

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR-UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE**  
**JABOTICABAL - UNESP**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO ENCEFÁLICO NO CONTROLE**  
**CARDIOVASCULAR DE RÃ-TOURO, *Lithobates catesbeianus***

Lucas Aparecido Zena

Jaboticabal  
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR-UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE**  
**JABOTICABAL - UNESP**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO ENCEFÁLICO NO CONTROLE**  
**CARDIOVASCULAR DE RÃ-TOURO, *Lithobathes catesbeianus***

Lucas Aparecido Zena

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.

*Orientação: Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego*  
Agências Financiadoras: CAPES, FAPESP e CNPq

Jaboticabal  
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

Z54po

Zena, Lucas Aparecido.

Participação do óxido nítrico encefálico no controle cardiovascular de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* / Lucas Aparecido Zena. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Anfíbio. 2. Óxido nítrico. 3. Sistema cardiovascular. 4. Pressão arterial. 5. Frequência cardíaca. 6. Condutância vascular cutânea. I. Título.

CDD: 597.6 (20ª)

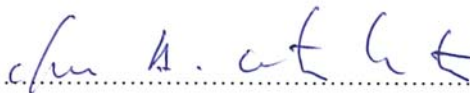
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Lucas Aparecido Zena

Dia 26/04/2012

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kênia Cardoso Bicego..... 

Prof. Dr. Cléo Alcântara Costa Leite..... 

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco..... 

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego, por não desistir de me dar a oportunidade de entrar no mundo científico. Agradeço por todos os ensinamentos conferidos ao longo desses dois anos, cercados de muita paciência e cuidados em momentos críticos do ritmo científico. Agradeço imensamente pela amizade, confiança e oportunidades das quais eu nunca poderia ter conhecido se não fosse pela sua dedicação à carreira científica.

À Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão por estar presente em vários momentos do desenvolvimento desse trabalho, desde as primeiras ideias, execução e conclusões.

Ao Euclides e à Aretuza pela amizade e ensinamentos. Agradeço pelos primeiros passos do desenvolvimento prático deste trabalho.

Aos meus queridos e amados amigos, Eliane, Alessandra, Jonas, Felipe, Lopes, Rafael, Marco Antônio, Silvia Helena, Gilda Maria, Toninho Lima, Miriam e Miguel Mora. Aos companheiros da 2º Turma de Ciências Biológicas da UNESP-Jaboticabal. Aos amigos do Laboratório de Fisiologia, Vivian, Elisa, Valter, Luis Gustavo, Luana, Débora, Danúzia. Agradecimento especial à Camila Linhares pela companhia desde o início do metrado e à Carolina S. Scarpellini por me acolher em sua casa sempre que necessário; além de seu olhar crítico para com as ideias que surgiram ao longo da prática experimental.

Aos meus pais, Maria do Carmo Matos e Miguel Zena pelo apoio e incentivo nesta escolha diferenciada em minha carreira, mesmo assim colaborando direta ou indiretamente para o crescimento deste trabalho. A minha amada mãe, Maria Rosa, por me acolher em sua casa não só como um sobrinho e afilhado, mas sim como seu próprio filho.

Aos meus antigos companheiros de trabalho da escola municipal EMEF "Profa. Marilena A. Meneghini" CAIC por me incentivarem a seguir a carreira acadêmica. E aos meus alunos com quem tanto aprendi durante os três anos como professor de Ciências.

Aos anfíbios, animais amplamente distribuídos no planeta Terra, cuja importância ecológica está ameaçada direta ou indiretamente por ações antrópicas. Sua importância científica em estudos de fisiologia é confirmada por 7 prêmios Nobel já conferidos a pesquisadores que tinham os anfíbios como modelo experimental em suas pesquisas científicas.

Ao Prof. Dane Crossley da Universidade do Norte do Texas e à Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula da Universidade Estadual Paulista pelas sugestões no enriquecimento do protocolo experimental. À Dra. Lacy Alexander Holowatz pela ajuda nos cálculos de condutância vascular cutânea do presente trabalho.

Ao Alexandre e à Mara da secretaria do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UFSCar-UNESP) pela dedicação e atenção no trabalho desempenhado junto aos discentes vinculados ao programa.

A todos os professores do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UFSCar-UNESP) por fazerem parte da minha formação acadêmica e por contribuírem direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fisiologia Comparada (INCT) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar se o óxido nítrico (NO) atuando no SNC de rãs apresenta tônus inibitório sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) reduzindo a atividade simpática dependente de receptores  $\alpha$  e/ou  $\beta$  adrenérgicos durante o inverno e a primavera/verão. Desta forma, a temperatura corporal e a PAM foram mensuradas por meio de um transmissor de telemetria implantado na cavidade abdominal de rãs-touro, e o cateter do transmissor foi inserido no arco aórtico esquerdo para as medidas de pressão arterial e FC. Adicionalmente, o fluxo de células sanguíneas foi avaliado por meio de um sensor a laser Doppler suturado à pele da região pélvica ventral do animal para as medidas de condutância vascular cutânea (CVC). Uma cânula foi implantada no ventrículo lateral para injeções de L-NMMA (inibidor não seletivo da NOS) ou líquido artificial (veículo) e uma cânula de polietileno PE50 foi inserida na veia femoral para injeções *in bolus* de antagonistas adrenérgicos, prazosin ( $\alpha_1$ ) e sotalol ( $\beta$ ), e agonistas, fenilefrina ( $\alpha_1$ ) e isoproterenol ( $\beta$ ) ou solução Ringer. Os animais foram mantidos a 25 °C durante todos os experimentos. A PAM, mas não a FC, foi maior no inverno em relação à primavera/verão. A CVC da região pélvica ventral foi maior no inverno em relação à primavera/verão. O L-NMMA aumentou a PAM e diminuiu a CVC, mas não alterou a FC, durante ambas as estações. O pré-tratamento com prazosin atenuou e o sotalol acentuou o efeito pressor do L-NMMA em ambas as estações. Podemos concluir que o NO parece atuar no encéfalo de rãs como um agente hipotensor via, em parte, inibição da atividade simpática dependente de receptores alfa vasoconstritores e beta adrenérgicos vasodilatadores.

**Palavras-chave:** anfíbios, *Lithobates catesbeianus*, sazonalidade, óxido nítrico, sistema cardiovascular, pressão arterial, frequências cardíaca, condutância vascular cutânea.

## ABSTRACT

The goal of the present study was to determine if nitric oxide (NO) acting on brain of frogs presents an inhibitory tonus on mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) by reducing the sympathetic activity dependent on  $\alpha$  and/or  $\beta$  adrenergic receptors during winter and spring/summer seasons. Thus, body temperature and MAP was measured by a telemetry device implanted into the abdominal cavity of American bullfrogs, with the catheter of the device inserted into the left aortic arch for AP and HR measurements. Additionally, blood cell flux was measured using a laser Doppler flowmeter sutured to the pelvic skin to calculate cutaneous vascular conductance (CVC). A guide cannula was implanted into brain lateral ventricle for injections of L-NMMA (non selective NO synthase inhibitor) or mCSF (mock cerebrospinal fluid, vehicle) and a PE cannula was inserted in the femoral vein for bolus injections of adrenergic antagonists, prazosin ( $\alpha_1$ ) and sotalol ( $\beta$ ), and agonists, phenylephrine ( $\alpha_1$ ) and isoproterenol ( $\beta$ ) or Ringer solution. Animals were maintained at 25 °C during all the experiments. Mean AP, but not HR, was greater during winter than spring/summer. L-NMMA increased MAP, but did not change HR, during both seasons. The pre-treatment with prazosin attenuated and sotalol accentuated the hypertensive effect of L-NMMA in both seasons. We conclude that NO seems to act on the brain of frogs as a hypotensive agent via, at least in part, the inhibition of the sympathetic activity dependent on  $\alpha$ , and  $\beta$ , adrenergic receptors.

**Keywords:** amphibians, *Lithobates catesbeianus*, seasonality, nitric oxide, cardiovascular system, blood pressure, heart rate, cutaneous vascular conductance.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

7-NI: 7- Nitroindazole  
ACh: Acetilcolina  
ANG II: Angiotensina II  
ANS: Atividade Nervosa Simpática  
ATP: Adenosina trifosfato  
AVP: Arginina vasopressina  
AVT: Arginina vasotocina  
CaCl<sub>2</sub>: Cloreto de cálcio  
CO<sub>2</sub>: Gás carbônico  
CVC: Condutância Cardiovascular Cutânea  
EDRF: Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio  
eNOS: Óxido Nítrico Sintase, isoforma endotelial  
FC: Frequência Cardíaca  
Gi: Proteína G inibitória  
GMPC:  
Hex: Hexametônio  
Icv: Intracerebroventricular  
Iv: Intravenoso  
KCl: Cloreto de potássio  
L-NAME: N (G)-nitro-L- arginina metil éster  
L-NMMA: N-monometil-L-arginina  
L-NNA: Nitro-arginina  
mCSF: Líquor artificial  
MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnésio  
MS-222: Ácido etil éster 3-aminobenzóico  
NaCl: Cloreto de sódio  
NADPH-d: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Diaforase  
NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sódio  
NO: Óxido Nítrico  
NOS: Óxido Nítrico Sintase  
NOSe: Óxido Nítrico Sintase endotelial  
NOSi: Óxido Nítrico Sintase induzível  
NOSn: Óxido Nítrico Sintase neuronal  
NTS: Núcleo do Trato Solitário  
O<sub>2</sub>: Gás oxigênio  
PaCO<sub>2</sub>: Pressão Parcial de CO<sub>2</sub> arterial  
PAM: Pressão Arterial Média  
PAP: Pressão arterial pulsátil  
PD: Pressão diastólica  
Praz: Prazosin  
PS: Pressão sistólica  
PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo  
Ring: Ringer  
RNAm: RNA mensageiro  
RVLM: Bulbo Ventrolateral Rostral  
Sc: Subcutâneo  
SFO: Órgão subfornical

SNC: Sistema Nervoso Central

Sot: Sotalol

Tc: Temperatura corporal

Tmax: Temperatura máxima

Tmed: Temperatura média

Tmin: Temperatura mínima

UP: Unidades de Perfusão

UR: Umidade relativa

VLM: Bulbo Ventrolateral

## Lista de Símbolos

$\alpha$ : alfa  
 $\beta$ : beta  
 $\Delta$ : delta

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	Ação Vascular do NO	13
1.2	NO no Sistema Nervoso Central	15
1.3	Regulação Simpática do Sistema Cardiovascular	17
1.4	Sistema Cardiovascular de Anfíbios	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1	Animais	23
3.2	Fármacos	24
3.3	Anestesia e procedimentos cirúrgicos	25
3.4	Microinjeção	29
3.5	Medidas da temperatura corporal ( $T_c$ ), pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)	29
3.6	Medidas do fluxo sanguíneo cutâneo e cálculo da condutância vascular cutânea (CVC)	30
3.7	Protocolos experimentais	31
3.7.1	Efeito da injeção intracerebroventricular (icv) de L-NMMA sobre a PA, a FC e o fluxo sanguíneo cutâneo e participação dos receptores $\alpha$ e $\beta$ adrenérgicos periféricos em rãs-touro durante primavera/verão	31
3.7.2	Efeito da injeção icv de L-NMMA sobre a PA, a FC e o fluxo sanguíneo cutâneo e participação dos receptores $\alpha$ e $\beta$ adrenérgicos periféricos em rãs-touro durante o inverno	33
3.8	Análise estatística dos resultados	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
4.1	Valores hemodinâmicos de repouso	35
4.2	Efeito do bloqueio da síntese de NO encefálico associado ou não com o antagonismo periférico de receptores adrenérgicos $\alpha$ ou $\beta$ nas funções cardiovasculares de rãs-touro durante primavera/verão e inverno	35
<b>5</b>	<b>DISCUSÃO</b>	<b>45</b>
5.1	Efeito do bloqueio encefálico da NOS sobre o sistema cardiovascular de rãs-touro	45
5.2	Efeito do bloqueio encefálico da NOS associado com o antagonismo periférico de adreno-receptores $\alpha_1$ sobre o sistema cardiovascular de rãs-touro	47
5.3	Efeito do bloqueio encefálico da NOS associado com o bloqueio periférico de adreno-receptores $\beta$ sobre o sistema cardiovascular de rãs-touro	51
5.4	Variação sazonal das variáveis cardiovasculares de rã-touro	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	55

# 1 INTRODUÇÃO

O Óxido Nítrico (NO) é um gás produzido endogenamente envolvido em uma diversidade de funções biológicas, dentre elas mecanismos de defesa macrofágica, comunicação intercelular, termorregulação, controle da pressão arterial (DAWSON e SNYDER, 1994; GARTHWAITE e BOULTON, 1995; STEINER e BRANCO, 2001), além de modulação de atividades rítmicas em diversos organismos, tanto vertebrados como invertebrados. Também está envolvido na mediação de *inputs* excitatórios para o gerador do padrão central de controle da respiração em rã touro e na modulação da locomoção em larvas de *Xenopus laevis* e em algumas espécies de moluscos (Revisado por NEWCOMB e WATSON, 2002).

O NO é produzido a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO pela ação da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS). Essa enzima pode ser encontrada como três possíveis isofomas, NOS neuronal (NOS<sub>n</sub>) e endotelial (NOS<sub>e</sub>), que são produzidas constitutivamente e a NOS induzível (NOS<sub>i</sub>), todas ricamente distribuídas por todo o corpo (MONCADA *et al.*, 1991; DAWSON e SNYDER, 1994). A atividade da enzima NOS depende de alguns cofatores, dentre eles o NADPH e proteínas ligantes de cálcio (complexo cálcio/calmodulina) (BREDT e SNYDER, 1990).

O NO exerce muitos dos seus efeitos biológicos por ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e conseqüentemente induz aumento das concentrações intracelulares de GMP cíclico (GMP<sub>c</sub>) (RAPOPORT *et al.*, 1983; TRAYSTMAN *et al.*, 1995; MURAD, 1999). O GMP<sub>c</sub> ativa uma serina/tirosina quinase chamada proteína quinase G em vários tecidos, incluindo a musculatura vascular e o sistema nervoso central (SNC), sendo assim, o NO é um importante mediador da sinalização intracelular nesses e em outros tecidos do corpo (MONCADA *et al.*, 1991; DAWSON e SNYDER, 1994; MURAD, 1999).

## 1.1 Ação Vascular do NO

O NO foi identificado, em 1980, como um fator de relaxamento derivado do endotélio em coelhos (FURCHGOTT, 1999). Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que o

relaxamento da aorta de coelho pela acetilcolina (ACh) requer a presença do endotélio intacto, e que a ACh estimula a liberação de uma substância que foi inicialmente denominada Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF, sigla em inglês), mas apenas em 1987 descobriu-se que o NO é um EDRF (IGNARRO, *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987). A partir desse momento, o NO emergiu como uma das mais importantes moléculas sinalizadoras em sistemas de integração do controle biológico.

Em mamíferos, o NO exerce função crucial na regulação do tônus vascular (FURCHGOTT e ZAWADSKI, 1980; PALMER *et al.*, 1987; cf MONCADA *et al.*, 1991; CAI e HARRISON, 2000) por meio da sua contínua liberação do endotélio vascular. Além disso, em muitos casos, a ação vasodilatadora de várias substâncias vasoativas, incluindo acetilcolina, bradicinina e substância P, são mediadas pela liberação de NO (MONCADA *et al.*, 1991).

Assim como em mamíferos, existem evidências de uma regulação tônica vascular pelo NO em outros grupos vertebrados. Estudos em aves (HASEGAWA e NISHIMURA, 1991; MARTINEZ-LEMUS *et al.*, 1999; WIDEMAN *et al.*, 2004), répteis – serpentes (pítons e cascavéis), lagartos varanídeos e teiús (SKOVGAARD *et al.*, 2005), crocodilianos (AXELSSON, *et al.*, 2001) e também anfíbios (RUMBAUT, *et al.*, 1995; KNIGHT e BURNSTOCK, 1996; HOFFMAN; ROMERO, 2000) mostram evidências do NO como fator de relaxamento vascular. Em relação aos peixes, um número considerável de estudos mostra que em teleósteos o NO é capaz de mediar vasodilatação da musculatura lisa dos vasos sanguíneos (SMALL e FARRELL, 1990; MUSTAFA e AGNISOLA, 1998; FRITSCHÉ, *et al.*, 2000; FENG, *et al.*, 2007), no entanto, efeito vasoconstritor do NO foi relatado para a circulação branquial de uma espécie de enguia, *Anguilla anguilla* (PELLEGRINO, *et al.*, 2002).

Adicionalmente, o mecanismo de sinalização do NO no controle do tônus vascular em alguns vertebrados é controverso. Os dados existentes eram conflitantes a respeito de sua origem, endotelial ou de nervos nitrérgicos. Estudos em várias espécies de anfíbios mostraram diminuição do fluxo sanguíneo após inibição da NOS, indicando um controle tônico da circulação que foi atribuído ao sistema NO endotelial (RUMBAUT *et al.*, 1995; KNIGHT e BURNSTOCK, 1996; REA, *et al.*, 2002; REA e PARSONS, 2001). Em contrapartida, estudos mais recentes mostraram que a regulação via NO é independente do endotélio, ocorrendo via nervos nitrérgicos responsáveis pela vasodilatação de algumas artérias e veias, como aorta central, veias de grande calibre (veia abdominal e veia cava), artérias pulmonar e cutânea em sapos da espécie *Rhinella marina* (anteriormente *Bufo marinus*) (BROUGHTON

e DONALD, 2002; 2005; DONALD e BROUGHTON, 2005; JENNINGS e DONALD, 2008), além da presença da NOS em nervos perivasculares existentes em vasos de resistência, como as artérias mesentéricas (JENNINGS e DONALD, 2010). Além disso, a expressão do DNA complementar da NOSe da rã *Xenopus tropicalis* foi maior nos pulmões e no músculo esquelético e não houve expressão da mesma no endotélio vascular, corroborando o fato que a NOSe ou o NO derivado do endotélio não apresentam função na regulação vascular de anfíbios (TRAJANOVSKA e DONALD, 2011).

O papel do NO na regulação vascular de vertebrados basais ainda é assunto de grande discussão, pois a presença da NOSe não foi confirmada em vasos sanguíneos de forma inequívoca em peixes e anfíbios. Sendo assim, a partir dos dados disponíveis até o momento, a provável sinalização vascular pelo NO pode ter evoluído em peixes e anfíbios neuronalmente e a sinalização a partir do endotélio apareceu pela primeira vez nos amniotas (JENNINGS e DONALD, 2008).

Similar aos mamíferos, existem evidências da atuação do NO periféricamente como uma molécula vasodilatadora em anfíbios (HOFFMANN e ROMERO, 2000). Além disso, nestes animais o NO tem função em muitos processos fisiológicos, dentre elas o controle da resistência vascular (KNIGHT e BURNSTOCK, 1996; REA e PARSONS, 2001; BROUGHTON e DONALD, 2002), tal como a permeabilidade microvascular (NGUYEN *et al.*, 1995; RUMBAUT e HUXLEY, 2002) e a captação de água pela pele (REA e PARSONS, 2001; REA *et al.*, 2002).

## 1.2 NO no Sistema Nervoso Central

Em 1988, o NO foi reconhecido como uma molécula mensageira no SNC, quando este foi identificado como um fator intracelular instável (GARTHWAITE, *et al.*, 1988). A presença de uma enzima formadora de NO encefálico foi posteriormente confirmada, no ano de 1989, subsequentemente purificada e seu DNA complementar clonado e sequenciado (KNOWLES, *et al.*, 1989; BREDT e SNYDER, 1990, BREDT, *et al.*, 1991).

Além do efeito periférico vasodilatador do NO, existem evidências sugerindo sua atuação sobre alguns núcleos centrais associados à regulação simpática em mamíferos (VINCENT e KIMURA, 1992; OHTA *et al.*, 1993; DUN *et al.*, 1994; MIYAGAWA *et al.*, 1994). A estimulação da produção de NO encefálico, por meio de injeção

intracerebroventricular (icv) de cloreto de cálcio, ou mesmo de L-arginina causa redução da pressão arterial média (PAM) e da atividade simpática do nervo abdominal (ANS), uma resposta dependente do aumento da concentração de GMPc (CABRERA; BOHR, 1995). Além disso, microinjeção icv de L-NAME, inibidor não seletivo das isoformas de NOS, em coelhos causa aumento da PAM, da atividade simpática renal e da concentração plasmática de catecolaminas, com queda na frequência cardíaca (FC) (MATSUMURA *et al.*, 1998). No entanto, microinfusão icv de L-NMMA, outro inibidor não seletivo da NOS, causa aumento da PAM, da FC e da atividade simpática abdominal em ratos Wistars (NISHIMURA, *et al.*, 1997). De modo geral, considerando os efeitos dos inibidores de produção de NO sobre a PAM e a FC, os dados em mamíferos são concordantes em relação à ação pressora de tais agentes, mas há trabalhos divergentes mostrando tanto taquicardia quanto bradicardia (revisado por KRUKOFF, 1999). Tais diferenças podem estar relacionadas ao tipo e à dose do inibidor de NOS utilizado, além do sítio de atuação do NO sobre o SNC (KRUKOFF, 1999). Em mamíferos, existe uma grande quantidade de neurônios que produzem NO dentro dos núcleos paraventriculares (PVN) e supraótico (SO) (MIZUKAWA *et al.*, 1989; YANG *et al.*, 1999), regiões diencefálicas importantes relacionadas à regulação cardiovascular. No bulbo, neurônios que produzem NO são encontrados no núcleo do trato solitário (NTS) e em várias subdivisões do bulbo ventrolateral (VLM). Já na medula espinhal, neurônios nitrérgicos são encontrados na coluna intermediolateral, fazendo parte dos neurônios pré-ganglionares simpáticos (VINCENT e KIMURA, 1992; IADECOLA *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001)

Além disso, o PVN recebe projeções neuronais do NTS e influenciam direta e indiretamente as eferências simpáticas, (SWANSON e SAWCHENKO, 1983). Sabe-se que os neurônios parvocelulares do PVN afetam a atividade nervosa simpática por meio de duas vias: (1) diretamente sobre os neurônios pré-motores simpáticos do Bulbo Ventrolateral Rostral (RVLM) que, por sua vez, fazem sinapses com os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral; (2) ou por meio de sinapses diretas na coluna intermediolateral, modulando a excitabilidade dos neurônios pré-ganglionares simpáticos (HOSOYA, *et al.*, 1991; RANSON, *et al.*, 1998; STOCKER, *et al.*, 2004).

Em relação aos anfíbios, estudos anteriores verificaram ampla distribuição de células nitrérgicas no encéfalo de anuros (BRÜNING e MAYER, 1996; HUYNH e BOYD, 2007). Existem neurônios produtores de NO em regiões hipotalâmicas e bulbares, incluindo o NTS, de algumas espécies (BRÜNING e MAYER, 1996; MUÑOZ *et al.*, 1996; LÁZÁR e LOSONCZY, 1999), incluindo a rã touro (HUYNH e BOYD, 2007), animal experimental do

presente trabalho. Dados de nosso laboratório e de outros pesquisadores indicam que o NO no SNC de sapos e rãs está envolvido na redução da temperatura corporal de preferência durante exposição à hipóxia (reduzida pressão parcial de O<sub>2</sub>; GUERRA *et al.*, 2008) e no controle da ventilação pulmonar (HEDRICK *et al.*, 1998; GARGAGLIONI e BRANCO, 2001). Entretanto, não existem informações na literatura sobre o papel do NO encefálico no controle cardiovascular de tais animais.

### 1.3 Regulação Simpática do Sistema Cardiovascular

O sistema nervoso simpático regula as funções cardiovasculares atuando no coração, no tecido cromafin e nos vasos sanguíneos por meio de todos os nervos simpáticos do corpo disponibilizando catecolaminas aos tecidos alvos.

A regulação da FC parece ser essencialmente similar em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes teleósteos. Com exceção dos ciclóstomos e elasmobrânquios, todos esses grupos apresentam uma inervação cardioexcitatória  $\beta$ -adrenérgica proporcionada via inervação simpática (TAYLOR, *et. al.*, 1999).

Os três subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos são encontrados no coração de mamíferos, sendo que a ativação de  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 induz efeitos cronotrópico e inotrópico positivos enquanto que a ativação do  $\beta$ 3 promove efeitos opostos (Revisado por ROZEC e GAUTHIER, 2006). Existem diferenças funcionais entre receptores  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 como os segundos mensageiros ativados por cada um e a ocorrência de endocitose ( $\beta$ 2) ou não ( $\beta$ 1), além da ativação de  $\beta$ 2 levar a uma resposta bifásica de estimulação seguida por inibição do coração (XIANG *et al.*, 2002). Estas distinções entre tais receptores podem estar relacionadas às diferenças na sua sinalização em resposta à liberação de catecolaminas das varicosidades dos nervos simpáticos (primariamente noradrenalina) e da liberação das catecolaminas da glândula adrenal (primariamente adrenalina) disponibilizadas na circulação (SHCHERBAKOVA, *et al.*, 2007). De fato, nos mamíferos, a noradrenalina atua preferencialmente nos receptores  $\beta$ 1 dos miócitos cardíacos enquanto que a adrenalina apresenta maior seletividade pelos receptores do tipo  $\beta$ 2 localizados principalmente nos vasos sanguíneos (STENE-LARSEN, 1981). Em relação aos efeitos cronotrópico e inotrópico negativos dos adrenorreceptores  $\beta$ 3 na musculatura cardíaca ventricular de mamíferos, acredita-se que tais receptores sejam importantes em condições como em uma parada

cardíaca, por exemplo, em que sua ativação pode resultar em proteção contra efeitos deletérios de uma super estimulação catecolaminérgica (AUDIGANE, *et al.*, 2009; revisado por GAUTHIER, *et al.*, 2011)

Nos vasos sanguíneos de mamíferos, ambos os subtipos de adrenoceptores  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  estão presentes nas terminações pós sinápticas onde medeiam respostas vasoconstrictoras, embora o adrenoceptor  $\alpha 1$  seja predominante na musculatura lisa do vaso e também o subtipo com maior influencia da noradrenalina das varicosidades simpáticas (LANGER e HICKS, 1984). O inotropismo positivo cardíaco é primariamente decorrente da estimulação dos adrenoceptores  $\beta 1$ , no entanto, a musculatura cardíaca de camundongos apresenta receptores  $\alpha 1$  adrenérgicos capazes de reduzir o efeito inotrópico positivo mediado pelos receptores beta adrenérgicos; ou seja, um efeito envolvido na proteção da musculatura cardíaca contra lesões isquêmicas (RORABAUGH, *et al.*, 2005)

Especificamente em relação ao controle autonômico simpático das variáveis cardiovasculares de anfíbios, estudos com as rãs *Rana pipens* e *Lithobates catesbeianus* (rã touro), demonstram que as fibras simpáticas se estendem desde o segundo até o décimo nervo vertebral, sendo o nervo simpato-vagal o grande percurso para as fibras vagais e simpáticas pós-ganglionares que inervam o coração (GIBBINS, 1994). Todos os neurônios pós-ganglionares da cadeia simpática sintetizam adrenalina, sendo este o mais importante neurotransmissor de efeitos cronotrópico e inotrópico positivos em anfíbios. Já a noradrenalina é a principal catecolamina liberada pelo tecido cromafin (análogo à medula da adrenal de mamíferos) na circulação (AZUMA, *et al.*, 1965, STENE-LARSEN, 1981), apesar de em algumas espécies o neuropeptídeo Y e o ATP atuarem conjuntamente à adrenalina (HOYLE, *et al.*, 1986; BRAMICH, *et al.*, 1990, STOFER, *et al.*, 1990).

Em *Lithobates catesbeianus* foi demonstrada a presença majoritária de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos átrios e no ventrículo, sendo encontrada uma menor quantidade de receptores  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  nesses locais (HERMAN *et al.*, 1996). Herman e colaboradores (1996) verificaram no átrio e ventrículo de rãs uma única população de adrenoceptores  $\beta$ , presumivelmente do subtipo  $\beta 2$ , já que o uso de um bloqueador seletivo para receptores  $\beta 1$ , o metropolol, apresentou baixa afinidade (HERMAN, *et al.*, 1996). Recentemente, verificou-se a presença de adrenoceptores do tipo  $\beta 3$  no coração de rãs, cuja ativação resulta em um efeito inotrópico negativo, assim como em mamíferos (MAZZA, *et al.*, 2010). Os adrenoceptores cardíacos do tipo  $\beta 2$  de anfíbios são mais seletivos para a adrenalina (de origem neural) enquanto que os  $\beta 1$  são ativados pela noradrenalina (de origem humoral), tendo ambas efeitos cronotrópico e inotrópico positivos (STANE-LARSEN, 1981). Nenhuma

diferenciação significativa foi encontrada quanto ao número de adrenorreceptores  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\beta$  nos tecidos (coração, rins e SNC) de animais aclimatados a temperaturas mais altas ou mais baixas, refutando pressuposições mais antigas da teoria da transformação dos receptores do tipo  $\beta$  em altas temperaturas e do tipo  $\alpha$  em baixas temperaturas (HERMAN *et al.*, 1996). Pela estimulação com adrenalina de preparações de coração de anfíbio perfundido, Lazou e colaboradores (2002) confirmaram a presença funcional de adrenorreceptores  $\alpha 1$  acoplados à hidrólise do fosfoinositol e à produção de inositol fosfato.

Quanto à atuação adrenérgica sobre os vasos sanguíneos de anuros há evidências de que ambos os receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos estão presentes nos vasos sanguíneos cutâneos, sendo que os receptores  $\alpha$  regulam respostas constritoras via estimulação de nervos simpáticos e administração de adrenalina, sendo capazes de induzir alterações na pressão arterial (HERMAN; SANDOVAL, 1982; MALVIN; RIEDEL, 1990).

#### 1.4 Sistema Cardiovascular de Anfíbios

Anfíbios apresentam coração com quatro câmaras cardíacas, um seio venoso drena o sangue exclusivamente para o átrio direito, e um ventrículo único que recebe sangue pouco oxigenado da circulação sistêmica através do átrio direito e sangue pulmonar rico em oxigênio vindo do átrio esquerdo (WANG, *et al.*, 1999). Em função da anatomia cardíaca desses animais pode ocorrer mistura entre os sangues sistêmico e pulmonar dentro do ventrículo e do *conus arteriosus*, sendo que o sangue venoso sistêmico pode readentrar a circulação sistêmica (*shunt* da direita para a esquerda), enquanto o sangue arterial pulmonar pode readentrar a circulação pulmonar (*shunt* da esquerda para a direita) (WANG, *et al.*, 1999).

Os anfíbios, como um todo, apresentam uma alta dependência das condições ambientais, principalmente umidade e temperatura, para a manutenção das suas atividades metabólicas, sendo que muitas espécies sofrem alterações sazonais de vários parâmetros fisiológicos, incluindo o controle cardiovascular (PINDER *et al.*, 1992; GLASS *et al.*, 1997; ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999; BÍCEGO-NAHAS *et al.*, 2001). Em relação à rã touro, modelo animal do presente estudo, é interessante notar que apesar de mantido à mesma temperatura ambiente tal animal apresenta variação sazonal da PAM, com valores maiores durante o inverno em relação ao verão e à primavera, sem diferenças na FC (ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999). Além

disso, também ocorre acúmulo de CO<sub>2</sub> no sangue arterial durante o inverno, o que é evidenciado pela maior PaCO<sub>2</sub> nesta estação (ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999). Esses dados juntos indicam que deve ocorrer um aumento da resistência vascular periférica durante o inverno dificultando a eliminação do CO<sub>2</sub> pela pele, já que esta é uma importante via de troca de CO<sub>2</sub> com o ambiente (BURGGREN e MOALLI, 1984), levando assim ao aumento da PAM, mesmo sem alteração da FC. Burggren e Moalli (1984) sugerem em rãs-touro que a exposição ao ar induz um rearranjo vascular da pele diminuindo o fluxo de sangue para este órgão, reduzindo conseqüentemente as chances de desidratação. Assim, a ocorrência de acidose hipercapnica parece ser uma consequência natural durante o inverno, parecendo apresentar uma regulação endógena quando os animais são mantidos a mesma temperatura em ambas as estações (ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999). O suprimento sanguíneo para a pele nestes animais varia com a região do corpo, sendo que a região dorsal apresenta maior densidade vascular (CZOPEK, 1965). Assim, a região dorsal da pele deste anfíbio recebe maior suprimento sanguíneo proveniente da artéria cutânea, indicando sua proeminente função respiratória, enquanto que as alterações de fluxo sanguíneo para a região pélvica ventral (seat pach skin) estariam relacionadas ao balanço de água (VIBORG e ROSENKINDE, 2004; VIBORG e HILLYARD, 2005; VIBORG, *et al.*, 2006). Desta forma, um controle neural diferencial da vascularização cutânea pode contribuir com as alterações de fluxo vascular para diferentes leitoss.

A rã touro é uma espécie originária da América do Norte, entretanto já foi introduzida em aproximadamente 40 países com finalidades produtivas (LUTZ e AVERY, 1999). No Brasil, essa espécie foi introduzida na década de 1930 e atualmente, é a mais utilizada nos ranários de criação comercial (VIZOTTO, 1984; LIMA *et. al.*, 1998). Naturalmente ou em condições comerciais, os anfíbios estão sujeitos a eventos estressores que podem influenciar diretamente os parâmetros cardiovasculares mediados pelo SNC. Withers e colaboradores (1988) relataram em sapos (*Rhinella marina*) que a principal fonte de catecolaminas plasmáticas é proveniente da liberação de terminações nervosas, estando seus aumentados níveis relacionados a condições de desidratação e hemorragias. De forma complementar, alterações cardiovasculares por atuação do sistema nervoso simpático também são relatadas para situações de exercício em anfíbios (ROMERO, *et al.*, 2004), o que é de extrema importância para o animal em interações presa-predador. Condições ambientais desfavoráveis podem acarretar eventos de menor disponibilidade de água no ambiente, o que pode influenciar diretamente os anfíbios cuja dependência do meio aquático é necessária para a completa realização de seu ciclo de vida. Inúmeros são os eventos estressores que podem

influenciar um organismo ou mesmo suas populações, e muitos deles são relacionados às alterações climáticas, atuando direta ou indiretamente sobre os seres vivos, desta forma contribuindo negativa ou positivamente na dinâmica populacional de uma espécie (SHERIDAN e BICKFORD, 2011). Assim, esses eventos estressores podem estar relacionados às adaptações cardiovasculares moduladas pelo SNC nos anfíbios.

Diante do exposto acima, o objetivo do presente estudo foi testar, em rãs touro, a hipótese que o NO atuando no SNC apresenta função inibidora da PAM e da FC via redução da atividade simpática dependente de receptores  $\alpha$  e/ou  $\beta$ -adrenérgicos. Tal hipótese foi testada em duas estações do ano (inverno e primavera/verão) devido às evidências endógenas de variação da PAM nesses animais.

## 2 OBJETIVOS

Diante do exposto acima, o objetivo do presente estudo foi investigar em rãs touro (*Lithobates catesbeianus*):

- 1) a participação do NO encefálico no controle cardiovascular por meio da verificação do efeito da injeção intracerebroventricular de L-NMMA (inibidor não seletivo de NOS) sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca e a condutância vascular cutânea;
- 2) a influência dos receptores  $\alpha$  adrenérgicos periféricos no papel do NO encefálico no controle cardiovascular por meio da verificação do efeito do pré-tratamento intravenoso com prazosin (antagonista de receptores  $\alpha_1$ - adrenérgicos) mais a injeção intracerebroventricular de L-NMMA (inibidor não seletivo de NOS) sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca e a condutância vascular cutânea;
- 3) a influência dos receptores  $\beta$  adrenérgicos periféricos no papel do NO encefálico no controle cardiovascular por meio da verificação do efeito do pré-tratamento intravenoso com sotalol (antagonista de receptores  $\beta$ - adrenérgicos) mais a injeção intracerebroventricular de L-NMMA (inibidor não seletivo de NOS) sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca e a condutância vascular cutânea;
- 4) a influência das estações do ano inverno e primavera/verão sobre as alterações cardiovasculares, pressão arterial, frequência cardíaca e condutância vascular cutânea obtidas entre a combinação da injeção intracerebroventricular de L-NMMA (inibidor não seletivo de NOS) com a injeção intravenosa de prazosin (antagonista de receptores  $\alpha_1$ - adrenérgicos) e sotalol (antagonista de receptores  $\beta$ - adrenérgicos).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizadas rãs da espécie *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802; anteriormente conhecida como *Rana catesbeiana*) de ambos os sexos, com massa corporal entre 180 e 350 g. Os animais, provenientes do ranário do Centro de Aqüicultura (CAUNESP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, campus de Jaboticabal, foram levados ao laboratório pelo menos 3 semanas antes dos experimentos e mantidos em uma sala a 25°C dentro de caixas plásticas providas com um recipiente com água para realização de seus banhos. Foram alimentados três vezes por semana com ração comercial para peixes carnívoros e/ou larvas de *Tenebrio molitor* até dois dias antes dos procedimentos cirúrgicos. Os experimentos foram realizados durante os meses de inverno (junho-agosto) e primavera/verão (outubro-fevereiro). Os dados de temperatura e umidade relativa do ar dos meses em que foram feitos os experimentos são apresentados na tabela 1. Todos os protocolos de manutenção e manipulação foram realizados com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV (Protocolo nº 008519-10).

**Tabela 1:** Valores de temperatura máxima (Tmax), temperatura mínima (Tmin), temperatura média (Tmed), umidade relativa (UR) e precipitação pluviométrica correspondentes aos meses de realização dos experimentos de inverno (junho, julho e agosto) e primavera/verão (outubro, novembro, dezembro, janeiro e fevereiro) ao longo de dois anos consecutivos no campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, município de Jaboticabal, estado de São Paulo (FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁVIAS E VETERINÁRIAS, 2012).

<b>2010</b>					
<b>Mês</b>	<b>Tmax</b>	<b>Tmin</b>	<b>Tmed</b>	<b>UR</b>	<b>Precipitação</b>
	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(mm)
<b>Junho</b>	27,4	12,0	18,5	68,3	7,8
<b>Julho</b>	29,2	13,9	20,4	63,8	0,0
<b>Agosto</b>	30,7	12,9	20,8	52,2	0,0
<b>Outubro</b>	30,6	16,9	23,0	67,5	69,4
<b>Novembro</b>	31,0	18,7	24,1	70,3	100,1
<b>Dezembro</b>	31,4	20,6	25,1	77,8	225,3
<b>2011</b>					
<b>Janeiro</b>	30,9	21,0	24,7	81,0	260,1
<b>Fevereiro</b>	31,7	20,5	24,6	79,2	208,2
<b>Junho</b>	26,5	11,5	17,9	68,8	29,7
<b>Julho</b>	28,6	13,7	20,1	62,5	0,0
<b>Agosto</b>	30,2	14,9	21,7	56,3	18,4
<b>Outubro</b>	29,8	18,3	23,3	68,5	161,9
<b>Novembro</b>	30,1	17,3	23,1	65,8	177,0
<b>Dezembro</b>	30,9	19,2	24,1	74,1	159,8

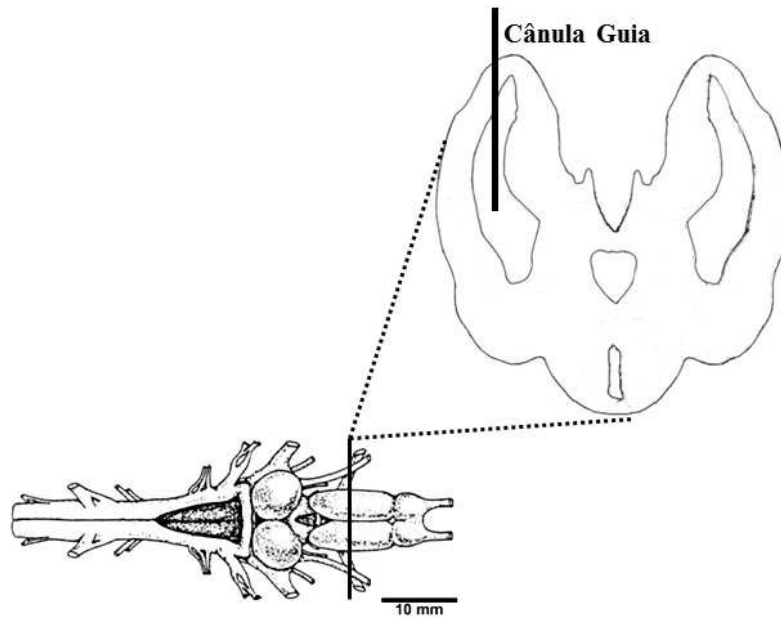
### 3.2 Fármacos

- L-NMMA (Tocris, EUA): acetato de N-monometil-L-arginina, inibidor não seletivo de NOS;
- Prazosin (Sigma, EUA): hidrocloreto de prazosin, antagonista de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos;

- Sotalol (Sigma, EUA): hidrocloreto de sotalol, antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos;
- Fenilefrina (Sigma, EUA): hidrocloreto de fenilefrina, agonista de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos;
- Isoproterenol (Sigma, EUA): (+)-sal bitartarato de isoproterenol, agonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos;
- Hexametônio (Sigma, EUA): cloreto de hexametônio, bloqueador de receptor nicotínico do gânglio autonômico.

### 3.3 Anestesia e procedimentos cirúrgicos

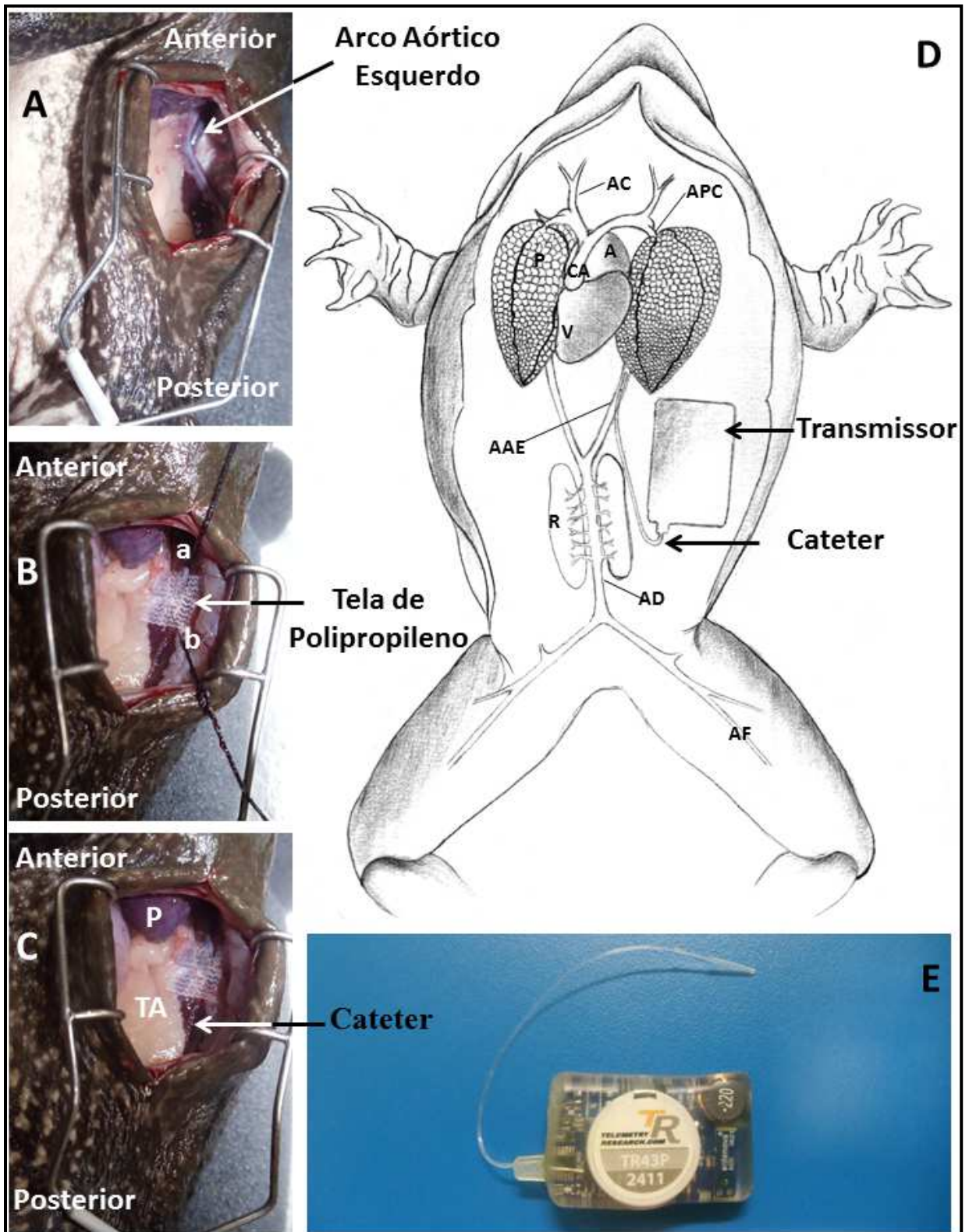
Os animais foram anestesiados por submersão em solução aquosa 0,3% de ácido etil éster 3-aminobenzóico (MS-222, Sigma, EUA), tamponado em pH 7,6 utilizando-se bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ). Após perda de reflexos postural e pupilar, a pele que recobre o crânio da rã foi removida e uma pequena abertura acima da região do diencéfalo foi realizada com o auxílio de um motor de baixa rotação (LBC, Beltec, Araraquara) até a completa abertura de um orifício de aproximadamente 1 centímetro. O animal foi fixado em um aparelho estereotáxico (David Kopf para pequenos animais, modelo 900, Tijunga, CA, EUA), e uma cânula guia preparada a partir de uma agulha hipodérmica, com 14 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo foi fixada ao topo do aparelho estereotáxico e inserida no ventrículo lateral encefálico do animal. As coordenadas para a inserção da cânula guia foram adaptadas de um atlas de encéfalo de anuros (DONKELAAR, 1998), sendo 1,5 mm lateral à linha média, 3,0 mm anterior ao limite entre o telencéfalo e o diencéfalo e 2 mm abaixo da superfície dorsal do telencéfalo (Figura 1). O deslocamento do menisco em um manômetro de água indicou o correto posicionamento da cânula guia no ventrículo encefálico lateral. O orifício ao redor da cânula foi preenchido com uma pasta constituída por uma mistura em partes iguais de parafina e glicerina. A cânula foi fixada ao crânio por meio de parafusos e cimento acrílico e um mandril foi introduzido em seu interior para prevenir oclusão e infecção.



**Figura 1.** Desenho esquemático do encéfalo de rã-touro mostrando corte transversal da região do telencéfalo onde a cânula guia foi posicionada no ventrículo lateral. Desenhos adaptados de Donkelaar (1998); Huynh e Boyd (2007).

Ainda com o animal sob efeito da anestesia, outro procedimento cirúrgico foi realizado para a implantação de um transmissor de telemetria (TR43P, Telemetry Research, Auckland, Neva Zelândia) para medidas de pressão arterial pulsátil (PAP) a temperatura corporal. O sistema de telemetria utilizado no presente trabalho foi originalmente desenvolvido para mamíferos de pequeno porte, como ratos. Adaptamos a implantação do transmissor de acordo com as diferenças anatômicas encontradas no animal experimental do presente trabalho: a rã foi posicionada em decúbito lateral (lado esquerdo) e uma incisão lateral de aproximadamente 3,5 cm foi feita na pele e conseqüentemente na musculatura adjacente no lado esquerdo da região abdominal para exposição do arco aórtico esquerdo (aorta lateral). O arco aórtico foi isolado utilizando-se linha cirúrgica para diminuir o fluxo sanguíneo no vaso, e o mesmo foi perfurado cuidadosamente com auxílio de uma agulha (25 x 0.6 mm) posicionada em direção contrária ao fluxo. O cateter do transmissor foi inserido no pequeno orifício realizado com a agulha e fixado à parede da artéria com cola cirúrgica para tecidos biológicos (Dermabond® Topical Skin Adhesive, Tissue, Johnson&Johnson, Medical Brazil). Nesse procedimento o fluxo sanguíneo no vaso não foi interrompido. Uma tela de polipropileno foi fixada com cola cirúrgica no vaso sanguíneo, no cateter do transmissor e no

tecido ao redor do vaso sanguíneo (tecido adiposo), a estrutura garantiu assim estabilidade de toda a preparação, evitando deslizamento do cateter para fora do vaso e possíveis perdas de sinal de PAP. O corpo do transmissor, que inclui um sensor de temperatura, foi cuidadosamente inserido na cavidade abdominal e fixado à musculatura abdominal (*obliquus externus*) (Figura 2). Após a cirurgia, os animais receberam profilaxia com antibiótico de amplo espectro (enrofloxacina, Flotril®; Schering-Plough, 5 mg.kg<sup>-1</sup> sc) e anti-hiperalgésico (Flunixinina Meglumina, Banamine®; Schering-Plough, 1 mg.kg<sup>-1</sup> sc) de acordo com doses recomendadas para anfíbios (GENTZ, 2007; SMITH, 2007).



**Figura 2.** Procedimento cirúrgico para implantação de um transmissor de telemetria via arco aórtico esquerdo (AAE; ou aorta lateral esquerda). Veja o texto para maiores detalhes. Em **A**, **B** e **C**, fotografias seqüenciais para localização (**A**), isolamento, inserção do cateter (**B**), e fixação do cateter no arco aórtico esquerdo e no tecido ao redor do vaso (**C**) para melhor fixação da estrutura. Em **B**, **a** e **b** referem-se às ligaduras anterior e posterior do arco aórtico, respectivamente; e a seta aponta a localização da tela de polipropileno (ver texto). Em **D**, desenho esquemático de uma rã-touro, mostrando o posicionamento do corpo do transmissor na cavidade abdominal e o cateter inserido no

arco aórtico esquerdo. Em **E**, transmissor de telemetria utilizado no presente trabalho. **A**, átrio; **AAE**, arco aórtico esquerdo; **AC**, artéria carótida; **AD**, aorta dorsal; **AF**, artéria femoral; **APC**, artéria pulmocutânea; **CA**, *conus arteriosus*; **P**, pulmão; **R**, rim; **V**, ventrículo.

Cinco dias após implantações da cânula guia e do transmissor de telemetria, os animais foram novamente anestesiados (veja protocolo acima) e uma cânula de polietileno (PE50) foi implantada na veia femoral para as injeções em bôlus dos agonistas e antagonistas adrenérgicos. Para as medidas do fluxo sanguíneo cutâneo regional, um sensor portando um sistema a laser Doppler (MSP100XP Standard Surface Probe, ADInstruments®, Sidney, Australia) foi suturado na pele da região pélvica do animal. Após estes procedimentos cirúrgicos, os animais receberam novamente profilaxia com antibiótico e analgésico (veja doses acima).

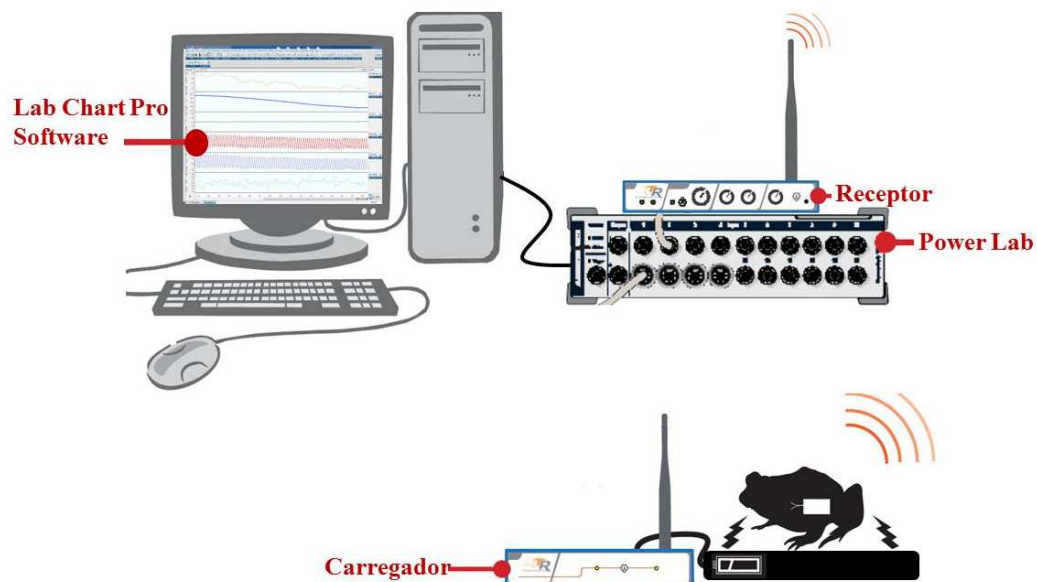
### **3.4 Microinjeção**

As microinjeções foram realizadas em rãs não anestesiadas utilizando-se uma seringa Hamilton de 5 $\mu$ L e uma agulha dental de injeção (Mizzy, 200  $\mu$ L de diâmetro externo), conectadas por uma cânula de polietileno, PE-10. Microinjeções com volume de 1 $\mu$ L foram realizadas utilizando-se um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting CO., IL, EUA) por um intervalo de 40 segundos, sendo a agulha removida da cânula somente após o final do experimento (cerca de 30 minutos) para se evitar perturbações ao animal e interferências nos registros de pressão arterial pulsátil.

Ao final de todos os protocolos foi injetado 1 $\mu$ L de solução 1% de Azul de Evans para se confirmar o espalhamento do corante pelo sistema ventricular e tecido periventricular. Logo após os animais foram eutanasiados em solução anestésica de MS-222 por tempo suficiente para eutanásia (aproximadamente 40 minutos).

### **3.5 Medidas da temperatura corporal ( $T_c$ ), pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)**

A PAP e a Tc do animal foram monitoradas continuamente ao longo de todo o protocolo experimental por meio do sistema de telemetria (Figura 3). O sensor interno do transmissor implantado na cavidade abdominal do animal detecta, amplifica e transmite os dados para um aparelho receptor (Telemetry Research Receiver, Auckland, Nova Zelândia) devidamente ajustado ao canal do transmissor. Este sinal foi captado por um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab System, **ADINSTRUMENTS**<sup>®</sup>/Chart Software, version 7.3, Sidney, Austrália), por meio de um controle de software de programação (**ADINSTRUMENTS**<sup>®</sup> Scheduler Pod, Sydney, Austrália) compatível com qualquer sistema de aquisição. A FC foi determinada pela contagem dos pulsos de pressão arterial e a PAM foi calculada como:  $PAM = 2/3PD + 1/3PS$  (PD= pressão diastólica; PS= pressão sistólica).



**Figura 3.** Representação esquemática do *set up* experimental: carregamento do sensor de telemetria; aparelho receptor para o sinal *wireless* proveniente do transmissor inserido na cavidade abdominal do animal; sistema de aquisição de dados cujos sinais eram enviados para um computador contendo o software (Lab Chart Pro) para registros em tempo real e posterior análise *off line*. Adaptado de ADInstruments (2012).

### 3.6 Medidas do fluxo sanguíneo cutâneo e cálculo da condutância vascular cutânea (CVC)

As alterações no fluxo sanguíneo cutâneo foram avaliadas em tempo real por meio de um sensor a laser capaz de medir a velocidade de perfusão das células sanguíneas

(MSP100XP Standard Surface Probe, **ADINSTRUMENTS**<sup>®</sup>, Sidney, Austrália). Tal sensor foi fixado por suturas cirúrgicas à superfície pélvica ventral da pele do animal. A fibra óptica do probe de fluxo ilumina uma pequena área de tecido, na qual a luz emitida é capaz de penetrar o tecido estudado (usualmente cerca de um milímetro cúbico) e uma pequena porcentagem é refletida de volta para a fibra óptica. A direção e a taxa de fluxo sanguíneo nos capilares em um tecido causa uma alteração Doppler na luz refletida. As alterações na frequência do laser são detectadas por um instrumento, produzindo um sinal proporcional às mudanças de direção e velocidade das células sanguíneas. A calibração do fluxo foi realizada utilizando uma solução de esferas de látex em movimento Browniano.

Os sinais do sensor de fluxo sanguíneo foram monitorados por um medidor de fluxo sanguíneo (ML191, **ADINSTRUMENTS**<sup>®</sup>, Sidney, Austrália), conectado a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab System, **ADINSTRUMENTS**<sup>®</sup>/Chart Software, version 7.3, Sidney, Australia). O fluxo sanguíneo cutâneo foi obtido a partir da média dos dados do sensor a laser, avaliados em unidades de perfusão (UP), por um intervalo de tempo de um minuto estável. Estes dados foram subsequentemente convertidos para valores de Condutância Vascular Cutânea (CVC) a partir dos dados de PAM, obtidos simultaneamente com os dados do fluxo sanguíneo cutâneo:  $CVC = UP/PAM$ . Os valores de CVC foram expressos como porcentagem do valor basal para cada animal, e todos os valores basais foram obtidos antes da administração das drogas ( $\Delta \%CVC_{basal}$ ) (MINSON et. al., 2002; GREEN et. al., 2006; SEEBACHER e FRANKLIN, 2007).

### **3.7 Protocolos experimentais**

Todos os experimentos foram realizados com animais não anestesiados.

#### **3.7.1 Efeito da injeção intracerebroventricular (icv) de L-NMMA sobre a PA, a FC e o fluxo sanguíneo cutâneo e participação dos receptores $\alpha$ e $\beta$ adrenérgicos periféricos em rãs-touro durante primavera/verão.**

Os experimentos foram realizados compreendendo os meses mais chuvosos do ano, entre outubro e fevereiro (primavera/verão; tabela 1). O início do protocolo experimental

caracterizou-se pela realização de medidas de repouso (basal) da PAP e do fluxo sanguíneo cutâneo por aproximadamente 30 minutos, conduzidos após 48 horas do último procedimento cirúrgico. Após esse tempo os animais receberam injeção intravenosa (iv) de Ringer (veículo) e cinco minutos depois, microinjeção intracerebroventricular (icv) de Líquor Artificial (veículo), sendo transcrito o registro de PAP por aproximadamente 25 minutos. Ao final desse tempo, realizou-se injeções iv de fenilefrina e isoproterenol para verificar seus efeitos sobre a PAM, FC e CVC (Protocolo 1). Passado o efeito desses tratamentos, seguiu-se à execução dos outros protocolos sendo injeção iv de prazosin, sotalol ou Ringer seguidos 5 minutos depois por injeção icv de líquido artificial ou L-NMMA, sendo transcrito o registro da PAP e do fluxo sanguíneo por aproximadamente 25 minutos (Figura 4). Ao final de cada sequência experimental, os animais receberam novamente injeção iv de fenilefrina ou isoproterenol para comparar com os efeitos iniciais e, assim, testar a efetividade dos respectivos antagonistas. Também foi realizado um protocolo para verificar o efeito da injeção iv do bloqueador ganglionar hexametônio sobre a ação do L-NMMA icv. As combinações das injeções iv com as microinjeções icv foram:

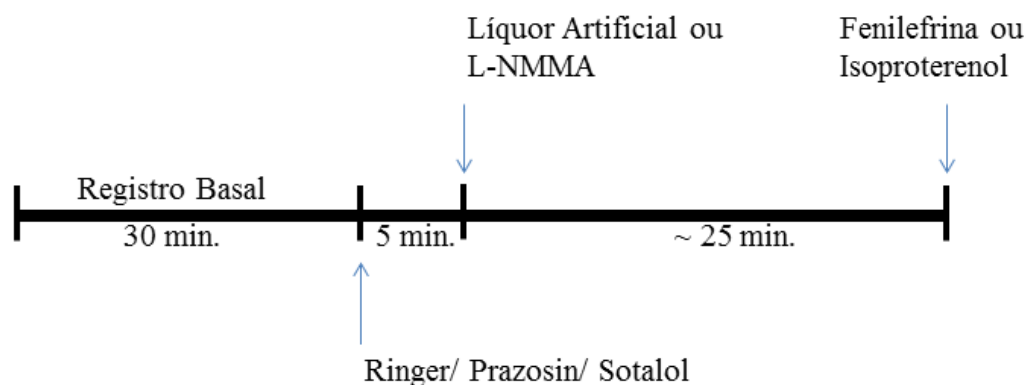
Protocolo 1: Basal – Ringer – Líquor – Fenilefrina e Isoproterenol

Protocolo 2: Basal – Ringer – L-NMMA

Protocolo 3: Basal – Sotalol – Líquor ou L-NMMA – Isoproterenol

Protocolo 4: Basal – Prazosin – Líquor ou L-NMMA - Fenilefrina

Protocolo 5: Basal – Hexametônio – Líquor ou L-NMMA



**Figura 4.** Esquema dos protocolos experimentais.

Quando realizada microinjeção icv de L-NMMA, a realização de outro protocolo só ocorria no mínimo 24 horas mais tarde, para evitar efeito remanescente do inibidor de NOS. O mesmo ocorreu quando da injeção *in bolus* intravenosa de prazosin e de hexametônio. Desta forma, todos os protocolos experimentais foram concluídos aproximadamente entre quatro e seis dias e a maioria dos animais foram submetidos a todos os protocolos experimentais. Quando a completa condução dos experimentos não foi possível em um mesmo animal, isso aconteceu principalmente em decorrência de perdas do sinal de PAP (deslocamento da cânula do arco aórtico esquerdo) ou mesmo por perda da canulação central (perda da estrutura que fixa a cânula guia na calota craniana do animal).

As doses de todos os fármacos foram baseadas em experimentos pilotos e em estudos anteriores com anfíbios (GARGAGLIONI e BRANCO, 2001; GUERRA *et al.*, 2008), répteis (ALTIMIRAS *et al.*, 1998; SKALS, *et al.*, 2005; EME, *et al.*, 2011) e mamíferos (COLOMBARI *et al.*, 1994; DE PAULA *et al.*, 2000; STEINER *et al.*, 2001). A dose de Sotalol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) foi obtida a partir de testes iniciais, sendo escolhida aquela capaz de bloquear o efeito do isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico), mas suficiente para não causar reduções significativas na FC (sotalol, 0,5 mg.kg<sup>-1</sup>). A dose escolhida de prazosin (antagonista  $\alpha$ 1-adrenérgico) foi a máxima possível para dissolver em volume compatível de Ringer a ser injetado no animal, não causando alterações significativas no volume sanguíneo (1.0 mg.kg<sup>-1</sup>). A dose de L-NMMA foi escolhida por ser suficiente para causar resposta hipertensora em lagartos teiús (dados não publicados do nosso laboratório) e em rãs-touro de acordo com experimentos piloto.

A composição iônica da solução Ringer em miligramas foi (pH=7,8 a 25 °C): 27,4 x 10<sup>4</sup> NaCl; 15,7 x 10<sup>4</sup> KCl; 35,0 CaCl<sub>2</sub>; 26,0 MgSO<sub>4</sub>; 15,9 x 10<sup>1</sup> NaHCO<sub>3</sub>; 99,0 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>. E a composição iônica para o líquido artificial (pH=7,8 a 25 °C): 7,8 x 10<sup>2</sup> NaCl; 3,7 x 10<sup>1</sup> KCl; 2,7 x 10<sup>1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 1,57 x 10<sup>1</sup> MgSO<sub>4</sub>; 1,7 x 10<sup>1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,2 x 10<sup>2</sup> NaHCO<sub>3</sub>; 1,8 x 10<sup>2</sup> C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.

### **3.7.2 Efeito da injeção icv de L-NMMA sobre a PA, a FC e o fluxo sanguíneo cutâneo e participação dos receptores $\alpha$ e $\beta$ adrenérgicos periféricos em rãs-touro durante o inverno.**

Esses experimentos foram realizados da mesma forma que aqueles descritos acima, sendo os protocolos de 1 a 4 repetidos durante o inverno, que compreende os meses mais secos do ano, de junho a agosto (Tabela 1).

### **3.8 Análise estatística dos resultados**

A análise dos dados foi realizada a partir das diferenças entre o efeito máximo dos fármacos e os valores basais antes das injeções para Pressão Arterial Média ( $\Delta$  PAM), Frequência Cardíaca ( $\Delta$  FC) e Condutância Vascular Cutânea ( $\Delta$  CVC). O *T*-test foi aplicado para verificar se as diferenças entre as medidas de  $\Delta$  PAM,  $\Delta$  Frequência Cardíaca e  $\Delta$  CVC foram significativamente diferentes de zero ( $P < 0.05$ ). As pressuposições da análise de variância foram atendidas (Cramer-von Mises,  $P < 0.05$ ) e a presença de *outliers* foram testadas. Após isso, uma ANOVA fatorial 4x2 foi realizada para verificar a influência do efeito dos quatro tratamentos e as duas estações (inverno e primavera/verão) sobre  $\Delta$  PAM,  $\Delta$  FC e  $\Delta$  CVC ( $P < 0.05$ ). Diferenças significativas entre os valores médios foram identificadas usando teste *post hoc* de Tukey ( $P < 0.05$ ). Um teste *t* pareado foi utilizado para acessar diferenças significativas para o efeito dos agonistas (fenilefrina e isoproterenol) após injeção dos antagonistas (prazosin e sotalol) em relação ao efeito isolado do agonista. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS GLM procedure (SAS®; Littell *et al.*, 2002). Os gráficos foram feitos utilizando o Graphpad Prism® 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Valores hemodinâmicos de repouso

Dados hemodinâmicos e Tc de rãs-touro durante primavera/verão e inverno estão apresentados na Tabela 2. A PAM, a pressão sistólica e a diastólica foram maiores durante o inverno em relação à primavera/verão (Tabela 2), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para os dados de FC e Tc entre as estações. Os valores absolutos de repouso de CVC foram significativamente maiores durante o inverno em relação à primavera/verão (Tabela 2).

**Tabela 2:** Valores de repouso de pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD), pressão arterial media (PAM), frequência cardíaca (FC), temperatura corporal (Tc) e condutância vascular cutânea (CVC) de rãs *Lithobates catesbeianus* durante a primavera/verão e o inverno.

Estação	PS (mmHg)	PD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Tc (°C)	CVC
<b>Primavera/Verão</b> (n= 14)	27,9 ± 1,3	20,7 ± 1,0	24,0 ± 1,1	40,1 ± 2,0	24,3 ± 0,4	0,00259 ± 0,00091 <sup>a</sup>
<b>Inverno</b> (n= 11)	32,6 ± 1,5*	25,6 ± 1,2*	28,9 ± 1,3*	38,6 ± 2,1	22,7 ± 0,3	0,05265 ± 0,00728 <sup>b*</sup>

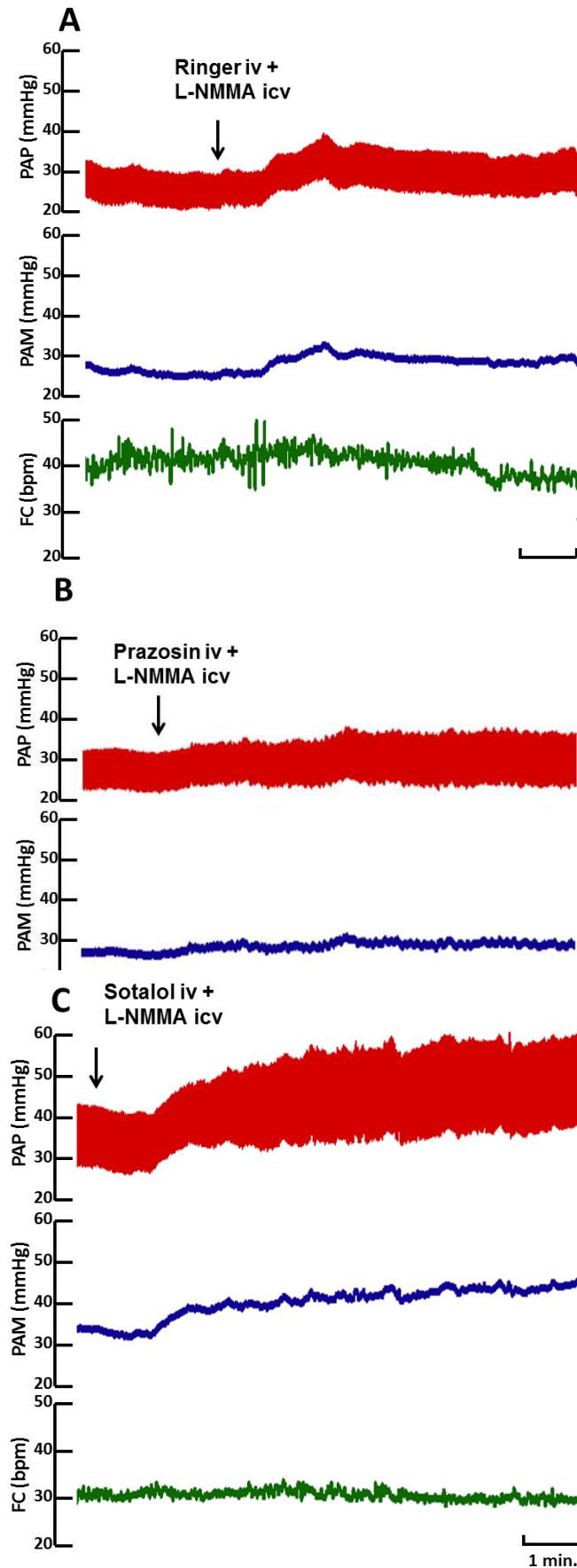
n: número de animais; \*diferenças significativas em relação aos valores de primavera/verão (*t*-test).

<sup>a</sup>n = 7; <sup>b</sup>n = 8.

### 4.2 Efeito do bloqueio da síntese de NO encefálico associado ou não com o antagonismo periférico de receptores adrenérgicos $\alpha$ ou $\beta$ nas funções cardiovasculares de rãs-touro durante primavera/verão e inverno

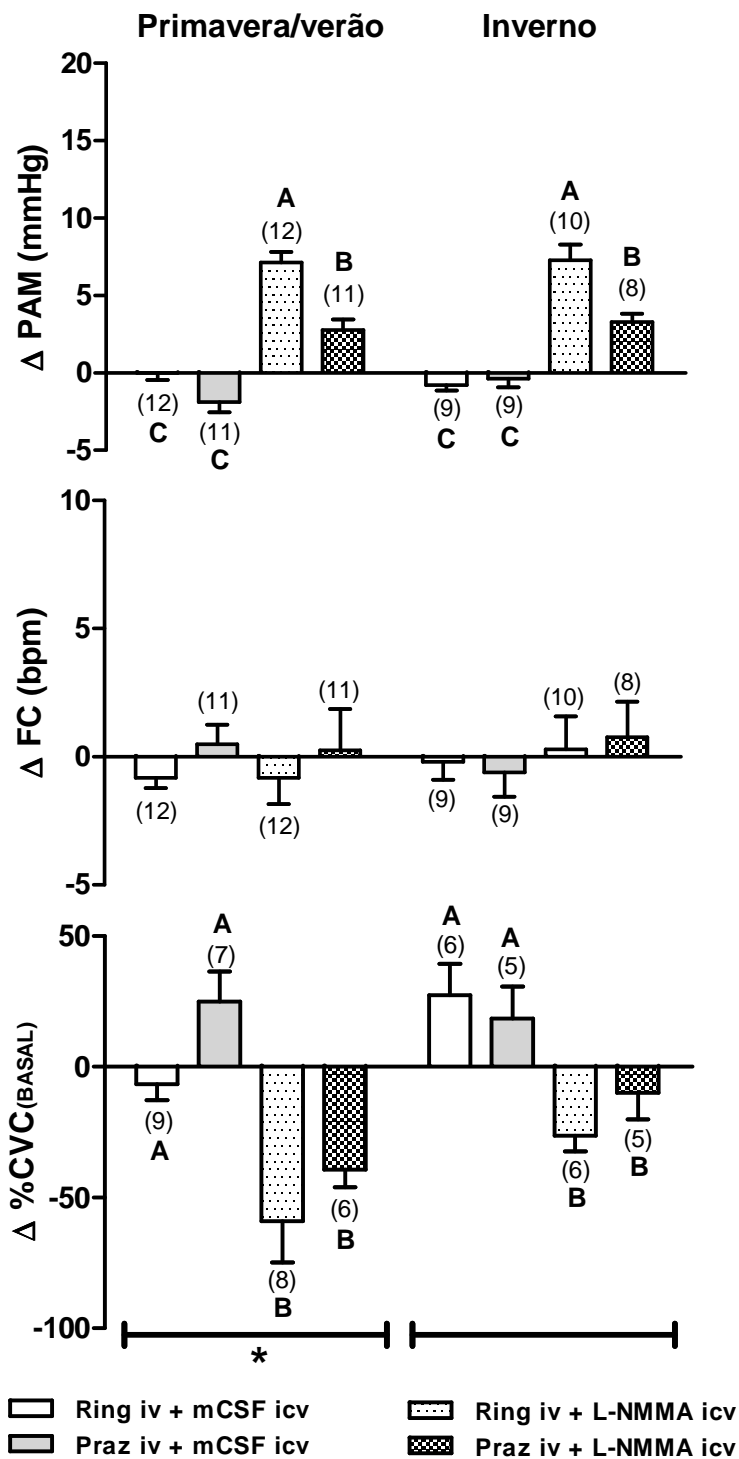
Na Figura 5 são apresentados registros representativos de PAP, PAM e FC após microinjeção icv de L-NMMA mais pré-tratamento com injeção iv de Ringer (Fig 5A), prazosin (Fig. 5B) ou sotalol (Fig. 5C) durante a primavera/verão. Podemos observar que o

tratamento com L-NMMA (Fig 5A) causou aumento na PAM, mas não na FC, efeito que foi parcialmente inibido pelo prazosin (Fig. 5B) e intensificado pelo sotalol (Fig. 5C).

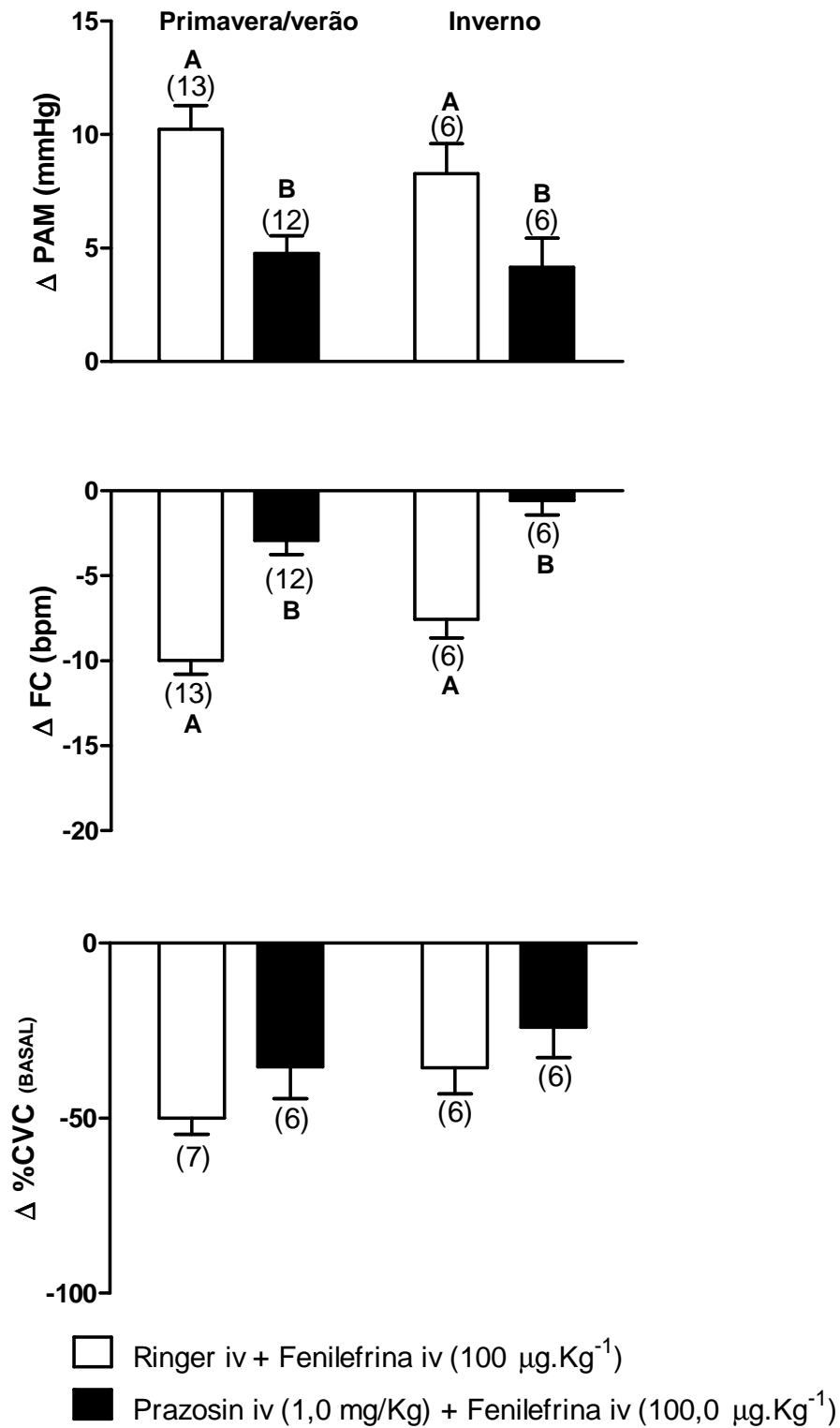


**Figura 5.** Primavera/verão: Registros representativos de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). As setas indicam o momento da microinjeção icv de L-NMMA. (A) Efeito da injeção icv de L-NMMA ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) combinado com a injeção iv de Ringer 5 minutos antes; (B) Efeito da injeção icv de L-NMMA ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) combinado com a injeção iv de prazosin ( $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) 5 minutos antes; (C) Efeito da injeção icv de L-NMMA ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) combinado com a injeção iv de sotalol ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) 5 minutos antes.

Podemos observar na Figura 6 que em ambas as estações do ano (primavera/verão vs inverno) a microinjeção icv de L-NMMA causou aumento significativo na PAM (primavera/verão;  $\Delta$  PAM  $+7.14 \pm 0.67$  mmHg/ inverno;  $\Delta$  PAM  $+7.29 \pm 0.98$  mmHg;  $p < 0,05$ ; teste de Tukey) e diminuição na CVC da pele da região pélvica ventral (primavera/verão:  $\Delta$  %CVCbasal:  $-59.10 \pm 15.77$ / inverno:  $\Delta$  %CVCbasal:  $-26.31 \pm 6,13$ ;  $p < 0,05$ ; teste de Tukey), mas não alterou a FC (primavera/verão:  $\Delta$  FC:  $-0.82 \pm 1.02$  bpm/ inverno:  $\Delta$  FC  $+0.28 \pm 1,28$ ) em comparação à microinjeção de líquido artificial (primavera/verão;  $\Delta$  PAM:  $-0.004 \pm 0.43$  mmHg;  $\Delta$  %CVCbasal:  $-6.63 \pm 6.13$ ;  $\Delta$  FC:  $-0.81 \pm 0.41$  bpm/ inverno;  $\Delta$  PAM:  $-0.77 \pm 0.35$  mmHg;  $\Delta$  %CVCbasal:  $+27.27 \pm 12.17$ ;  $\Delta$  FC:  $-0.20 \pm 0.71$ ). A injeção iv de prazosin associada à microinjeção icv de líquido artificial não causou queda significativa na PAM (primavera/verão:  $-1.89 \pm 0.65$  mmHg/ inverno:  $-0.38 \pm 0.55$  mmHg) e na FC (primavera/verão:  $+0.49 \pm 0.76$  bpm/ inverno:  $-0,62 \pm 0,93$  bpm) mas inibiu significativamente o efeito pressórico da administração icv de L-NMMA (primavera/verão:  $+2.76 \pm 0.69$  mmHg/ inverno:  $+3,29 \pm 0,54$  mmHg  $p < 0,05$ ; teste de Tukey; Figura 6). Houve diferença significativa entre as médias de  $\Delta$  PAM devido ao efeito de combinação das drogas ( $p < 0,05$ ) e não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) das médias de  $\Delta$  PAM e  $\Delta$  FC entre as estações. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias de  $\Delta$  CVC para o efeito da combinação das drogas e da estação (Figura 6). Este antagonista  $\alpha 1$ -adrenérgico bloqueou em mais de 50% o efeito pressórico (primavera/verão:  $+10.23 \pm 1.05$  vs  $+4.75 \pm 0.79$  mmHg/ inverno:  $+8.28 \pm 1,32$  vs  $+4,15 \pm 1,28$  mmHg,  $p < 0,05$ , teste de Tukey) e em mais de 70% o efeito bradicárdico (primavera/verão:  $-9.97 \pm 0.81$  vs  $-2.92 \pm 0.82$  bpm/ inverno:  $-7,55 \pm 1,11$  vs  $-0,57 \pm 0,86$  bpm,  $p < 0,05$ , teste de Tukey) do agonista  $\alpha 1$ , fenilefrina, durante ambas as estações analisadas (Figura 7). A fenilefrina causou diminuição da CVC na pele da região pélvica ventral do animal, ou seja, um efeito decorrente de uma vasoconstrição local (primavera/verão;  $\Delta$  %CVCbasal:  $-49.98 \pm 4.59$ / inverno;  $\Delta$  %CVCbasal:  $-35,56 \pm 7,45$ ), mas que não foi significativamente atenuado pelo tratamento iv com prazosin (primavera/verão:  $\Delta$  %CVCbasal:  $-35.27 \pm 9.19$ / inverno:  $-23,97 \pm 8,63$ ; Figura 7). Não houve diferença significativa entre as médias de  $\Delta$  PAM,  $\Delta$  FC e  $\Delta$  CVC entre as distintas estações do ano.



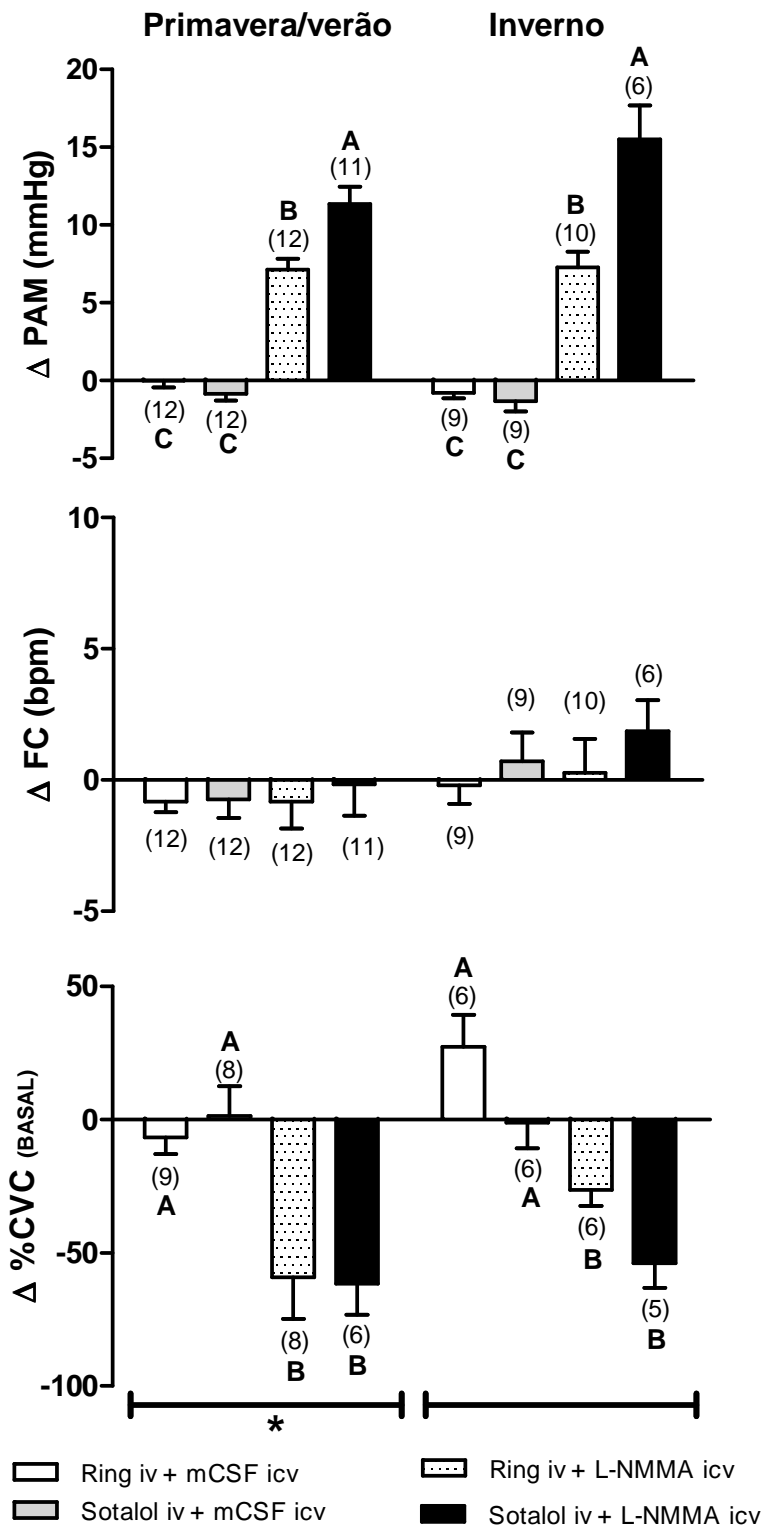
**Figura 6.** Efeito da microinjeção intracerebroventricular (icv) de L-NMMA ( $1.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) ou líquido artificial (mCSF), precedido pela injeção intravenosa (iv) de prazosin (Praz;  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) ou Ringer (Ring) sobre a pressão arterial média (A;  $\Delta$  PAM), a frequência cardíaca (B;  $\Delta$  FC) e a condutância vascular cutânea (C;  $\Delta\%$ CVC) durante primavera/verão e inverno. A CVC é expressa como % dos valores basais (%CVC basal). Os dados são apresentados como diferença dos valores antes e após a injeção dos fármacos ( $\Delta$ ) e expressos como média  $\pm$  EPM. Em A e C as letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos para uma mesma estação (primavera/verão ou inverno) pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Em C, \* representa diferença significativa entre as estações (primavera/verão e inverno, teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).



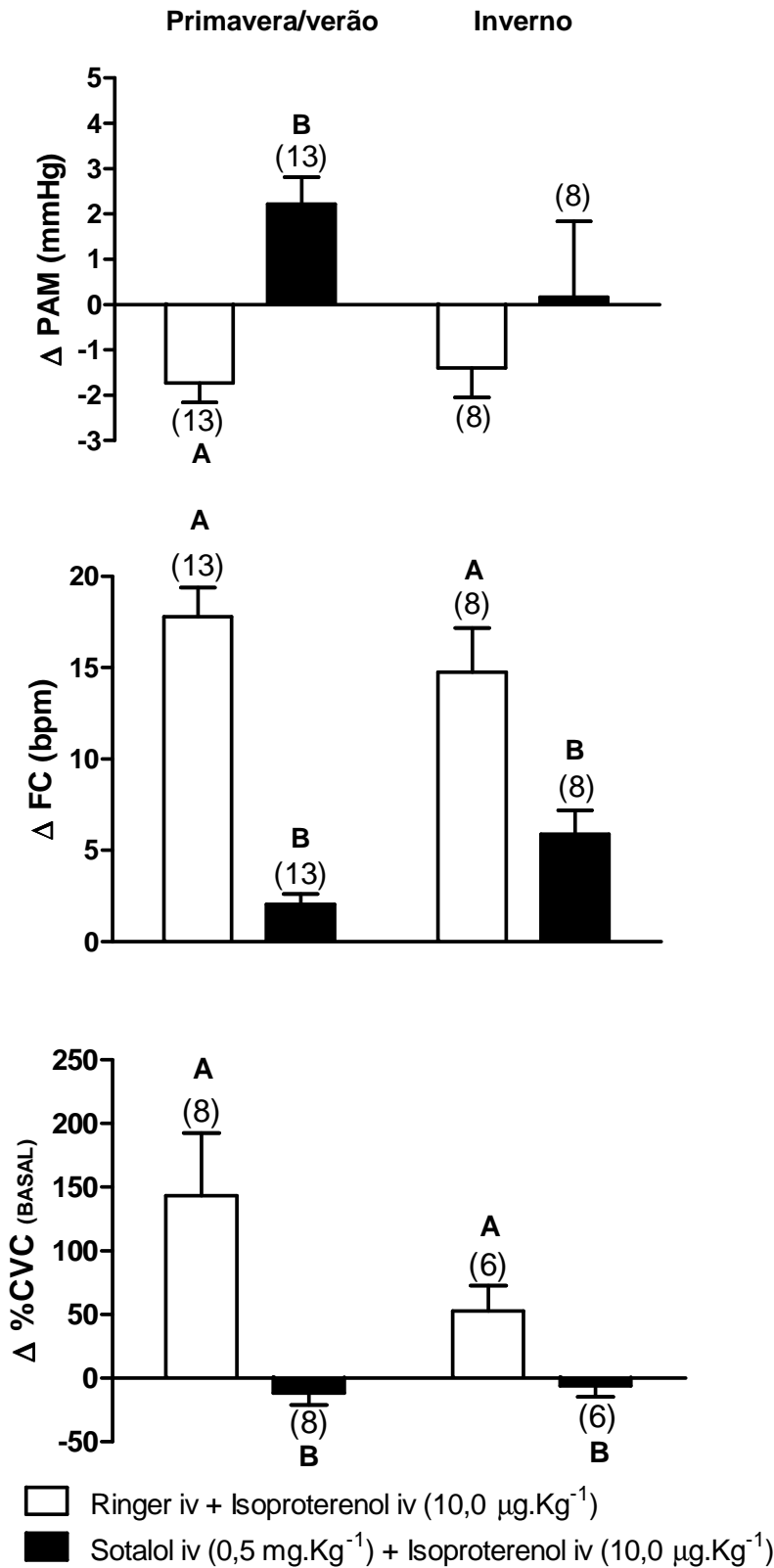
**Figura 7.** Efeito da injeção intravenosa (iv) de fenilefrina precedida por Ringer (veículo) ou prazosin sobre a pressão arterial média (**A**;  $\Delta$  PAM), a frequência cardíaca (**B**;  $\Delta$  FC) e a condutância vascular cutânea (**C**;  $\Delta$  %CVC basal) durante a primavera/verão e o inverno. Os dados são apresentados como diferença dos valores antes e após a injeção dos fármacos ( $\Delta$ ) e expressos como média  $\pm$  EPM. As letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Na figura 8, pode-se observar que o antagonista  $\beta$ -adrenérgico sotalol associado à microinjeção de líquido artificial não causou alterações na PAM, FC e na CVC, mas acentuou o efeito pressórico da microinjeção icv de L-NMMA (primavera/verão:  $\Delta$  PAM:  $7,14 \pm 0,67$  mmHg vs  $+11,35 \pm 1,11$  mmHg/ inverno;  $\Delta$  PAM:  $+7,29 \pm 0,99$  vs  $+15,5 \pm 2,19$  mmHg,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey) com nenhuma alteração significativa na CVC em relação à combinação entre a injeção iv de Ringer e icv de L-NMMA, durante a primavera/verão ( $\Delta$  %CVC basal:  $-59,10 \pm 15,77$  vs  $-61,53 \pm 11,61$ ) e durante o inverno ( $\Delta$  %CVC basal:  $-26,31 \pm 6,13$  vs  $-53,87 \pm 9,34$ ). O tratamento não alterou a FC. Houve diferença significativa entre as médias de  $\Delta$  PAM devido ao efeito de combinação das drogas ( $p < 0,05$ ) e não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) das médias de  $\Delta$  PAM e  $\Delta$  FC entre as estações. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias de  $\Delta$  CVC para o efeito da combinação das drogas e da estação (Figura 8)

A injeção iv de sotalol inibiu quase completamente o efeito taquicárdico do agonista  $\beta$ , o isoproterenol (primavera/verão:  $\Delta$  FC:  $+17,80 \pm 1,57$  vs  $+2,05 \pm 0,56$  bpm/ inverno;  $\Delta$  FC:  $+14,75 \pm 2,42$  vs  $+5,88 \pm 1,31$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , teste de Tukey; Figura 9). A injeção iv de isoproterenol causou aumento na CVC da pele da região pélvica ventral do animal, o qual foi significativamente inibido pelo tratamento com sotalol (primavera/verão;  $\Delta$  %CVC basal:  $+143,2 \pm 49,37$  vs  $-11,74 \pm 9,31$ ; inverno;  $\Delta$  %CVC basal:  $+52,72 \pm 20,0$  vs  $-6,08 \pm 8,50$ ,  $p < 0,05$ , teste de Tukey; Figura 9).

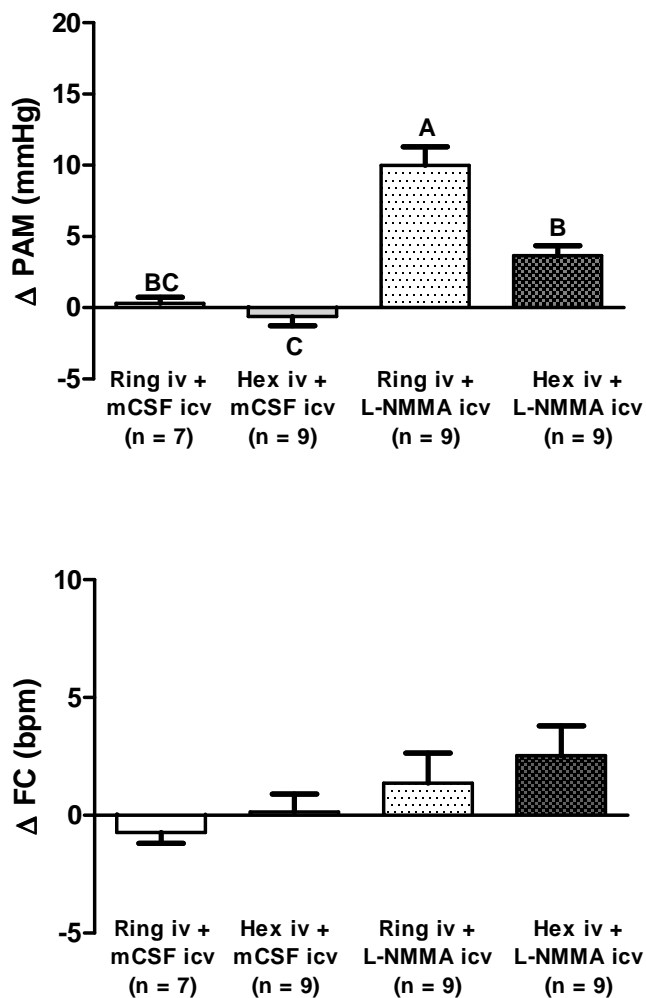


**Figura 8.** Efeito da microinjeção intracerebroventricular (icv) de L-NMMA ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) ou líquido artificial (mCSF), precedido pela injeção intravenosa (iv) de sotalol (Sot;  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou Ringer (Ring) sobre a pressão arterial média (A;  $\Delta$  PAM), a frequência cardíaca (B;  $\Delta$  FC) e a condutância vascular cutânea (C;  $\Delta$ %CVC) durante primavera/verão e o inverno. A CVC é expressa como % dos valores basais (%CVC basal). Os dados são apresentados como diferença dos valores antes e após a injeção dos fármacos ( $\Delta$ ) e expressos como média  $\pm$  EPM. Em A e C as letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos para uma mesma estação (primavera/verão ou inverno) pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os dados para “Ring iv + mCSF icv” and “Ring iv + L-NMMA icv” nas duas estações são os mesmos plotados na Figura 6. Em C, \* representa diferença significativa entre as estações (primavera/verão e inverno, teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).



**Figura 9.** Efeito da injeção intravenosa (iv) de isoproterenol precedida por Ringer (veículo) ou sotalol sobre a pressão arterial média (**A**;  $\Delta$  PAM), a frequência cardíaca (**B**;  $\Delta$  FC) e a condutância vascular cutânea (**C**;  $\Delta$  %CVC basal) durante primavera/verão e inverno. Os dados são apresentados como diferença dos valores antes e após a injeção dos fármacos ( $\Delta$ ) e expressos como média  $\pm$  EPM. As letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Na figura 10, pode-se observar que a injeção iv de hexametônio associada à microinjeção icv de líquido artificial não causaram alterações significativas na PAM ( $\Delta$  PAM:  $-0,61 \pm 0,64$  mmHg.) nem na FC ( $\Delta$  FC:  $+0,14 \pm 0,75$  bpm). No entanto, o pré-tratamento com hexametônio bloqueou parcialmente o efeito pressórico causado pela microinjeção icv de L-NMMA ( $\Delta$  PAM:  $+9,99 \pm 1,29$  mmHg vs  $+3,66 \pm 0,71$  mmHg). Nenhum dos tratamentos causou alterações significativas da FC.



**Figura10.** Efeito da microinjeção intracerebroventricular (icv) de L-NMMA ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) ou líquido artificial (mCSF), precedido pela injeção intravenosa (iv) de hexametônio (Hex;  $25,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou Ringer (Ring) sobre a pressão arterial média (A;  $\Delta$  PAM), e a frequência cardíaca (B;  $\Delta$  FC). Os dados são apresentados como diferença dos valores antes e após a injeção dos fármacos ( $\Delta$ ) e expressos como média  $\pm$  EPM. As letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho são indicativos de que o NO atuando no SNC apresenta um tônus inibidor da PAM de rãs independente da estação do ano, como pode ser evidenciado pelo aumento da PAM, mas não da FC, após inibição da síntese de NO encefálico pela microinjeção icv de L-NMMA. Esse tônus nitrérgico hipotensor parece ocorrer pela influência na atividade simpática dependente de receptores alfa e beta adrenérgicos dos vasos periféricos.

### 5.1 Efeito do bloqueio encefálico da NOS sobre o sistema cardiovascular de rãs-touro

O efeito hipertensor da injeção icv de L-NMMA em rãs é semelhante àquele obtidos em estudos com mamíferos (CABRERA e BOHR, 1995; TSENG, *et al.*, 1996; NURMINEN, *et al.*, 1997; MATSUMURA, *et al.*, 1998; SAKIMA, *et al.*, 1998; KRUKOFF, 1999), indicando que essa função moduladora da PA pelo NO encefálico pode ser uma característica comum dos vertebrados. Baseado apenas nos presentes dados não é possível afirmar o local preciso da atuação do NO no SNC de anfíbios para influenciar a PAM, mas podem ser sugeridas regiões semelhantes àquelas já descritas para mamíferos como NTS, PVN, VLM, SFO (KRUKOFF, 1999; CHEN *et al.*, 2001). Obviamente isso precisa ser investigado para se confirmar tais hipóteses.

A ausência de resposta bradicárdica reflexa quando do efeito pressórico causado pelo bloqueio da síntese do NO nas rãs do presente trabalho levanta a questão se o NO teria influência sobre a sensibilidade barorreflexa nesses animais. Pelo menos em mamíferos, alguns estudos que avaliaram a função barorreflexa durante hipertensão induzida pela inibição periférica da NOS, mostraram alguns resultados divergentes quanto à ação do NO sobre a função barorreflexa (SOUZA, *et al.*, 2001). Injeção intraperitoneal de L-NNA (bloqueador não seletivo de NOS) e 7-NI (bloqueador seletivo de NOS<sub>n</sub>) reduziu significativamente o platô inferior da curva barorreflexa FC/PAM (acentuou a bradicardia reflexa) em coelhos anestesiados e não anestesiados, indicando uma aumentada sensibilidade barorreflexa durante o bloqueio da NOS (LIU, *et al.*, 1996; MURAKAMI, *et al.*, 1998). Resultado semelhante foi observado em camundongos tratados cronicamente com L-NAME (PEOTTA, *et al.*, 2001).

No entanto, em outros estudos foi mostrada diminuição da sensibilidade barorreflexa pelo NO, o que foi evidenciado pelo aumento da atividade simpática associada à diminuição da sensibilidade barorreflexa causada pelo L-NAME (QUADRI, *et al.*, 1999; SOUZA, *et al.*, 2001; SOUZA, *et al.*, 2009). Camundongos knockout para NOSn (nNOS<sup>-/-</sup>) apresentam atenuação da bradicardia reflexa quando da injeção de fenilefrina em comparação com camundongos do tipo selvagem (CARVALHO, *et al.*, 2006). Adicionalmente, verificou-se que o sistema de sinalização NOS-cGMP está associado com áreas cardíacas vagais no bulbo ventrolateral de ratos atuando na função barorreflexa, contribuindo assim com a intensificação do tônus vagal cardíaco (FLETCHER, *et al.*, 2006). Nos anfíbios, pouco se sabe sobre o controle central da função barorreflexa. Sabe-se que a resposta reflexa taquicárdica causada pela administração de nitroprussiato de sódio é atenuada após lesão eletrolítica bilateral das porções caudal e comissural do NTS do sapo *Rhinella schneideri*, sugerindo que as aferências dos barorreceptores convergem para o NTS (BIANCHI-DA-SILVA, *et al.*, 2000). Tais aferências emergem de populações de barorreceptores localizados nas artérias pulmocutâneas, no labirinto carotídeo e no arco aórtico (MILLARD e MOALLI, 1980; ISHII, *et al.*, 1985; VAN VLIET e WEST, 1987a,b; BIANCHI-DA-SILVA, *et al.*, 2000; KUSAKABE, 2002).

As respostas pressóricas à infusão de L-NMMA no ventrículo lateral da rã-touro foram acompanhadas algumas vezes por comportamento exploratório do animal dentro da câmara experimental. A mesma alteração comportamental também é observada em lagartos teiú após injeção icv de L-NMMA (dados não publicados do nosso laboratório). Também em ratos, foi verificada ativação do reflexo de *grooming* após a administração de L-NAME no núcleo paraventricular (PVN; CRUZ e MACHADO, 2009). No entanto, Cruz e Machado (2009) descartaram a possibilidade de influência de tais respostas comportamentais sobre as variáveis hemodinâmicas avaliadas, pois as respostas pressórica e taquicárdica observadas por tais autores foram as mesmas observadas em estudos realizados em animais anestesiados (ZHANG *et al.*, 1997; ZHANG e PATEL, 1998). Em relação ao presente trabalho, a resposta pressórica ao bloqueio da síntese de NO encefálico sempre ocorreu antes do início do comportamento exploratório do animal, quando ocorrido. De qualquer forma, essa alteração comportamental, mesmo após a alteração da PA, induzida pelo L-NMMA parece indicar uma ação do NO em regiões envolvidas com controle de atividade motora somática.

## 5.2 Efeito do bloqueio encefálico da NOS associado com o antagonismo periférico de adrenorreceptores $\alpha 1$ sobre o sistema cardiovascular de rãs-touro

No presente estudo, a injeção periférica de antagonista de receptores  $\alpha 1$  adrenérgicos combinado com o bloqueio central da produção de NO atenuou a resposta pressórica das rãs significativamente, mas não a bloqueou completamente. Em nenhum dos tratamentos houve alteração da FC.

Em anfíbios, os vasos sanguíneos apresentam principalmente receptores alfa adrenérgicos, cuja estimulação causa vasoconstrição e conseqüentemente aumento de PAM (KIMMEL, 1992; BIANCHI-DA-SILVA, *et al.*, 2000), sendo a adrenalina o neurotransmissor liberado pelas terminações nervosas simpáticas e a noradrenalina a catecolamina circulante, ao contrário do que é observado nos mamíferos (AZUMA, *et al.*, 1965). Eriij e colaboradores (1965) demonstraram que a estimulação de receptores alfa nos vasos sanguíneos de rãs segue a seguinte ordem de potencialização: adrenalina > noradrenalina > fenilefrina > metoxamina. Tanto adrenalina, noradrenalina e fenilefrina são capazes de causar aumento da PAM por meio da estimulação de receptores alfa adrenérgicos em anfíbios (ERLIJ, *et al.*, 1965; KIRBY e BURNSTOCK, 1969; LILLO, 1979; HERMAN e SANDOVAL, 1983). No presente trabalho, o uso da fenilefrina como agonista alfa-1 adrenérgico confirmou o efeito vasoconstrictor evidenciado pelo aumento da PAM e queda na CVC, acompanhada de uma bradicardia reflexa, assim como foi verificado em outros estudos (HERMAN e MATA, 1985; HERMAN e SANDOVAL, 1983). Em contraste, Bianchi-da-Silva e colaboradores (2000) observaram aumento na PAM de maneira dose dependente com infusão intravenosa de fenilefrina em sapo cururu, sem correspondente efeito bradicárdico reflexo em doses mais elevadas. Estes resultados sugerem efeito cronotrópico e inotrópico positivo da fenilefrina sobre os receptores beta-cardíacos desses animais, assim como já foi evidenciado em estudos com coração isolado de rãs (ERLIJ, *et al.*, 1965; STANE-LARSEN, 1981).

O efeito sobre a PAM da fenilefrina associado ao do prazosin foi semelhante aos obtidos por Herman e Sandoval (1983) em rã touro. Estes autores usaram a fentolamina, um bloqueador de adrenorreceptores alfa não seletivo. Tanto prazosin (Figura 7) quanto a fentolamina (Herman e Sandoval, 1983) bloquearam parcialmente (em pelo menos 50%) o aumento da PAM causada pela injeção de fenilefrina e adrenalina, respectivamente. A resposta reflexa bradicárdica induzida pela fenilefrina (Figura 7) também foi atenuada pelo

prazosin, mas os resultados em relação ao bloqueio prévio com fentolamina sobre a bradicardia reflexa induzida pela fenilefrina não foi relatado por Herman e Sandoval (1983).

A inibição parcial da resposta pressora à fenilefrina pode indicar ausência de bloqueio total dos receptores alfa-1 adrenérgicos na dose de prazosin utilizada ( $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), visto que West e colaboradores (1998) obtiveram inibição quase total da resposta pressora induzida pela fenilefrina, utilizando bloqueio periférico prévio com fentolamina em uma dose bem alta ( $5,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ). O mesmo não foi verificado por Herman e Sandoval (1983), cuja dose de fentolamina utilizada foi de  $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ . No presente trabalho não foi possível a utilização de doses mais altas de prazosin devido à dificuldade desse fármaco em dissolver em solução salina (nesse caso, Ringer). Uma alternativa para poder aumentar a dose do prazosin seria dissolvê-lo em metanol, mas o metanol por si só induz vasodilatação (LI, *et al.*, 1998). Adicionalmente, como já mencionado acima, existe a possibilidade de que a resposta pressora remanescente da fenilefrina após o bloqueio com prazosin seja atribuída aos seus efeitos inotrópico e cronotrópico positivos via ativação dos receptores beta adrenérgicos da musculatura cardíaca (MORAD, *et al.*, 1981; STANE-LARSEN, 1981). Observou-se em preparação isolada do átrio de rã tratada com fenilefrina e epinina (agonista de receptores alfa e beta adrenérgicos, respectivamente) efeitos inotrópico e cronotrópico positivos, não sendo bloqueados pelo tratamento prévio com fentolamina, mas sim pela administração de propranolol, antagonista beta adrenérgico (SOUSTRE e RAKOTONIRINA, 1981; ASK, 1983). Também foi verificada a presença de receptores alfa 1 e alfa 2 no coração de anfíbios (HERMAN, *et al.*, 1996; AGGELI, *et al.*, 2002), sendo os alfa 1 funcionais e acoplados à hidrólise do fosfoinositol, o que sugere que esses receptores podem participar da sinalização de eventos que determinam a fisiologia cardíaca (AGGELI, *et al.*, 2002; LAZOU, *et al.*, 2002). O primeiro trabalho a caracterizar a presença de adrenorreceptores alfa 1 no coração de vertebrados basais mostrou que a afinidade desses receptores pelo prazosin é duas ordens de magnitude menor no coração de rã do que no de mamíferos (LAZOU, *et al.*, 2002), mas nenhuma informação a respeito dessa afinidade nos vasos sanguíneos foi relatada para esses animais. Assim, o aumento da PAM causada pela administração iv de fenilefrina observada após pré-tratamento iv com o antagonista alfa adrenérgico, prazosin, pode ser decorrente de sua atuação sobre receptores alfa e beta da musculatura cardíaca.

Foi observada redução na condutância vascular cutânea após injeção de fenilefrina, no entanto o bloqueio com prazosin não causou atenuação dessa queda de CVC. O método utilizado no presente trabalho leva em consideração uma pequena área de superfície cutânea para quantificação das alterações de fluxo sanguíneo pela metodologia Doppler. Isso não

exclui possíveis alterações de fluxo sanguíneo após o bloqueio com prazosin em outros leitos vasculares, como vasos de grande calibre, o que não puderam ser mensurados pela metodologia utilizada.

A área de estudo para as alterações de fluxo do presente trabalho foi a região pélvica ventral (conhecida como seat pach skin). No entanto, a pele da região dorsal da rã touro parece receber grande quantidade do suprimento sanguíneo proveniente da artéria pulmocutânea, o que caracterizaria esta área de superfície como predominantemente respiratória, já que os anfíbios apresentam a pele como órgão de trocas gasosas significativa (MOALLI, *et al.*, 1980; BURGGREN e MOALLI, 1984). Portanto, parece existir uma alteração na perfusão sanguínea da rã touro quando exposta ao ar, que poderia reduzir a perda de água evaporativa (BURGGREN e MOALLI, 1984), uma resposta possivelmente endógena e responsável por caracterizar elevados valores de PAM observados durante o inverno, mesmo mantendo-se o animal a mesma temperatura, como já foi relatado (ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999). Distúrbios ácido-base parecem ser bem tolerados pelos anfíbios, pois a acidose hipercápnica (elevada  $\text{PaCO}_2$ ) pode ser uma consequência natural durante o inverno (BOUTILIER, *et al.*, 1979; ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999). No entanto, Moalli e colaboradores (1980) relataram a possível existência de perfusão sanguínea regional da pele da rã touro, que tem contribuição da circulação sistêmica e pulmocutânea, um mecanismo dependente de um controle autonômico (WANG, *et al.*, 1999). Possivelmente, o controle da perfusão sanguínea da pele da região pélvica ventral de anfíbios tem grande influência neural  $\beta$  e não  $\alpha$  adrenérgica, já que sapos submetidos à privação de água, quando colocados em contato com a mesma novamente apresentam rápido aumento na perfusão sanguínea na região pélvica (VIBORG e ROSENKINDE, 2004; VIBORG e HILLYARD, 2005; VIBORG, *et al.*, 2006). Este aumento de fluxo e consequente absorção de água foram mimetizados por injeções do agonista beta adrenérgico, isoproterenol e também bloqueados com antagonista beta adrenérgico, propranolol, indicando a ocorrência de um mecanismo neural para o controle beta adrenérgico (VIBORG e ROSENKINDE, 2004). Assim, os elevados valores de CVC durante o inverno pode ser uma resposta característica da região pélvica da pele do animal para viabilizar a absorção de água. Simultaneamente pode existir um aumento da vasoconstrição das regiões dorsal e lateral da pele, regiões cujo suprimento sanguíneo da artéria pulmocutânea é maior (BURGGREN e MOALLI, 1984), mas que não foram avaliados

no presente estudo. O mecanismo neural beta adrenérgico associado a atuação do NO no SNC será discutido com maiores detalhes posteriormente.

O efeito pressórico observado após bloqueio da síntese de NO encefálico parece ocorrer parcialmente como resultado do aumento da atividade nervosa simpática para a vasculatura, sendo que, a resposta pressora remanescente após bloqueio com prazosin pode indicar participação hormonal. Isso é corroborado pela inibição também parcial pelo hexametônio, um bloqueador ganglionar, do efeito pressor do L-NMMA. Desta forma, o NO encefálico poderia modular duas vias de sinalização, uma endócrina e outra nervosa simpática, para exercer seu efeito sobre a PA em anfíbios. Pelo menos em mamíferos, tal hipótese parece ser confirmada. Há dados sugerindo que a resposta pressora a infusões icv de L-NAME em ratos é mediada pela combinação da atividade nervosa simpática e de efeitos humorais, tal como o sistema renina-angiotensina, visto que a resposta pressora tardia observada após o bloqueio da NOS central foi inibida por um antagonista de receptores para angiotensina II (MORIGUCHI, *et al.*, 1998). Ainda em mamíferos, foi demonstrada a atuação do NO como inibidor central da produção de arginina vasopressina (AVP), mantendo assim a PAM nos valores basais (LIU, *et al.*, 1998). Em relação aos anfíbios, existe uma alta densidade de fibras vasotocinérgicas (VOSEL-DAENINCK, *et al.*, 1981; MATHIESON, 1996) e um denso acúmulo de RNAm para receptores de arginina vasotocina (AVT: hormônio homólogo e análogo à AVP de mamíferos) em vários tecidos, incluído o SNC, mais especificamente áreas hipotalâmicas (KOHNO, *et al.*, 2003; ACHARJEE, *et al.*, 2004; HASUNUMA, *et al.*, 2007). Injeção icv de AVT em rãs da espécie *Hyla japonica* foi capaz de ativar mecanismos celulares via receptores V1 e não V2 no SNC, e conseqüentemente estimular respostas de absorção de água e ganho de peso (MAEJIMA, *et al.*, 2008). Quanto ao sistema renina-angiotensina periférico em anfíbios, este desempenha uma importante função em respostas iniciais à hipotensão em anuros e que pode estar relacionada a situações de hemorragia ou desidratação (WEST, *et al.*, 1998). Além disso, ANG-II teria uma importante função no SNC capaz de estimular o comportamento de resposta de absorção de água em sapos da espécie *Scaphiopus couchii* (PROPPER e JOHNSON, 1994; PROPPER, *et al.*, 1995). Assim, o bloqueio da NOS encefálica no presente estudo também poderia estar envolvido na produção e liberação de AVT, bem como na mediação do sistema renina-angiotensina no SNC, visto que a injeção de L-NMMA foi realizada no ventrículo lateral e, sendo observado seu espalhamento por todo o sistema ventricular encefálico, inclusive áreas hipotalâmicas.

### 5.3 Efeito do bloqueio encefálico da NOS associado com o bloqueio periférico de adrenorreceptores $\beta$ sobre o sistema cardiovascular de rãs-touro

O bloqueio central da NOS combinado com o antagonismo periférico dos receptores beta adrenérgicos acentuou significativamente o efeito pressor do bloqueio da síntese de NO. O aumento significativo de fluxo vascular cutâneo após injeção iv do agonista beta adrenérgico (Fig. 9) indica ação vasodilatadora de tais receptores em rãs. Essa ação parece estar envolvida principalmente no controle da absorção de água, visto que a infusão de um antagonista beta foi demonstrada causar queda na perfusão sanguínea de sapos (VIBORG e ROSENKINDE, 2004; VIBORG e HILLYARD, 2005; VIBORG, *et al.*, 2006). Em contrapartida, Malvin e Riedel (1990) encontraram um pequeno aumento na perfusão sanguínea após infusão de agonista beta em rã-touro (< 10%), o qual foi antagonizado pelo propranolol. É importante ressaltar que estes autores utilizaram preparações isoladas da pele lateral e dorsal do anfíbio, e que estudos *in vivo* mostram que a região pélvica desses animais é muito importante na regulação osmótica cutânea, sugerindo uma regulação neural de curto prazo (VIBORG, *et al.*, 2006; VIBORG e ROSENKINDE, 2004; VIBORG e HILLYARD, 2005). Outros estudos sugerem inexistência de vasodilatação mediada por receptores beta adrenérgicos *in vivo*, até mesmo em doses muito acima das utilizadas no presente estudo (ERLIJ, *et al.*, 1965; HERMAN e SANDOVAL, 1983). Porém, estes estudos não realizaram uma comparação entre as alterações de pressão causadas pelo bloqueio versus a estimulação beta adrenérgica e não apresentavam dados de CVC ou mesmo de perfusão sanguínea relativa durante a estimulação ou o bloqueio beta adrenérgico.

Estudos anteriores mostraram que a vasodilatação mediada pelos beta adrenorreceptores pode ter um componente dependente do endotélio em várias espécies (Revisado por Xu, *et al.*, 2000). Xu e colaboradores (2000) mostraram que a estimulação beta adrenérgica, via elevação da concentração de AMP cíclico, é responsável por ativar o sistema L-arginina/NO na artéria femoral de coelhos, e que a geração de NO contribui de forma importante com as alterações no tônus vascular induzidas por agentes que modulam os beta adrenorreceptores. Estudos recentes mostram que a produção de NO em vasos de grande calibre como as artérias sistêmicas e pulmonares, e mesmo as artérias de resistência mesentéricas em anfíbios, é mediada por nervos nitrérgicos ao invés do endotélio

(BROUGHTON e DONALD, 2002; 2005; JENNINGS e DONALD, 2008; JENNINGS e DONALD, 2010). Assim, o maior aumento na PAM após o bloqueio da síntese de NO encefálico e do antagonismo dos receptores beta adrenérgicos periféricos em ambas as estações (Figura 8) parece indicar aumento da descarga simpática para os vasos, com ação vasoconstritora (via receptores alfa), associado à inibição da ocorrência de uma compensação vasodilatadora (via receptores beta). Essa compensação vasodilatadora estaria ocorrendo durante o bloqueio encefálico de NO sozinho, o que impediria um grande aumento na PAM.

O beta agonista isoproterenol aumentou a FC em ambas as estações avaliadas no presente trabalho, assim como também foi verificado em outros trabalhos *in vivo* e *in vitro* com anfíbios (HERMAN e SANDOVAL, 1983; HERMAN e MATA, 1985). Em relação ao antagonista beta adrenérgico, sotalol, a dose utilizada nos experimentos ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), não foi suficiente para induzir queda significativa da FC, ao contrário do observado com a utilização do beta antagonista propranolol na dose de  $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  por Herman e Sandoval (1983). Testes iniciais com uma dose de  $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sotalol causaram quedas evidentes na FC (dados não apresentados), mas a dose utilizada foi escolhida por ser suficiente para causar bloqueio do efeito do agonista, o isoproterenol ( $10 \text{ ug.kg}^{-1}$ ; Figura 9). Outros autores, também utilizando sotalol, verificaram a existência de um tônus beta adrenérgico ativo sobre o coração de anfíbios já nas primeiras 22 horas após os primeiros batimentos cardíacos (2–3 dias após a fertilização) (JACOBSSON e FRITSCHÉ, 1999).

#### 5.4 Variação sazonal das variáveis cardiovasculares de rã-touro

É importante ressaltar que os anfíbios apresentam uma alta dependência das condições ambientais, principalmente aquelas relacionadas a umidade e temperatura, para a manutenção das suas atividades metabólicas. Desta forma, muitas espécies sofrem alterações sazonais de vários parâmetros fisiológicos, incluindo os cardiovasculares (PINDER *et al.*, 1992; GLASS *et al.*, 1997; ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999; BÍCEGO-NAHAS *et al.*, 2001). Os resultados das variáveis cardiovasculares de repouso do presente trabalho (Tabela 2) corroboram dados de estudos anteriores no mesmo animal. A rã-touro, mesmo mantida a mesma temperatura ambiente apresenta variação sazonal da PAM, com valores maiores durante o inverno em relação ao verão e à primavera, sem diferenças na FC

(ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999). Essas diferenças, associadas ao fato de que a rã-touro apresenta elevada PaCO<sub>2</sub> durante o inverno (ROCHA; BRANCO, 1998; BÍCEGO-NAHAS; BRANCO, 1999), são sugestivas de um aumento na vasoconstrição periférica. Com o presente estudo não foi possível confirmar tal hipótese, pois observamos maiores valores absolutos de CVC durante o inverno, ou seja, uma elevada vasodilatação, em relação a primavera/verão (tabela 2). Vale destacar novamente que as medidas de CVC foram realizadas em uma pequena porção da pele da região pélvica ventral do animal, o que não descarta alterações diferentes de fluxo em outros leitos vasculares.

A maioria dos anfíbios não ingere água oralmente, ao invés disso, absorve água osmoticamente através da região posteroventral altamente vascularizada da pele, chamada “seat patch skin”, ajustando sua postura sobre o substrato úmido, um comportamento conhecido como “resposta de absorção de água” (revisado por HILLYARD, *et al.* 1998). Desta maneira, os elevados valores de CVC que encontramos durante o inverno na região pélvica das rãs, são instigantes, pois coincidem com a estação do ano caracterizada pelas menores umidade relativa e precipitação pluvial (tabela 1), mesmo que no laboratório o animal estivesse sempre com livre acesso à água. Segundo Viborg e Rosenkilde (2004) existe um controle neural vasodilatador sobre os receptores beta adrenérgicos da região pélvica ventral de sapos. Nas rãs do presente estudo, a maior CVC na região pélvica durante o inverno poderia explicar o menor efeito do agonista beta, isoproterenol, em aumentar ainda mais a CVC de um leito já vasodilatado, comparado com primavera/verão (Figura 9).

Os dados do presente trabalho indicam que o NO produzido no SNC parece ter papel importante na manutenção da pressão arterial e na regulação do tônus não apenas constrictor, mas também dilatador da vascularização cutânea, órgão fundamental para trocas gasosas, iônicas e conseqüentemente de fluídos pelos anfíbios (BURGGREN e MOALLI, 1984; EHRENFELD e KLEIN, 1997; BURGGREN e VITALIS, 2005).

## **6 CONCLUSÃO**

A partir dos resultados do presente estudo podemos chegar às seguintes conclusões:

- 1) O NO atuando no sistema nervoso central de rãs-touro parece ser importante na manutenção da PA, independente da estação do ano, via inibição, pelo menos parcial, da atividade simpática vasoconstritora.
- 2) O efeito simpatoinibidor do NO no SNC parece ser mediado por receptores alfa-adrenérgicos periféricos vasoconstritores.
- 3) O tônus hipotensor do NO no SNC parece ser modulado por receptores beta adrenérgicos periféricos vasodilatadores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ACHARJEE, S.; DO-REGO, J. L.; OH, D. Y.; MOON, J. S.; AHN, R. S.; LEE, K.; BAI, D. G.; VAUDRY, H.; KWON, H. B.; SEONG, J. Y. Molecular cloning, pharmacological characterization, and histochemical distribution of frog vasotocin and mesotocin receptors. **J Mol Endocrinol**, Bristol, v. 33, n. 1, p. 293-313, 2004.

ADINSTRUMENTS. Wireless Animal Monitoring. Disponível em: <[http://www.adinstruments.com/downloads/brochures\\_md/Telemetry\\_11web.pdf](http://www.adinstruments.com/downloads/brochures_md/Telemetry_11web.pdf)> . Acesso em 11 out 2011.

AGGELI, I. K.; GAITANAKI, C.; LAZOU, A.; BEIS, I. Alpha (1)- and beta-adrenoceptor stimulation differentially activate p38-MAPK and atrial natriuretic peptide production in the perfused amphibian heart. **J Exp Biol**, London, v. 205, n. Pt 16, p. 2387-2397, 2002.

ALTIMIRAS, J.; FRANKLIN, C.E.; AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. **J Exp Biol**, London, v. 201, n. Pt15, p. 2235–2242, 1998.

ASK, J. A. Comparative aspects of adrenergic receptors in the hearts of lower vertebrates. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol**, Oxford, v. 76, n. 3, p. 543-552, 1983.

AUDIGANE, L.; KERFANT, B. G.; E. L.; HARCHI, A.; LORENZEN-SCHMIDT, I.; TOUMANIANTZ, G.; CANTEREAU, A.; POTREAU, D.; CHARPENTIER, F.; NOIREAUD, J.; GAUTHIER, C. Rabbit, a relevant model for the study of cardiac beta 3-adrenoceptors. **Exp Physiol**, Cambridge, v. 94, n. 4, p. 400-411, 2009.

AXELSSON, M.; OLSSON, C.; GIBBINS, I.; HOLMGREN, P. Nitric oxide, a potent vasodilator of the aortic anastomosis in the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. **Gen Comp Endocrinol**, New York, v. 122, n. 2, p. 198-204, 2001.

AZUMA, T.; BINIA, A.; VISSCHER, M. B. Adrenergic mechanisms in the bullfrog and turtle. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 209, n. 6, p. 1287-94, 1965.

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**, Amsterdam, v. 80, n. 1-2, p. 31-39, 2000.

BÍCEGO-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**, New York, v. 289, n. 6, p. 359-365, 2001.

BÍCEGO-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**, New York, v. 124, n. 2, p. 221-229, 1999.

BOUTILIER, R. G.; RANDALL, D. J.; SHELTON, G.; TOEWS, D. P. Acid-base relationships in the blood of the toad, *Bufo marinus*. III. The effects of burrowing. **J Exp Biol**, London, v. 82, p. 357-365, 1979

BRAMICH, N. J.; EDWARDS, F. R.; HIRST, G. D. Sympathetic nerve stimulation and applied transmitters on the sinus venosus of the toad. **J Physiol**, London, v. 429, n. 1, p. 349-75, 1990.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E. O.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, London, v. 351, n. 6329, p. 714-718, 1991.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase. a calmodulin requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 87, n. 2, p. 682-685, 1990.

BROUGHTON, B. R. S., DONALD, J.A. Nitric oxide control of large veins in the Toad *Bufo marinus*. **J Comp Physiol B**, Berlin, v. 175, n. 3, p. 157-166. 2005.

BROUGHTON, B.R.S.; DONALD, J. A. Nitric oxide regulation of the central aortae of the toad *Bufo marinus* occurs independently of the endothelium. **J Exp Biol**, London, v. 205, n. pt 19, p. 3093-3100, 2002.

BRÜNING, G.; MAYER, B. Localization of nitric oxide synthase in the brain of the frog, *Xenopus laevis*. **Brain Res**, Amsterdam, v. 741, n. 1-2, p. 331-343, 1996.

BURGGREN, W. W.; VITALIS, T. Z. The interplay of cutaneous water loss, gas exchange and blood flow in the toad, *Bufo woodhousei*: adaptations in a terrestrially adapted amphibian. **J Exp Biol**, London, v. 208, n. Pt 1, p. 105-112, 2005.

BURGGREN, W.; MOALLI, R. 'Active' regulation of cutaneous gas exchange by capillary recruitment in amphibians: Experimental evidence and revised model for skin respiration. **Respir Physiol**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 379-392, 1984.

CABRERA, C.; BOHR, D. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 206, n. 1, p. 77–81, 1995.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, Baltimore, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

CARVALHO, T. H.; LOPES, O. U.; TOLENTINO-SILVA, F. R. Baroreflex responses in neuronal nitric oxide synthase knockout mice (nNOS). **Auton Neurosci**, Amsterdam, v. 126-127, p. 163-168, 2006.

CHEN, S.Y., MAO, S.P., CHAI, C.Y. Role of nitric oxide on pressor mechanisms within the dorsomedial and rostral ventrolateral medulla in anaesthetized cats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 155-163, 2001.

COLOMBARI, E., BONAGAMBA, L.G.H., MACHADO, B.H. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 266, n. 35, p. R730-R738, 1994.

CRUZ, J. C.; MACHADO, B. H. GABA and nitric oxide in the PVN are involved in arterial pressure control but not in the chemoreflex responses in rats. **Auton Neurosci**, Amsterdam, v. 146, n. 1-2, p. 47-55, 2009.

CZOPEK J. Quantitative studies on the morphology of respiratory surfaces in amphibians. **Acta Anat**, Basel, v. 62, n. 2, p. 296-323, 1965.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci**, Baltimore, v. 14, n. 9, p. 5147–5159, 1994.

DE PAULA, D.; STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rat. **Physiol Behav**, New York, v. 70, n. 5, p. 505–511, 2000.

DONALD, J.A.; BROUGHTON, B. R. S. Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, New York, v. 142, n. 2, p. 188–197, 2005.

DONKELAAR, H. J. T. **Anurans**. In: NIEWENHUYIS, R. (Org). The central nervous system of vertebrates: Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1998. p. 1151-1314.

DUN, N. J.; DUN, S. L.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pontine medullary neurons. **Neuroscience**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 429-445, 1994.

EHRENFELD, J.; KLEIN, U. The key role of the H<sup>+</sup> V-ATPase in acid-base balance and Na<sup>+</sup> transport processes in frog skin. **J Exp Biol**, London, v. 200, n. Pt 2, p. 247-256, 1997.

EME, J.; HICKS, J. W.; CROSSLEY, D. A. 2nd. Chronic hypoxic incubation blunts a cardiovascular reflex loop in embryonic American alligator (*Alligator mississippiensis*). **J Comp Physiol B**, Berlin, v. 181, n. 7, p. 981-990, 2011.

ERLIJ, D.; CETRANGOLO, R.; VALADEZ, R. Adrenotropic receptors in the frog. **J Pharmacol Exp Ther**, Bethesda, v. 149, p. 65-70, 1965.

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁVIAS E VETERINÁRIAS. **Estação Agroclimatológica**. Disponível em:

[http://www.exatas.fcav.unesp.br/estacao/est\\_tab\\_meteor\\_01\\_02.htm](http://www.exatas.fcav.unesp.br/estacao/est_tab_meteor_01_02.htm). Acesso em: 03 fev. 2012.

FENG, J.; YANO, K.; MONAHAN-EARLEY, R.; MORGAN, E. S.; DVORAK, A. M.; SELLKE, F. W.; AIRD, W. C. Vascular bed-specific endothelium-dependent vasomotor relaxation in the hagfish, *Myxine glutinosa*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 293, n. 2, p. R894-R900, 2007.

FLETCHER, J.; MOODY, W. E.; CHOWDHARY, S.; COOTE, J. H. NO-cGMP pathway at ventrolateral medullary cardiac inhibitory sites enhances the baroreceptorreflex bradycardia in the rat. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1123, n. 1, p. 125-134, 2006.

FRITSCHKE, R.; SCHWERTE, T.; PELSTER, B. Nitric oxide and vascular reactivity in developing zebrafish, *Danio rerio*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 279, n. 6, p. R2200-R2207, 2000.

FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: Discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Biosci Rep**, New York, v. 19, n.4, p. 235-251, 1999.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, London, v. 288, n. 5789, p. 373- 376. 1980.

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**, Bethesda, v. 281, n. 1, p. R338-R345, 2001.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric Oxide signaling in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, Palo Alto, v. 57, p. 683-706, 1995.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, London, v. 336, n. 6197, p. 385 – 388, 1988.

GAUTHIER, C.; ROZEC, B.; MANOURY, B.; BALLIGAND, J. L. Beta-3 adrenoceptors as new therapeutic targets for cardiovascular pathologies. **Curr Heart Fail Rep**, Philadelphia, v. 8, n. 3, p. 184-192, 2011.

GENTZ, E. J. Medicine and Surgery of Amphibians. **ILAR J**, Washington, v. 48, n. 3, p. 255-259, 2007.

GIBBINS, I. **Comparative anatomy and evolution of the autonomic nervous system**. In: NILSON, S.; HOLMGREN, S (Orgs). *Comparative Physiology and Evolution of the Autonomic Nervous System*: Chur, Switzerland: Howard, 1994, p. 1–68.

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**, New York, v. 279, n. 4, p. 330-336, 1997.

GREEN, D.J.; MAIORANA, A.J.; SIONG, J.H.J.; BURKE, V.; ERICKSON, M.; MINSON, C.T., BILSBOROUGH W, O'DRISCOLL G. Impaired skin blood flow response to environmental heating in chronic heart failure. **Eur Heart J**, London, v. 27, n. 3, p. 338–343, 2006.

GUERRA, A.R.G., GARGAGLIONI, L.H, SOUZA, C.R.N., ABE, A.S., BRANCO, L.G.S., BÍCEGO, K.C. Role of central nitric oxide in behavioral thermoregulation of toads during hypoxia. **Physiol Behav**, New York, v. 95, n. 1-2, p. 101–107, 2008.

HASEGAWA, K.; NISHIMURA, H. Humoral factor mediates acetylcholine - induced endothelium-dependent relaxation of chicken aorta. **Gen Comp Endocrinol**, New York, v. 84, n. 1, p. 164–169. 1991.

HASUNUMA, I.; SAKAI, T.; NAKADA, T.; TOYODA, F.; NAMIKI, H.; KIKUYAMA, S. Molecular cloning of three types of arginine vasotocin receptor in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. **Gen. Comp. Endocrinol**, New York, v. 151, n. 3, p. 252–258, 2007.

HEDRICK, M.S.; MORALES, R.D.; PARKER, J.M.; PACHECO, L.H. Nitric oxide modulates respiratory-related neural activity in the isolated brainstem of the bullfrog. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 81-84, 1998.

HERMAN, C. A.; LUCZY, G.; WIKBERG, J. E.; UHLÉN, S. Characterization of adrenoceptor types and subtypes in American bullfrogs acclimated to warm or cold temperature. **Gen Comp Endocrinol**, New York, v. 104, n. 2, p. 168-178, 1996.

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**, New York, v. 59, n. 3, p. 434–441, 1985.

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

HILLYARD, S. D.; HOFF, K. S.; PROPPER, C. The water absorption response: a behavioral assay for physiological processes in terrestrial amphibians. **Physiol Zool.**, v. 71, n. 2, p. 127-138, 1998.

HOFFMANN, A.; ROMERO, S.M. Effect of the dry-cold season dormancy on the tonic and phasic neural control of heart rate in the toad, *Bufo paracnemis*. **J Exp Zool**, New York, v. 287, n. 1, p.15-20, 2000.

HOSOYA, Y.; SUGIURA, Y.; OKADO, N.; LOEWY, A. D.; KOHNO, K. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. **Exp Brain Res**, Berlin, v. 85, n. 1, p. 10-20, 1991.

HOYLE, C. H.; BURNSTOCK, G. Evidence that ATP is a neurotransmitter in the frog heart. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 285-289, 1986.

HUYNH, P.; BOYD, S. K. Nitric oxide synthase and NADPH diaphorase distribution in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) CNS: pathways and functional implications. **Brain Behav Evol**. v. 70, n. 3, p. 145-163, 2007.

IADECOLA, C.; FARIS, P. L.; HARTMAN, B. K.; XU, X. Localization of NADPH diaphorase in neurons of the rostral ventral medulla: possible role of nitric oxide in central autonomic regulation and oxygen chemoreception. **Brain Res**, Amsterdam, v. 603, n. 1, p. 173-179, 1993.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S., BYRNS, R. E, CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.

ISHII, K.; ISHII, K, KUSAKABE, T. Chemo- and baroreceptor innervation of the aortic trunk of the toad *Bufo vulgaris*. **Respir Physiol**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 365–375, 1985.

JACOBSSON, A.; FRITSCHKE, R. Development of adrenergic and cholinergic cardiac control in larvae of the African clawed frog *Xenopus laevis*. **Physiol Biochem Zool**, Chicago, v. 72, n. 3, p. 328-338, 1999.

JENNINGS, B. L., DONALD, J. A. Neurally-derived nitric oxide regulates vascular tone in pulmonary and cutaneous arteries of the toad, *Bufo marinus*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 295, n. 5, p. R1640–R1646, 2008.

JENNINGS, B. L.; DONALD, J. A. Mechanisms of nitric oxide-mediated, neurogenic vasodilation in mesenteric resistance arteries of toad *Bufo marinus*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 298, n. 3, p. R767-R775, 2010.

KIMMEL, P.B. Adrenergic receptors and the regulation of vascular resistance in bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). **J Comp Physiol B**, Berlin, v. 162, n. 5, p. 455-462, 1992.

KIRBY, S.; BURNSTOCK, G. Pharmacological studies of the cardiovascular system in the anaesthetized sleepy lizard (*Tiliqua rugosa*) and toad (*Bufo marinus*). **Comp Biochem Physiol**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 321-331, 1969.

KNIGHT, G.E.; BURNSTOCK, G. The involvement of the endothelium in the relaxation of the leopard frog (*Rana pipiens*) aorta in response to acetylcholine. **Br J Pharmacol**, London, v. 118, n. 6, p. 1518-1522, 1996.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 86, n. 13, p. 5159-5162, 1989.

KOHNO, S.; KAMISHIMA, Y.; IGUCHI, T. Molecular cloning of an anuran V2 type [Arg8] vasotocin receptor and mesotocin receptor: functional characterization and tissue expression in the Japanese treefrog (*Hyla japonica*). **Gen Comp Endocrinol**, New York, v. 132, n. 3, p. 485–498, 2003.

KRUKOFF, T. L. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic function. **Brain Res Rev**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 52-65, 1999.

KUSAKABE, T. Carotid labyrinth of amphibians. **Microsc Res Tech**, New York, v. 59, n. 3, p. 207-226, 2002.

LANGER, S. Z., HICKS, P. E. Alpha-adrenoreceptor subtypes in blood vessels: physiology and pharmacology. **J Cardiovasc Pharmacol**, New York, v. 6, Suppl 4, p. S547-S558, 1984

LÁZÁR, G.; LOSONCZY, A. NADPH-diaphorase-positive neurons and pathways in the brain of the frog *Rana esculenta*. **Anat Embryol**, Berlin, v. 199, n. 2, p. 185-198, 1999.

LAZOU, A.; GAITANAKI, C.; VAXEVANELIS, S.; PEHTELIDOU, A. Identification of alpha1-adrenergic receptors and their involvement in phosphoinositide hydrolysis in the frog heart. **J Exp Zool**. v. 293, n. 2, p. 99-105, 2002.

LI, W.; ALTURA, B. T.; ALTURA, B. M. Differential effects of methanol on rat aortic smooth muscle. **Alcohol**, New York, v. 16, n. 3, p. 221-229, 1998.

LILLO, R. S. Autonomic cardiovascular control during submergence and emergence in bullfrogs. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 237, n. 3, p. R210-R216, 1979.

LIMA, S.L.; COSTA, C.L.S.; AGOSTINHO, C.A.; ANDRADE, D. R.; PARAIRA FILHO, H. P.. Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.27, n.3, p.416-420, 1998.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. **SAS For Linear Models**. 4. ed. Fourth edition, Cary NC: SAS Institute Inc, 2002. 496p

LIU, H.; TERRELL, M. L.; BUI, V.; SUMMY-LONG, J. Y.; KADEKARO, M. Nitric oxide control of drinking, vasopressin and oxytocin release and blood pressure in dehydrated rats. **Physiol Behav**, New York, v. 63, n. 5, p. 763-769, 1998.

LIU, J. L.; MURAKAMI, H.; ZUCKER, I. H. Effects of NO on baroreflex control of heart rate and renal nerve activity in conscious rabbits. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1361-R1370, 1996.

LUTZ, C. G.; AVERY, J. L. Bullfrog culture. Southern Regional Aquaculture. Center. **SRAC**. n. 436, 1999

MAEJIMA, S.; YAMADA, T.; HAMADA, T.; MATSUDA, K.; UCHIYAMA, M. Effects of hypertonic stimuli and arginine vasotocin (AVT) on water absorption response in Japanese treefrog, *Hyla japonica*. **Gen Comp Endocrinol**, New York, v. 157, n. 2, p. 196-202, 2008.

MALVIN, G. M.; RIEDEL, C. Autonomic regulation of cutaneous vascular resistance in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **J Exp Biol**, London, v. 152, n. 1, p. 425-439, 1990.

MARTINEZ-LEMUS, L.A.; HESTER, R.K.; BECKER, E.J.; JEFFREY, J.S.; ODOM, T.W. Pulmonary artery endothelium-dependent vasodilation is impaired in a chicken model of pulmonary hypertension. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 277, n. 1, p. R190–R197, 1999

MATHIESON, W. B. Development of arginine vasotocin innervation in two species of anuran amphibian: *Rana catesbeiana* and *Rana sylvatica*. **Histochem Cell Biol**, Berlin, v. 105, n. 4, p. 305-318, 1996.

MATSUMURA, K.; TSUCHIHASHI, T.; KAGIYAMA, S.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats, **Brain Res**, Amsterdam, v. 798, n. 1-2, p. 232-238, 1998.

MAZZA, R.; ANGELONE, T.; PASQUA, T.; GATTUSO A. Physiological evidence for  $\beta$ 3-adrenoceptor in frog (*Rana esculenta*) heart. **Gen Comp Endocrinol**, New York, v. 169, n. 2, p. 151-157, 2010.

MILLARD, R. W.; MOALLI, R. Baroreflex sensitivity in an amphibian, *Rana catesbeiana*, and a reptilian, *Pseudemys scripta elegans*. **J Exp Zool**, New York, v. 213, n. 2, p. 283-8, 1980.

MINSON, C. T.; HOLOWATZ, L. A.; WONG, B. J.; KENNEY, W. L.; WILKINS, B. W. Decreased nitric oxide- and axon reflex-mediated cutaneous vasodilation with age during local heating. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 93, n. 5, p. 1644-1649, 2002.

MIYAGAWA, A.; OKAMURA, H.; IBATA, Y. Coexistence of oxytocin and NADPH-diaphorase in magnocellular neurons of the paraventricular and the supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 171, n. 1-2, p. 13-16, 1994.

MIZUKAWA, K.; VINCENT, S. R.; MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. **J Comp Neurol**, New York, v. 279, n. 2, p. 281-311, 1989.

MOALLI, R.; MEYERS, R. S.; JACKSON, D. C.; MILLARD, R. W. Skin circulation of the frog, *Rana catesbeiana*: distribution and dynamics. **Respir Physiol**, Netherlands, v. 40, n. 2, p. 137-148, 1980.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A.. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Ver**, Baltimor, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORAD, M.; SANDERS, C.; WEISS J. The inotropic actions of adrenaline on frog ventricular muscle: relaxing versus potentiating effects. **J Physiol**, Oxford, v. 311, p. 585-604, 1981.

MORIGUCHI, S.; OHZURU, N.; KOGA, N.; HONDA, K.; SAITO, R.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Central administration of a nitric oxide synthase inhibitor causes pressor responses via the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in Wistar rats. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 245, n. 2, p. 109-112, 1998.

MUÑOZ, M.; MUÑOZ, A.; MARÍN, O.; ALONSO, J. R.; ARÉVALO, R.; PORTEROS, A.; GONZÁLEZ, A. Topographical distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezii*. **J Comp Neurol**, Philadelphia, v. 367, n. 1, p. 54-69, 1996.

MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 32, n. 11, p. 17-27, 1999.

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**, Bethesda, v. 274, n. 1 Pt 2, p. R181-R186, 1998.

MUSTAFA, T.; AGNISOLA, C. Vasoactivity of adenosine in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) coronary system: involvement of nitric oxide and interaction with noradrenaline. **J Exp Biol**, London, v. 201, n. Pt 22, p. 3075-3083, 1998.

NEWCOMB, J. M.; WATSON, W. H 3rd. Modulation of swimming in the gastropod *Melibe leonina* by nitric oxide. **J Exp Biol**, London, v. 205, n. Pt 3, p. 397-403. 2002.

NGUYEN, L.S.; VILLABLANCA, A.C.; RUTLEDGE, J.C. Substance P increases microvascular permeability via nitric oxide-mediated convective pathway. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 268, n. 4 Pt 2, p. R1060-R1068, 1995.

NISHIMURA, M.; TAKAHASHI, H.; NANBU, A.; SAKAMOTO, M.; YOSHIMURA, M. Cardiovascular regulation by L-arginine in the brain of rats: role of the brain renin-angiotensin system and nitric oxide. **Am J Hypertens**, New York, n. 4 Pt 1, p. 389-396, 1997.

NURMINEN, M. L.; YLIKORKALA, A.; VAPAATALO, H. Central inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure and heart rate in anesthetized rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, New York, v. 19, n. 1, p. 35-41, 1997.

OHTA, A.; TAKAGI, H.; MATSUI, T.; HAMAI, Y.; IIDA, S.; ESUMI, H. Localization of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the solitary nucleus and ventrolateral medulla oblongata of the rat: their relation to catecholaminergic neurons. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 158, n. 1, p. 33-35, 1993.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, London, v. 327, n. 6122, p. 524-526. 1987.

PELLEGRINO, D.; SPROVIERI, E.; MAZZA, R.; RANDALL, D. J.; TOTA, B. Nitric oxide cGMP-mediated vasoconstriction and effects of acetylcholine in the branchial circulation of the eel. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, New York, v. 132A, n. 2, p. 447-457, 2002.

PEOTTA, V. A.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. **Hypertension**, Dallas, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 555-559, 2001.

PINDER, A. W., STOREY, K. B. AND ULTSCH, G. R. **Estivation and hibernation**. In: FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. (Orgs). *Environmental Physiology of the Amphibians*: Chicago: University of Chicago, 1992, p. 250-274.

PROPPER, C. R.; HILLYARD, S. D.; JOHNSON, W. E. Central angiotensin II induces thirst-related responses in an amphibian. **Horm Behav**, New York, v. 29, n. 1, p 74-84, 1995.

PROPPER, C. R.; JOHNSON, W. E. Angiotensin II induces water absorption behavior in two species of desert anurans. **Horm Behav**, New York, v. 28, n. 1, p. 41-52, 1994.

QADRI, F.; CARRETERO, O. A.; SCICLI, A. G. Centrally produced neuronal nitric oxide in the control of baroreceptor reflex sensitivity and blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Jpn J Pharmacol**, Kyoto, v. 81, n. 3, p. 279-285, 1999.

RANSON, R. N.; MOTAWEL, K.; PYNER, S.; COOTE, J. H. The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion. **Exp Brain Res**, Berlin, v. 120, n. 2, p. 164-172, 1998.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ. Res**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 352-357, 1983.

REA, M.S.; BAUBY, H.; BABAR, S.; PARSONS, R.H. Effects of nitric oxide and angiotensin II and their interaction on water uptake in *Rana catesbeiana*. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, New York, v. 131, n. 2, p. 457-466, 2002.

REA, M.S.; PARSONS, R.H. Evidence of nitric oxide and angiotensin II regulation of circulation and cutaneous drinking in *Bufo marinus*. **Physiol Biochem Zool**, Chicago, v. 74, n. 1, p. 127-133, 2001.

ROCHA, P. L.; BRANCO, L.G. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **The J Exp Biol**, London, v. 201, n. 5, p. 761-768, 1998.

ROMERO, S. M., PEREIRA, A. F., GARÓFALO, M. A, HOFFMANN, A. Effects of exercise on plasma catecholamine levels in the toad, *Bufo paracnemis*: role of the adrenals and neural control. **J Exp Zool A Comp Exp Biol**, Hoboken, v. 301, n. 12, p. 911-918, 2004.

RORABAUGH, B. R.; GAIVIN, R. J.; PAPAY, R. S.; SHI, T.; SIMPSON, P. C.; PEREZ, D. M. Both alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenergic receptors crosstalk to down regulate beta(1)-ARs in mouse heart: coupling to differential PTX-sensitive pathways. **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 39, n. 5, p. 777-784, 2005.

ROZEC, B.; GAUTHIER, C. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. **Pharmacol Ther**, Oxford, v. 111, n. 3, p. 652-673, 2006.

RUMBAUT, R. E.; MCKAY, M. K.; HUXLEY, V.H. Capillary hydraulic conductivity is decreased by nitric oxide synthase inhibition. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 268, n. 5 Pt 2, p. H1856–H1861. 1995.

RUMBAUT, R.E.; HUXLEY, V.H. Similar permeability responses to nitric oxide synthase inhibitors of venules from three animal species. **Microvasc Res**, New York, v. 64, n. 1, p. 21-31, 2002.

SAKIMA, A.; TERUYA, H.; YAMAZATO, M.; MATAYOSHI, R.; MURATANI, H.; FUKIYAMA K. Prolonged NOS inhibition in the brain elevates blood pressure in normotensive rats. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 275, n. 2 Pt 2, p. R410-R417, 1998.

SEEBACHER, F., FRANKLIN, C.E. Redistribution of blood within the body is important for thermoregulation in an ectothermic vertebrate (*Crocodylus porosus*). **J Comp Physiol B**, Berlin v. 177, n. 8, p.841-848, 2007.

SHCHERBAKOVA, O. G.; CARL M. HURT, C. M.; XIANG, Y.; DELL'ACQUA, M. L.; ZHANG, Q.; TSIEN, R. W.; KOBILKA, B. K. Organization of  $\beta$ -adrenoceptor signaling compartments by sympathetic innervation of cardiac myocytes. **J Cell Biol**, New York, v. 176, n. 4, p. 521-533. 2007.

SHERIDAN, J. A.; BICKFORD, D. Shrinking body size as an ecological response to climate change. **Nature Climate Change**, London, v. 1, p. 401–406, 2011.

SKALS, M.; SKOVGAARD, N.; ABE, A. S.; WANG, T. Venous tone and cardiac function in the South American rattlesnake *Crotalus durissus*: Mean circulatory filling pressure during adrenergic stimulation in anaesthetised and fully recovered animals. **J Exp Biol**, London, v. 208, n. Pt 19, p. 3747-3759, 2005.

SKOVGAARD, N.; GALLI, G.; ABE, A.; TAYLOR, E.W.; WANG, T. The role of nitric oxide in regulation of cardiovascular system in reptiles. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, New York, v. 142, n. 2, p. 205-214, 2005.

SMALL, S. A. AND FARRELL, A. P. Vascular reactivity of the coronary artery in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Am J Physiol**, Bethesda, v. 258, n. 6 Pt 2, p. R1402-R1410, 1990.

SMITH, S. A. Compendium of Drugs and Compounds Used in Amphibians. **ILAR J**, Washington, v. 48, n. 3, p. 297-300, 2007.

SOUSTRE, H.; RAKOTONIRINA, A. Electrophysiological and mechanical studies of frog heart adrenoceptor stimulation by epinine. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 700-710, 1981.

SOUZA, H. C.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C.; DA SILVA, V. J.; SALGADO, H. C. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Bethesda, v. 280, n. 2, p. H844-H850, 2001.

SOUZA, H. C.; DE ARAÚJO, J. E.; MARTINS-PINGE, M. C.; COZZA, I. C.; MARTINS-DIAS, D. P. Nitric oxide synthesis blockade reduced the baroreflex sensitivity in trained rats. **Auton Neurosci**. Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 38-44, 2009.

STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M.; BRANCO, L. G. S. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 282, n. 2, p. R584-R593, 2001.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. **J Therm Biol**. v. 26, n. 4-5, p. 325-330, 2001.

STENE-LARSEN, G. Review: Comparative aspects of cardiac adrenoceptors: Characterization of the  $\beta_2$ -adrenoceptor as a common "adrenaline"-receptor in vertebrate hearts. **Comp Biochem Physiol C**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1-12, 1981.

STOCKER, S. D.; CUNNINGHAM, J. T.; TONEY, G. M. Water deprivation increases Fos immunoreactivity in PVN autonomic neurons with projections to the spinal cord and rostral ventrolateral medulla. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 287, n. 5, p. R1172-1183, 2004.

STOFER, W. D.; FATHERAZI, S.; HORN, J. P. Neuropeptide Y mimics a non-adrenergic component of sympathetic vasoconstriction in the bullfrog. **J Auton Nerv Syst**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 141-51. 1990.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu Rev Neurosci**, Palo Alto, v. 6, p. 269-324, 1983.

TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol Rev**, Bethesda, v. 79, n. 3, p. 855-916, 1999.

TRAJANOVSKA, S.; DONALD, J. A. Endothelial nitric oxide synthase in the amphibian, *Xenopus tropicalis*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 158, n. 4, p. 274-281, 2011.

TRAYSTMAN, R. J.; MOORE, L. E.; HELFAER, M. A.; DAVIS, S.; BANASIAK, K.; WILLIAMS, M.; HURN, P. D. Nitro-L-arginine analogues: dose- and time-related nitric oxide synthase inhibition in brain. **Stroke**, New York, v. 26, n. 5, p. 864-869, 1995.

TSENG, C-J.; LIU, H-Y.; LIN, H-C.; GER, L-P.; TUNG, C-S.; YEN, M-H. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. **Hypertension**, Dallas, v. 27, n. 1, p. 36-42, 1996.

VAN VLIET, B. N.; WEST N. H. Responses to circulatory pressures, and conduction velocity, of pulmocutaneous baroreceptors in *Bufo marinus*. **J Physiol**, Oxford, v. 388, p. 41-53, 1987a.

VAN VLIET, B. N.; WEST, N. H. Response characteristics of pulmocutaneous arterial baroreceptors in the toad, *Bufo marinus*. **J Physiol**, Oxford, v. 388, p. 55-70, 1987b.

VAN VOSSEL-DAENINCK, J.; DIERICKX, K.; VANDESANDE, F.; VAN VOSSEL, A. Electron-microscopic immunocytochemical demonstration of separate vasotocinergic, mesotocinergic and somatostatinergic neurons in the hypothalamic magnocellular preoptic nucleus of the frog. **Cell Tissue Res**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 7-12, 1981.

VIBORG, A. L.; ROSENKILDE, P. Water potential receptors in the skin regulate blood perfusion in the ventral pelvic patch of toads. **Physiol Biochem Zool**, Chicago, v. 77, n. 1, p. 39-49, 2004.

VIBORG, A. L.; HILLYARD, S. D. Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. **Physiol Biochem Zool**, Chicago, v. 78, n. 3, p. 394-404, 2005.

VIBORG, A. L.; WANG, T.; HILLYARD, S. D. Cardiovascular and behavioural changes during water absorption in toads, *Bufo alvarius* and *Bufo marinus*. **J Exp Biol**, London, v. 209, n. Pt5, p. 834-844, 2006.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, New York, v. 46, n. 4, p. 755-784, 1992.

VIZOTTO, L.D. Ranicultura. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.36, n.1, p.42-45, 1984.

WANG, T.; HEDRICK, M.S.; IHMIED, Y.M.; TAYLOR, E.W. Control and interaction of the cardiovascular and respiratory systems in anuran amphibians. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, New York, v. 124, n. 4 , p. 393-406, 1999.

WEST, N. H.; KIMMEL, P.; TOPOR, Z. L.; EVERED, M. D. The role of angiotensin in arterial blood pressure regulation in the toad *Bufo marinus*. **J Exp Biol**, London, v. 201, n. Pt 14, p. 2219-2224, 1998.

WIDEMAN, R. F.; CHAPMAN, M. E.; WANG, W.; ERF, G. F. Immune modulation of the pulmonary hypertensive response to bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in broilers. **Poult Sci**, Champaign, v. 83, n. 4, p. 624–637, 2004.

WITHERS, P. C., HILLMAN, S. S., SIMMONS, L. A., ZYGMUNT, A. C. Cardiovascular adjustments to enforced activity in the anuran amphibian, *Bufo marinus*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, New York, v. 89, p. 45-49, 1988.

XIANG, Y.; DEVIC, E; KOBILKA, B. The PDZ binding motif of the beta 1 adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 277, n. 37, p. 33783–33790. 2002.

XU, B.; LI, J.; GAO, L.; FERRO, A. Nitric oxide-dependent vasodilatation of rabbit femoral artery by  $\beta_2$ -adrenergic stimulation or cyclic AMP elevation in vivo. **Br J Pharmacol**, London, v 129, n. 5, p 969–974, 2000.

YANG, W.; OSKIN, O.; KRUKOFF, T. L. Immune stress activates putative nitric oxide-producing neurons in rat brain: cumulative effects with restraint. **J Comp Neurol**, New York, v. 405, n. 3, p. 380-387, 1999.

ZHANG, K. W. G.; MAYHAN, W. G.; PATEL, K. P. Effect of nitric oxide in the paraventricular nucleus on renal nerve discharge. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 273, n. 3 Pt 2, p. R864–R872, 1997.

ZHANG, K.; PATEL, K.P. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **Am. J. Physiol**, Bethesda, v. 275, n. 3 p t2, p. R728–R734, 1998.