⁻¹)	32.2±1.83	64.3±3.69	<0.001*
\dot{V}_E (ml kg ⁻¹ min ⁻¹)	62.0±11.5	143.3±15.9	0.001*
V_T (ml kg ⁻¹)	3.80±0.53	5.79±0.68	0.037*
f_R (breaths min ⁻¹)	18.3±3.95	25.2±1.96	0.14
Baroreflex variables			
Minimum f_H (beats min ⁻¹)	27.0±1.61	54.5±3.47	<0.001*
Maximum f_H (beats min ⁻¹)	62.3±1.45	96.1±4.94	<0.001*
f_H range (beats min ⁻¹)	35.3±2.74	41.6±3.48	0.17
R^2	0.93±0.01	0.94±0.02	0.48
Slope coefficient	10.9±1.62	11.3±2.02	0.93
$P_{MA,50}$ (kPa)	3.10±0.21	3.32±0.09	0.38
G_{50} (beats min ⁻¹ kPa ⁻¹)	30.8±4.49	38.3±9.80	1.00
Normalized gain (% kPa ⁻¹)	40.5±5.62	21.6±4.64	0.017*

P_{MA} , mean arterial blood pressure; f_H , heart rate; \dot{V}_E , ventilation; V_T , tidal volume; f_R , breathing frequency; R^2 , coefficient of determination; slope coefficient, slope of the linear portion of the curve; $P_{MA,50}$, mean arterial blood pressure at the midpoint of the curve; G_{50} , maximum gain.

Data are expressed as means±s.e.m. Cardiovascular and baroreflex parameters, $N=9$; ventilatory parameters, $N=8$.

*Significant difference between temperatures.

compare slopes (pressure and temperature). In addition, the relationship between P_{MA} and ventilatory responses (f_R , V_T and \dot{V}_E) was binned into P_{MA} categories in order to evaluate the influence of temperature in those relationships (two-way ANOVA; pressure and temperature). In all ANOVA analyses, the differences among means were further assessed by Holm–Šidák *post hoc* tests and were considered significant when $P<0.05$. Data were tested for unequal variance and normality, and when necessary appropriate transformations were performed.

RESULTS

Mean baseline cardiorespiratory variables for toads at 25 and 35°C are shown in Table 1. No significant temperature effect on P_{MA} was observed ($P=0.73$), whereas f_H was significantly elevated at 35°C ($P<0.001$). Temperature significantly augmented resting \dot{V}_E ($P=0.001$) in toads, mainly by increases in V_T ($P=0.037$).

An original PAP trace of one toad at 25°C exhibiting a typical tachycardic reflex response to a reduction in P_{MA} after injection of SNP (50 µg kg⁻¹) is shown in Fig. 1. In addition, a parallel increase in ventilatory airflow was observed during hypotension. In contrast, the increase in P_{MA} after a bolus injection of PE (50 µg kg⁻¹) had a very small effect on f_H (small bradycardia) besides the diminished ventilatory airflow.

Effect of temperature on the blood pressure influence on cardiorespiratory variables

Serial injections of increasing doses of PE elevated P_{MA} (effect of treatment: $P<0.001$; $F_{5,102}=90.141$; Fig. 2A) and evoked a small decrease in f_H (effect of treatment: $P<0.001$; $F_{5,102}=20.049$; Fig. 2B) at both temperatures tested, while temperature had significant effects on f_H (effect of temperature: $P<0.001$; $F_{1,106}=59.548$; Fig. 2B), but not on P_{MA} (Fig. 2A). Along with reflexive effects on f_H , PE-induced hypertension caused a significant decrease in f_R independent of temperature (effect of treatment: $P<0.001$; $F_{5,90}=21.137$; Fig. 2C). In contrast, V_T was significantly reduced by injections of 25, 50 and 100 µg kg⁻¹ PE at

25°C only (effect of treatment: $P<0.001$; $F_{5,90}=5.951$; Fig. 2D). When temperature was increased to 35°C, V_T remained unchanged for all doses of PE that induced hypertension, but was elevated relative to values at 25°C (effect of temperature: $P<0.001$; $F_{1,94}=19.565$; Fig. 2D). Overall, increasing P_{MA} evoked parallel reductions in \dot{V}_E independent of temperature (effect of treatment: $P<0.001$; $F_{5,90}=17.783$; Fig. 2E), mainly due to decreases in f_R . Because V_T was unaffected by hypertension at 35°C, \dot{V}_E values were maintained elevated at 35°C relative to those at 25°C (effect of temperature: $P=0.002$; $F_{1,94}=13.858$; Fig. 2E).

In contrast to PE effects, serial injections of increasing doses of SNP decreased P_{MA} (interaction of temperature×treatment: $P=0.028$; $F_{5,102}=2.671$; Fig. 2F), causing a pronounced reflex increase in f_H (interaction of temperature×treatment: $P=0.049$; $F_{5,102}=2.343$; Fig. 2G). In addition, because high temperature significantly shifted baseline f_H to higher values (see Table 1), reflex tachycardia was also maintained elevated across all SNP-induced hypotension doses relative to 25°C (effect of temperature: $P<0.001$; $F_{1,106}=73.105$; Fig. 2G). Reductions of P_{MA} induced increases in f_R (effect of treatment: $P<0.001$; $F_{5,90}=16.858$; Fig. 2H) that were followed by increases in V_T at higher doses of SNP at 25°C, while SNP-induced hypotension evoked an increase in V_T at the lowest SNP dose at 35°C only (effect of treatment: $P=0.002$; $F_{5,90}=4.398$; Fig. 2I). Thus, regardless of temperature, SNP-induced hypotension effects on V_T and f_R in *R. schneideri* resulted in a significant increase in total ventilation (effect of treatment: $P<0.001$; $F_{5,90}=24.656$; Fig. 2J).

Effect of temperature on the relationship between P_{MA} , f_H and \dot{V}_E

Increasing the temperature from 25 to 35°C resulted in an upward shift in the relationship between P_{MA} and f_H (Fig. 3). The operating point (represented by baseline P_{MA} and f_H values) in this relationship was moved up mainly because of temperature effects on baseline f_H ($P<0.001$; Table 1 and Fig. 3). Despite a 10°C increment in temperature, the f_H baroreflex was not enhanced, as can be observed by similarities between absolute gain at 25 and 35°C ($P=1.0$; Table 1). Because of the significant effect of temperature on resting f_H , absolute gain was then

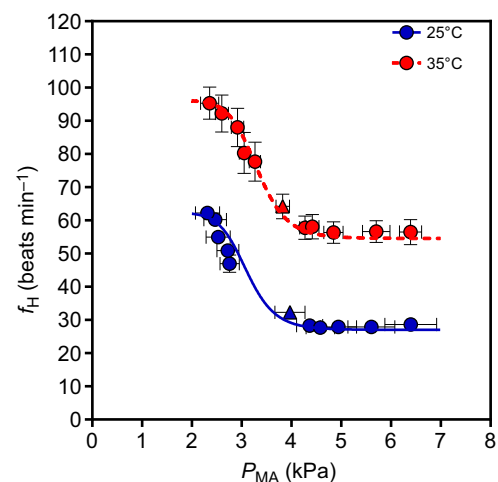


Fig. 3. Mean baroreflex relationship between P_{MA} and f_H in *R. schneideri* at 25 and 35°C. Curves were generated from the mean values of the curve-fitted variables for each animal (see Table 1). Baseline f_H and P_{MA} are represented by the blue triangle at 25°C ($N=9$) and the red triangle at 35°C ($N=9$). For statistical values, see baroreflex variables derived from sigmoidal baroreflex– f_H curves in Table 1.

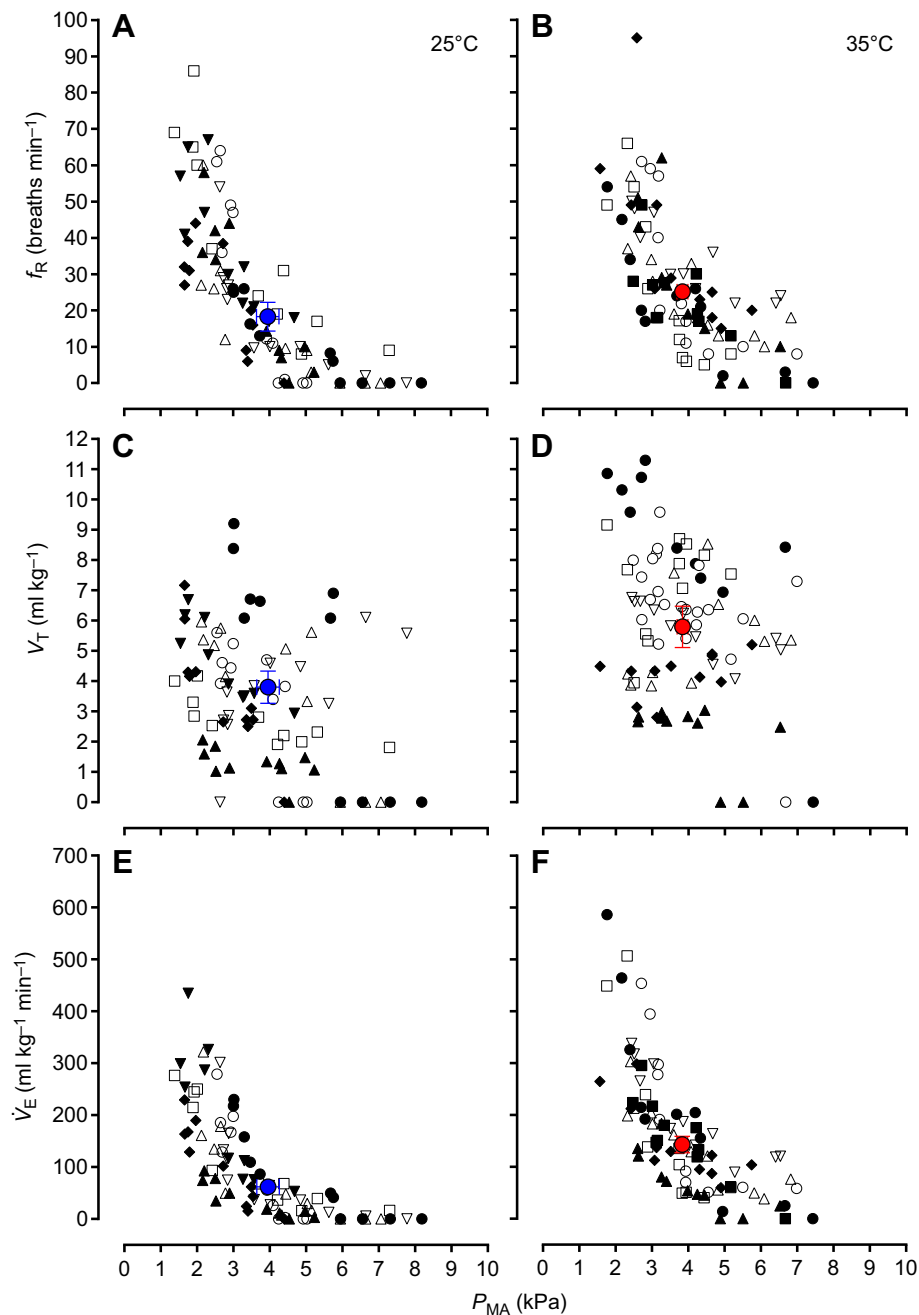


Fig. 4. The effect of changing P_{MA} on f_R , V_T and \dot{V}_E in *R. schneideri* at 25 and 35°C. (A,B) f_R ; (C,D) V_T ; (E,F) \dot{V}_E . Baseline f_R , V_T , \dot{V}_E and P_{MA} are represented by blue circles at 25°C ($N=8$) and red circles at 35°C ($N=8$). Different symbols represent different animals.

normalized as a percentage change from minimum f_H per unit change in P_{MA} (kPa), which resulted in a significant reduction of the normalized gain ($P=0.017$; Table 1) at the higher temperature. In addition to temperature effects on resting f_H , minimum and maximum f_H were also significantly affected by temperature ($P<0.001$; Table 1 and Fig. 3).

The effect of changing P_{MA} on ventilatory responses (f_R , V_T and \dot{V}_E) is represented by the relationships presented in Figs 4–6. The overall variability dataset for both temperatures, showing the relationship between P_{MA} and f_R , V_T or \dot{V}_E , is depicted in Fig. 4. Breathing data from one representative toad are illustrated in Fig. 5, showing the slopes in f_R/P_{MA} and \dot{V}_E/P_{MA} during SNP-induced hypotension and PE-induced hypertension at 25 and 35°C; slopes were not presented for V_T/P_{MA} because there was a poor relationship for most animals, as can be observed in Fig. 4C,D. The sensitivity of

the response (slope) due to hypotension or hypertension was not affected by thermal changes for either f_R/P_{MA} ($P=0.84$) or \dot{V}_E/P_{MA} ($P=0.18$) but hypotension exhibited higher average slopes for f_R/P_{MA} ($P<0.001$; $F_{1,90}=40.369$) and \dot{V}_E/P_{MA} ($P<0.001$; $F_{1,30}=52.764$) relationships than hypertension at both temperatures (Table 2).

To test the specific responses of ventilatory variables to blood pressure changes under the two thermal conditions, the relationships between P_{MA} and f_R , V_T or \dot{V}_E were examined for P_{MA} data binned into 1.0 kPa intervals (Fig. 6). f_R was significantly elevated at 35°C for pressures higher than 4.0 kPa only (hypertension; effect of temperature: $P<0.001$; $F_{1,175}=20.174$; Fig. 6A), while \dot{V}_E was maintained at higher values at 35°C across all P_{MA} binned ranges from hypotension to hypertension (effect of temperature: $P<0.001$; $F_{1,175}=61.694$; Fig. 6C), mainly because of

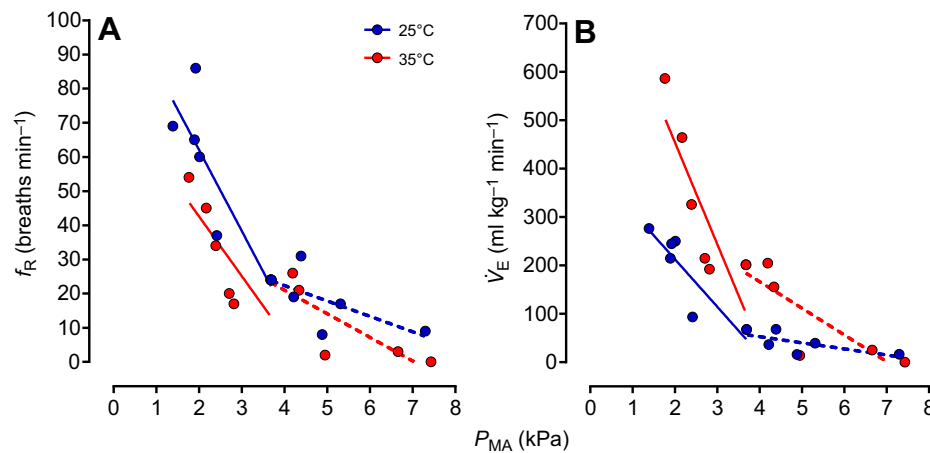


Fig. 5. Representative data from one toad for the relationship between P_{MA} and f_R or \dot{V}_E at 25 and 35°C. (A) The effect of changing P_{MA} on f_R in the presence of SNP (continuous blue line, 25°C: $r^2=0.70$; $P=0.04$; continuous red line, 35°C: $r^2=0.60$; $P=0.07$) and PE (dotted blue line, 25°C: $r^2=0.42$; $P=0.16$; dotted red line, 35°C: $r^2=0.72$; $P=0.03$). (B) The effect of changing P_{MA} on \dot{V}_E in the presence of SNP (continuous blue line, 25°C: $r^2=0.77$; $P=0.02$; continuous red line, 35°C: $r^2=0.72$; $P=0.03$) and PE (dotted blue line, 25°C: $r^2=0.47$; $P=0.13$; dotted red line, 35°C: $r^2=0.72$; $P=0.03$).

changes in V_T (effect of temperature: $P<0.001$; $F_{1,175}=49.823$; Fig. 6B).

Effects of cholinergic and adrenergic receptor blockade on cardiorespiratory parameters

The effect of full autonomic blockade with atropine plus sotalol on P_{MA} , f_H and \dot{V}_E before and after SNP-induced hypotension in *R. schneideri* is shown in Fig. 7. Full autonomic blockade blunted the tachycardic reflex induced by hypotension (interaction of full autonomic blockade \times treatment: $P<0.001$; $F_{1,22}=48.265$; Fig. 7B); in contrast, hypotension-induced increases in \dot{V}_E were not affected by full autonomic blockade ($P=0.74$; Fig. 7C).

SNP-induced hypotension effects on ventilation under normoxia and hyperoxia

In toads exposed to hyperoxia ($F_{I_{O_2}}=0.30$), ventilation was significantly reduced ($P=0.032$; $F_{1,28}=3.177$; Fig. 8). Similar to animals under normoxic conditions, animals breathing 30% O_2 also expressed an increased ventilatory response ($P<0.001$; $F_{1,28}=96.581$; Fig. 8) after SNP-induced hypotension that did not differ from those values obtained from the group breathing normoxic gas ($P=0.6$).

DISCUSSION

Our finding that changes in lung ventilation are driven by pressure loading and unloading in the cururu toad *R. schneideri* provides evidence of an interesting interaction among baroreceptor reflexes, pulmonary ventilation and the lymphatic system in anuran amphibians (Burggren et al., 2013; Hedrick et al., 2013). Furthermore, in contrast to previous data showing increases in baroreflex sensitivity for the thermal interval between 15 and 30°C, an elevation in temperature to 35°C diminished f_H baroreflex sensitivity, but ventilatory responses to hypotension and hypertension were temperature independent.

Blood pressure homeostasis in anuran amphibians

As part of cardiovascular homeostasis in anuran amphibians, baroreceptors located in the arterial system buffer short-term blood pressure fluctuations reflexively via effectors that modulate f_H and peripheral vascular resistance. Given their high rate of lymph formation, approximately 10 times that of mammals (Desai, et al., 2010; Hillman et al., 2010), anurans have a highly efficient lymphatic system to maintain cardiovascular homeostasis. The importance of the two pairs of dorsally located lymph hearts in blood pressure homeostasis has been revealed by findings that

arterial baroreceptor loading is able to reflexively decrease lymphatic f_H , thereby decreasing lymph fluid return into the venous system (Yamane, 1990; Crossley and Hillman, 1999). In addition, lymph heart destruction results in a marked increase in red cell volume, interstitial edema and also death (Zwemer and Foglia, 1943; Baustian, 1988). Generated extravascular fluid in anuran amphibians returns to the cardiovascular system through a combination of changes in pressure and volume of the lymph sacs that is driven by effectors such as lung ventilation (inflation and deflation) and skeletal muscle contraction (Drewes et al., 2007; Hedrick et al., 2007). Therefore, from an evolutionary perspective, ventilatory responses that may be modulated by baroreceptor loading and unloading in *R. schneideri* can contribute to our understanding of a number of pieces of evidence for the influence of the cardiovascular system on the respiratory system in mammals (Brunner et al., 1982; Walker and Jennings, 1998; Baekey et al., 2010; McMullan and Pilowsky, 2010; Stewart et al., 2011). More interestingly, our findings add further support to a role for lung ventilation in blood pressure/volume homeostasis in anuran amphibians (Hedrick et al., 2013), although the relationship between pulmonary ventilation, baroreflex and lymphatic system in our toads is still correlational rather than mechanistic. Therefore, further studies are needed to clarify the real contribution of ventilation-driven pressure changes in lymph return.

The nucleus of the solitary tract is the major brainstem region receiving and integrating peripheral cardiovascular and respiratory afferent inputs in mammals (Lowey and Spyer, 1990). Baroreceptor afferents also converge towards the nucleus of the solitary tract in *R. schneideri* (Bianchi-da-Silva et al., 2000), but any other synaptic transmission in the CNS of amphibians related to baroreflex control is still unknown. High intensity stimulation of the recurrent laryngeal nerve, which innervates the pulmocutaneous baroreceptors, elicits cardiovascular adjustments such as bradycardia and hypotension in addition to an increased apnea period in awake *R. marina* toads (Van Vliet and West, 1986). This observation corroborates the hypertension-induced reduction in ventilation we see in our toads. Extensive overlap between respiratory and cardiovascular areas and the dose-dependent increase in pulse pressure gradually extending expiratory time in rats (*in situ* preparation) indicates the presence of a neural interaction between the baroreflex and respiratory patterns (Baekey et al., 2008, 2010). It is possible that anuran amphibian baroreceptor inputs into the nucleus of the solitary tract could cause suppression or release of the central respiratory drive, contributing to hypopnea and hyperpnea, respectively. Thus, relationships between blood pressure, ventilation and the lymphatic system may depend on

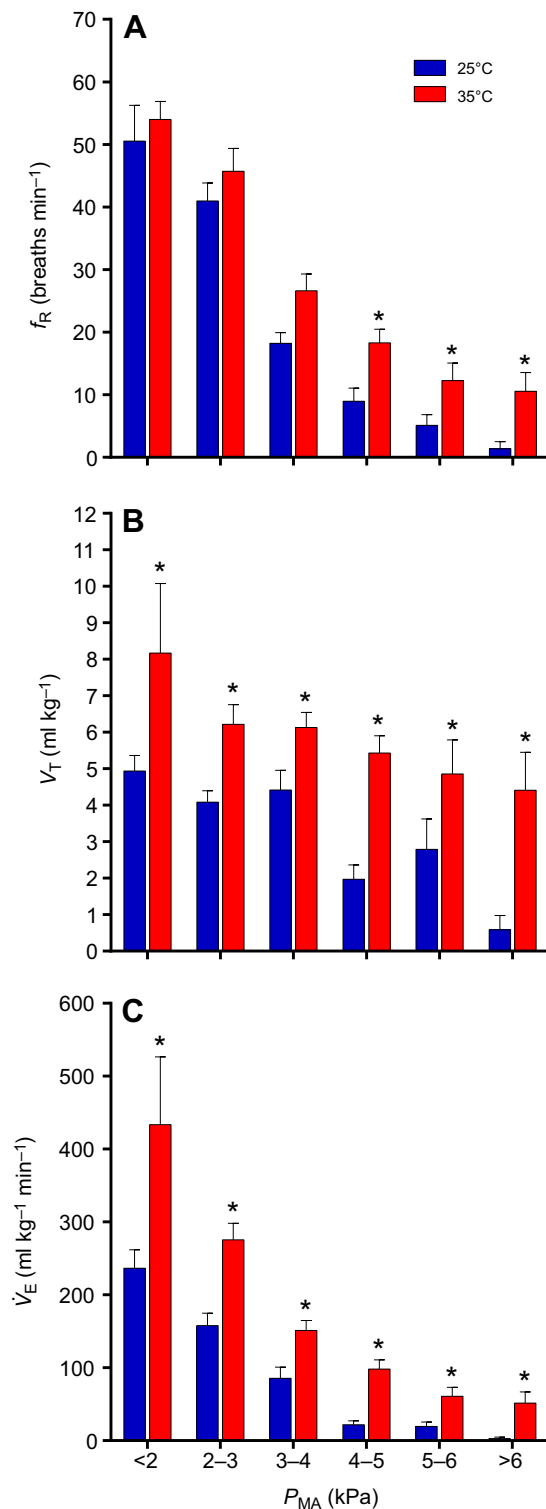


Fig. 6. Relationships between binned P_{MA} and f_R , V_T or \dot{V}_E in *R. schneideri* at 25 and 35°C. (A) f_R ; (B) V_T ; (C) \dot{V}_E . P_{MA} was grouped into six categories covering pressures from lower than 2.0 kPa to higher than 6.0 kPa; note that pressures between 2.0 and 6.0 kPa were binned into 1.0 kPa intervals. *Significant effect of temperature within binned P_{MA} interval (two-way ANOVA; $P < 0.05$; Holm–Šidák’s *post hoc* test).

integrated information in the CNS; however, whether these circuits exist and/or are interacting with each other remains to be further investigated in amphibians.

One may argue that the respiratory response to hypotension results from peripheral chemoreflex activation, but evidence does not support this hypothesis. In toads, we know that the hypoxic ventilatory response is mediated by reductions in arterial partial pressure of oxygen (P_{aO_2}) (Wang et al., 1994; Branco and Glass, 1995). In this context, the discharge frequency of the carotid chemoreceptors in *R. marina* did not increase until P_{aO_2} fell between 5.3 and 8.0 kPa (40–60 mm Hg), and remained silenced in hyperoxic gas conditions (30% O_2 in inspired air; Van Vliet and West, 1992). In our animals, an increased $F_{I_{O_2}}$ (0.30) in the air decreased baseline \dot{V}_E and did not abolish the ventilatory response to hypotension (Fig. 8), suggesting little to no involvement of these chemoreceptors. In addition, hypoxic ventilatory responses in *R. schneideri*, in order to improve lung gas exchange, are mediated by altering V_T rather than f_R (Bicego-Nahas et al., 2001; Gargaglioni and Branco, 2001, 2003), while increases in ventilation elicited by hypotension in the present study were achieved through increases in f_R rather than V_T (Fig. 2). We also know that, at least in *R. marina*, carotid labyrinth chemoreceptors are not flow sensitive; afferent nerve activity is not affected by carotid labyrinth blood supply cessation, and the hypoxia stimulus is no longer effective in stimulating chemoreceptors in these conditions (Van Vliet and West, 1992). Thus, our data suggest that ventilatory responses during acute hypotension may instead be a consequence of baroreceptors influencing respiratory areas. Further support for this view comes from our results with hypertension, which induced the opposite response, i.e. ventilation decrease.

Temperature effects on cardiorespiratory reflex responses

In the present study, increasing the temperature to 35°C promoted cardiovascular and respiratory adjustments such as increases in baseline f_H and \dot{V}_E . \dot{V}_E was affected by temperature from 25 to 35°C (127% increase, $Q_{10}=2.27$), mainly as a result of increases in V_T ($Q_{10}=1.57$). Thus, increased \dot{V}_E at high temperature matches an elevated metabolic rate up to 105% (thermal interval range from 25 to 35°C) reported in a closely related species, *R. marina* (Overgaard et al., 2012). High temperature exposure (35°C) in *R. schneideri* elicited cardiovascular adjustments to support an increased metabolic demand in which baseline f_H rose 100% relative to that at 25°C, while blood pressure remained unchanged. Sustaining blood pressure relatively constant, for the thermal interval between 25 and 35°C, while resting f_H increased accordingly, likely reflects a general peripheral vasodilation (Zena et al., 2015), as stroke volume remains fairly constant (Hedrick et al., 1999).

Pharmacologically induced changes in blood pressure not only triggered baroreflex responses in f_H but also affected \dot{V}_E in *R. schneideri*, similar to what has been reported for mammals (Brunner et al., 1982; Walker and Jennings, 1998; McMullan and Pilowsky, 2010; Stewart et al., 2011). Increases in blood pressure in the toads were followed by reductions in \dot{V}_E , primarily through modification of f_R and to a lesser extent V_T ; conversely, \dot{V}_E was significantly increased during hypotension. In contrast to decreases in V_T during hypertension at 25°C (higher doses of PE), hypertension at 35°C was unable to decrease V_T , despite diminished f_R . In addition, the relationship between P_{MA} and the ventilatory responses (binned P_{MA} data; Fig. 6) revealed that at high temperature, toads exhibit elevated ventilation throughout the entire P_{MA} range (<2 to >6 kPa), mainly because of increased V_T . This permits the toads to keep an elevated ventilatory airflow in their lungs, ensuring sufficient gas exchange at the organ level during high metabolic demand, while their ability to change ventilation in response to baroreceptor loading and unloading is preserved

Table 2. Regression analysis slopes for the relationships between P_{MA} and f_R or \dot{V}_E generated after serial bolus injections of phenylephrine (hypertension) and sodium nitroprusside (hypotension) at 25 and 35°C in the toad *R. schneideri*

Temperature (°C)	f_R slope (breaths min^{-1} kPa^{-1})		<i>P</i>	\dot{V}_E slope (ml kg^{-1} min^{-1} kPa^{-1})		<i>P</i>
	Hypotension	Hypertension		Hypotension	Hypertension	
25	-16.8±4.8	-7.1±2.1	<0.001*	-97.6±17.1	-23.6±6.0	<0.001*
35	-19.8±3.0	-4.8±0.7	<0.001*	-141.0±29.5	-28.7±6.4	<0.001*

*Significant difference between hypotension and hypertension slopes (Student's *t*-test) within each temperature. f_R slope, slope relationship between f_R and P_{MA} ; \dot{V}_E slope, slope relationship between \dot{V}_E and P_{MA} . *N*=8.

(Table 2 and Fig. 5). In agreement with the ability of anurans to respond to hypotension primarily by increasing f_H (Hedrick et al., 2015; Zena et al., 2015), *R. schneideri* also exhibited a prominent ventilatory response to reductions rather than increases in blood pressure. This provides correlational data for the ability of anurans to use their lungs to regulate blood volume (Hedrick et al., 2013); in addition, it contributes to a prevailing view that amphibians strongly

defend short-term blood pressure imbalances against low pressure events (Hedrick et al., 2015; Zena et al., 2015).

Beyond temperature-independent sensitivity of the ventilatory reflex response, the baroreflex of f_H in our toads in fact diminished at 35°C, as seen by the normalized gain (Table 1). This suggests that the cardiac limb of the baroreflex response is possibly approaching its thermal limit. In a previous study (Zena et al., 2015), we showed that f_H baroreflex sensitivity is enhanced by temperature for a thermal interval between 15 and 30°C. Nevertheless, our data seem to indicate that further increases in temperature (above 30°C), instead of improving f_H baroreflex sensitivity, actually reduce it in our toads. A possible explanation for this may involve a thermal impairment of the tachycardic response to hypotension. This is indicated by a lower Q_{10} effect (1.5) for the maximum f_H response achieved for the highest dose of SNP. Baseline f_H was profoundly affected by temperature, shifting the operating point of the baroreflex upward (100% increase) with a Q_{10} effect of 2.0. Hence, in order to sustain f_H baroreflex sensitivity from 25 to 35°C, we expected that temperature would affect maximum and minimum f_H responses through the same Q_{10} effect as baseline f_H ; however, this was not the case for maximum f_H .

The ability to mount reflex f_H responses mainly to hypotension in anurans accounts for most of the f_H reflex responses due to changes in blood pressure (Hedrick et al., 2015; Zena et al., 2015) and can be strongly affected by the inability to further increase f_H when the animal has an already elevated baseline value. Such a situation can be encountered by the animal at very high temperatures (>35°C; Overgaard et al., 2012) or during enforced activity (Wahlqvist and Campbell, 1988); the latter is already known to reset the baroreflex to higher f_H and P_{MA} values in humans (Norton et al., 1999).

Overall it seems that anurans rely on a combination of mechanisms to maintain cardiovascular homeostasis. The baroreflex in anurans is clearly linked to the lymphatic system because lymph hearts are

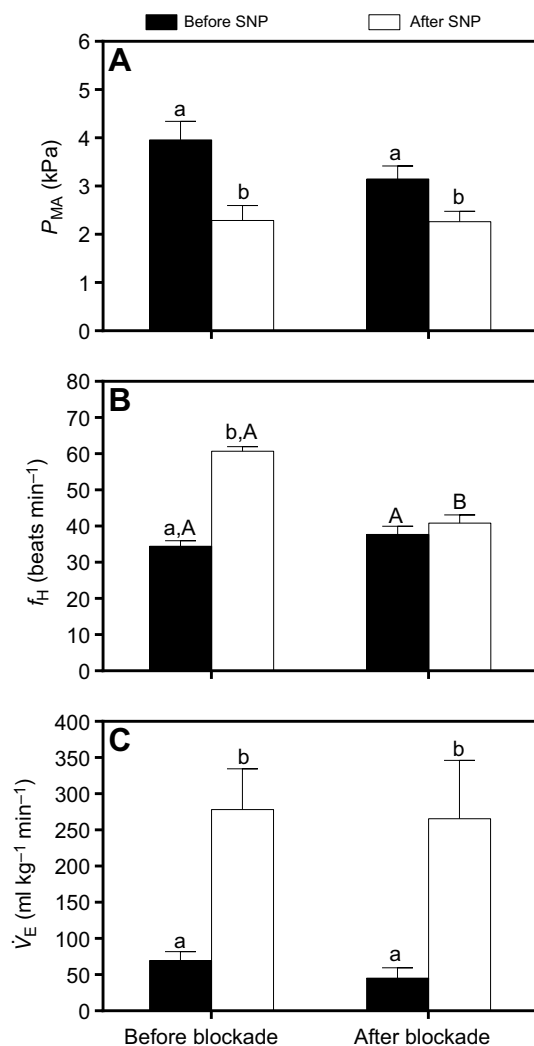


Fig. 7. Effect of SNP on P_{MA} , f_H and \dot{V}_E in *R. schneideri* before and after full autonomic blockade with atropine and sotalol. Changes in P_{MA} (A), f_H (B) and \dot{V}_E (C) induced by SNP ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) before (*N*=7) and after (*N*=5) full autonomic blockade with atropine (3.0 mg kg^{-1}) plus sotalol (3.0 mg kg^{-1}) at 25°C. Different lowercase letters indicate a significant effect of SNP injections; different uppercase letters indicate a significant effect of full autonomic blockade before or after SNP (two-way repeated measures ANOVA; *P*<0.05; Holm–Šidák's *post hoc* test).

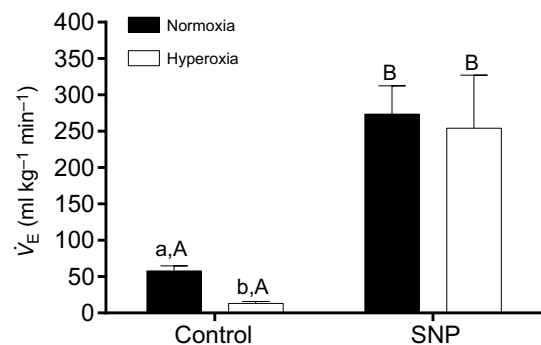


Fig. 8. Effect of SNP-induced hypotension on \dot{V}_E in *R. schneideri* under normoxia and hyperoxia. Different lowercase letters indicate a significant difference between normoxia and 30% hyperoxia; different uppercase letters indicate a significant difference between control and SNP injection within each gas condition (two-way repeated measures ANOVA; *P*<0.05; Holm–Šidák's *post hoc* test). Normoxia, *N*=10; hyperoxia, *N*=5.

under feedback control of arterial baroreceptors (Crossley and Hillman, 1999) and pulmonary ventilation works as an efficient effector for lymph mobilization (Hedrick et al., 2007). Based on our data, short-term imbalances in blood pressure are defended by mechanisms that involve reflex f_H adjustments along with changes in pulmonary ventilation (mainly breathing frequency) that may essentially arise from afferent integration of baroreceptors in the CNS, modulating respiratory areas, as proposed for mammals (McMullan and Pilowsky, 2010). Furthermore, high environmental temperatures decrease the f_H baroreflex by impairing maximum f_H response effectiveness (lower Q_{10}) when baseline f_H is already elevated, while the ventilatory component of this response is preserved. Although the loop between ventilation and lymph flow based on baroreflex regulation deserves further experimentation, our present findings in *R. schneideri* clearly provide a correlational link among the baroreflex, lung ventilation and the lymphatic system in anurans, in addition to providing evolutionary insights for better understanding of the links between blood pressure and ventilation in mammals. Among amphibians, however, whether the role of lung ventilation is a conserved feature contributing to blood pressure homeostasis is still unknown, as some lungless amphibians like salamanders (Hutchison, 2008) and the Bornean flat-headed frog, *Barbourula kalmantanensis* (Bickford et al., 2008), may rely on other effectors for vertical lymph movement (i.e. skeletal muscle contraction; Drewes et al., 2007), and thus blood pressure/volume regulation dependent on ventilation certainly does not exist.

Acknowledgements

We thank Dr Lynn Hartzler who kindly reviewed our manuscript for English grammar and Dr Brent Foy for his contributions to our statistical analysis of P_{MA} and ventilatory response relationships. We are grateful to Mr Wagner Bianchini for allowing us to access his aquatic plants farm for toad collection.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

L.A.Z. conceived, designed and performed the experiments, and analyzed the data; L.A.Z., G.S.F.d.S., L.H.G. and K.C.B. interpreted the data; L.A.Z., K.C.B., G.S.F.d.S. and L.H.G. wrote the manuscript.

Funding

The present study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–FAPESP [08/57712-4 (INCT/Fisiologia Comparada); 2012/17379-0; 2nd year PhD fellowship to L.A.Z.] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 1st year PhD fellowship to L.A.Z.). This study was part of the activities developed by L.A.Z. during his PhD at the Joint Graduate Program in Physiological Sciences (PIPGCF) from UFSCar/UNESP and was presented at the Experimental Biology meeting April 2016 (FAPESP-Brazil 2012/17379-0 and APS-USA).

References

- Altımiras, J., Franklin, C. E. and Axelsson, M. (1998). Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. *J. Exp. Biol.* **224**, 2235–2242.
- Baekey, D. M., Dick, T. E. and Paton, J. F. R. (2008). Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation. *Exp. Physiol.* **93**, 803–816.
- Baekey, D. M., Molkov, Y. I., Paton, J. F. R., Rybak, I. A. and Dick, T. E. (2010). Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: Insights into respiratory–sympathetic interactions. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **174**, 135–145.
- Baustian, M. (1988). The contribution of lymphatic pathways during recovery from hemorrhage in the toad *Bufo marinus*. *Physiol. Zool.* **61**, 555–563.
- Bianchi-da-Silva, L. M., Menescal-de-Oliveira, L. and Hoffmann, A. (2000). Baroreceptor control of heart rate in the awake toad: peripheral autonomic effectors and arterial baroreceptor areas. *J. Auton. Nerv. Syst.* **80**, 31–39.
- Bicego-Nahas, K. C., Gargaglioni, L. H. and Branco, L. G. S. (2001). Seasonal changes in the preferred body temperature, cardiovascular, and respiratory responses to hypoxia in the toad, *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Zool.* **289**, 359–365.

- Bickford, D., Iskandar, D. and Barlian, A. (2008). A lungless frog discovered on Borneo. *Curr. Biol.* **18**, R374–R375.
- Branco, L. G. and Glass, M. L. (1995). Ventilatory responses to carboxyhaemoglobinaemia and hypoxic hypoxia in *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Biol.* **198**, 1417–1421.
- Brunner, M. J., Sussman, M. S., Greene, A. S., Kallman, C. H. and Shoukas, A. A. (1982). Carotid sinus baroreceptor reflex control of respiration. *Circ. Res.* **51**, 624–636.
- Burggren, W. W., Christoffels, V. M., Crossley, D. A., Enok, S., Farrell, A., Hedrick, M. S., Hicks, J. W., Jensen, B., Moorman, A. F. M., Mueller, C. A. et al. (2013). Comparative cardiovascular physiology: future trends, opportunities and challenges. *Acta Physiol.* **197**, 257–276.
- Crossley, D. A., II and Hillman, S. S. (1999). The role of pulmocutaneous baroreceptors in the control of lymphatic heart rate in the toad *Bufo marinus*. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 109–115.
- Desai, P., Williams, A. G., Jr., Prajapati, P. and Downey, H. F. (2010). Lymph flow in instrumented dogs varies with exercise intensity. *Lymphat. Res. Biol.* **8**, 143–148.
- Drewes, R. C., Hedrick, M. S., Hillman, S. S. and Withers, P. C. (2007). Unique role of skeletal muscle contraction in vertical lymph movement in anurans. *J. Exp. Biol.* **210**, 3931–3939.
- Gargaglioni, L. H. and Branco, L. G. (2001). Effect of nitric oxide in the nucleus isthmi on the hypoxic and hypercarbic drive to breathing of toads. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R338–R345.
- Gargaglioni, L. H. and Branco, L. G. S. (2003). Role of glutamate in the nucleus isthmi on the hypoxia- and hypercarbia-induced hyperventilation of toads. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **135**, 47–58.
- Gentz, E. J. (2007). Medicine and surgery of amphibians. *ILAR J.* **48**, 255–259.
- Glass, M. L., Wood, S. C. and Johansen, K. (1978). The application of pneumotachography on small unrestrained animals. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **59**, 425–427.
- Glass, M. L., Fernandes, M. S., Soncini, R., Glass, H. and Wasser, J. S. (1997). Effects of dry season dormancy on oxygen uptake, heart rate, and blood pressures in the toad, *Bufo paracnemis*. *J. Exp. Zool.* **279**, 330–336.
- Guerra, A. R. G., Gargaglioni, L. H., Noronha-De-Souza, C. R., Abe, A. S., Branco, L. G. S. and Bicego, K. C. (2008). Role of central nitric oxide in behavioral thermoregulation of toads during hypoxia. *Physiol. Behav.* **95**, 101–107.
- Hedrick, M. S., Palioca, W. B. and Hillman, S. S. (1999). Effects of temperature and physical activity on blood flow shunts and intracardiac mixing in the toad *Bufo marinus*. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 509–519.
- Hedrick, M. S., Drewes, R. C., Hillman, S. S. and Withers, P. C. (2007). Lung ventilation contributes to vertical lymph movement in anurans. *J. Exp. Biol.* **210**, 3940–3945.
- Hedrick, M. S., Hillman, S. S., Drewes, R. C. and Withers, P. C. (2013). Lymphatic regulation in nonmammalian vertebrates. *J. Appl. Physiol.* **115**, 297–308.
- Hedrick, M. S., McNew, K. A. and Crossley, D. A. (2015). Baroreflex function in anurans from different environments. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **179**, 144–148.
- Hillman, S. S., Withers, P. C., Drewes, R. C. and Hillyard, S. D. (2009). *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. Oxford: Oxford University Press.
- Hillman, S. S., Hedrick, M. S., Drewes, R. C. and Withers, P. C. (2010). Lymph flux rates from various lymph sacs in the cane toad *Rhinella marina*: an experimental evaluation of the roles of compliance, skeletal muscles and the lungs in the movement of lymph. *J. Exp. Biol.* **213**, 3161–3166.
- Hutchison, V. H. (2008). Amphibians: lungs' lift lost. *Curr. Biol.* **18**, R392–R393.
- Jared, C., Antoniazzi, M. M., Jordão, A. E. C., Silva, J. R. M. C., Greven, H. and Rodrigues, M. T. (2009). Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. *Toxicon* **54**, 197–207.
- Lowey, A. D. and Spyer, K. M. (1990). *Central Regulation of Autonomic Functions*. New York, NY: Oxford University Press.
- McMullan, S. and Pilowsky, P. M. (2010). The effects of baroreceptor stimulation on central respiratory drive: a review. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **174**, 37–42.
- Moreira, L. a., Fenolio, D. B., Silva, H. L. R. and Silva, N. J. Jr. (2009). A preliminary list of the herpetofauna from termite mounds of the cerrado in the upper Tocantins river valley. *Pap. Avulsos Zool.* **49**, 183–189.
- Noronha-de-Souza, C. R., Bovo, R. P., Gargaglioni, L. H., Andrade, D. V. and Bicego, K. C. (2015). Thermal biology of the toad *Rhinella schneideri* in a semiarid environment in southeastern Brazil. *Temperature* **2**, 554–562.
- Norton, K. H., Boushel, R., Strange, S., Saltin, B. and Raven, P. B. (1999). Resetting of the carotid arterial baroreflex during dynamic exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* **87**, 332–338.
- Overgaard, J., Andersen, J. L., Findsen, A., Pedersen, P. B. M., Hansen, K., Ozolina, K. and Wang, T. (2012). Aerobic scope and cardiovascular oxygen transport is not compromised at high temperatures in the toad *Rhinella marina*. *J. Exp. Biol.* **215**, 3519–3526.
- Reid, I. A. (1996). Angiotensin II and baroreflex control of heart rate. *News Physiol. Sci.* **11**, 270–274.
- Reyes, C., Fong, A. Y., Brink, D. L. and Milsom, W. K. (2014). Distribution and innervation of putative arterial chemoreceptors in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J. Comp. Neurol.* **522**, 3754–3774.

- Sandblom, E. and Axelsson, M.** (2005). Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. *J. Exp. Biol.* **208**, 821-829.
- Smith, S. A.** (2007). Compendium of drugs and compounds used in amphibians. *ILAR J.* **48**, 297-300.
- Stewart, J. M., Rivera, E., Clarke, D. A., Baugham, I. L., Ocon, A. J., Taneja, I., Terilli, C. and Medow, M. S.** (2011). Ventilatory baroreflex sensitivity in humans is not modulated by chemoreflex activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H1492-H1500.
- Van Vliet, B. N. and West, N. H.** (1986). Cardiovascular responses to electrical stimulation of the recurrent laryngeal nerve in conscious toads. *J. Comp. Physiol. B* **156**, 363-375.
- Van Vliet, B. N. and West, N. H.** (1992). Functional characteristics of arterial chemoreceptors in an amphibian (*Bufo marinus*). *Respir. Physiol.* **88**, 113-127.
- Wahlqvist, B. Y. I. and Campbell, G.** (1988). Autonomic influences on heart rate and blood pressure in the toad, *Bufo marinus*, at rest and during exercise. *J. Exp. Biol.* **134**, 377-396.
- Walker, J. K. L. and Jennings, D. B.** (1998). Respiratory effects of pressor and depressor agents in conscious rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**, 707-714.
- Wang, T., Branco, L. G. and Glass, M. L.** (1994). Ventilatory responses to hypoxia in the toad *Bufo paracnemis* before and after a decrease in haemoglobin oxygen-carrying capacity. *J. Exp. Biol.* **186**, 1-8.
- Yamane, M.** (1990). The arterial baroreceptor-lymph heart inhibitory reflex and its pathway in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Kawasaki Med. J.* **16**, 93-100.
- Zena, L. A., Gargaglioni, L. H. and Bicego, K. C.** (2015). Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **179**, 81-88.
- Zena, L. A., Dantonio, V., Gargaglioni, L. H., Andrade, D. V., Abe, A. S. and Bicego, K. C.** (2016). Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. *J. Exp. Biol.* **219**, 725-733.
- Zwemer, R. and Foglia, V.** (1943). Fatal loss of plasma volume after lymph heart destruction in toads. *Exp. Biol. Med.* **53**, 14-17.