

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Livia Maria Duran**

**Modulação vascular em rã touro, *Lithobates catesbeianus*.**

SÃO CARLOS-SP

2021

Lívia Maria Duran

Modulação vascular em rã touro, *Lithobates catesbeianus*.

Dissertação apresentada pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos como parte do requerimento para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Dr. Cléo Alcantara Costa Leite

Co-Orientador: Dr. Renato Filogonio

SÃO CARLOS-SP

2021



---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Livia Maria Duran, realizada em 17/11/2021.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Cleo Alcântara Costa Leite (UFSCar)

Prof. Dr. Luciano Rivaroli (UFSJ)

Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho (UNIFESP)

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

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

Dedico esse trabalho à minha mãe, minha família e a todos que sonham em fazer ciência no Brasil.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço meu orientador, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Cléo Alcântara Costa Leite pela oportunidade e suporte. Também agradeço meu co-orientador Dr<sup>o</sup> Renato Filogonio pela ajuda.

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

Minha mãe, se hoje estou apresentando um trabalho científico é porque desde cedo ela me incentivou a estudar e me dedicar ao meu trabalho na pesquisa. Sem ela esse trabalho não existiria.

Minha família, que sempre me apoiou e incentivou em todos esses anos de dedicação a ciência e a pesquisa. Sem eles eu não estaria onde estou hoje, muito obrigada.

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Gerson Jhonatan Rodrigues e todo o time do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF)- UFSCar, por me receberem tão bem em seu laboratório, sempre me dando o suporte estrutural e teórico necessário. Agradeço em especial o Luis por ter me ensinado tanto com a maior gentileza e paciência, esse mestrado não teria acontecido sem a sua ajuda.

Durante 6 anos de laboratório, quase três somente para esse mestrado, encontrei pessoas maravilhosas que me ensinaram muito e me marcaram para sempre. Driele, que me apoiou e me ouviu durante todos esses anos, muito do seu trabalho e esforço estão nessa dissertação. Gustavo, que sempre dedicou uma parte do seu tempo para me ensinar e me ajudar quando eu precisei, sempre com a maior gentileza. Samanta, sua calma e bom humor fizeram meus dias mais leves. Cibele, sua presença no meu dia-a-dia durante esses anos fez toda a diferença, não existe a possibilidade de não ficar um pouco mais alegre perto de você. Sofia, seu jeito especial e suas histórias malucas sempre me tiram uma risada. E um obrigada a todos os outros amigos que passaram por mim durante esse tempo como a Carol, Michelly, Israel, Fabrício, Vicente, Mariana, Heloísa, Priscila, Henrique, DW, Felipe, Will, Fred e Eliton. Espero que eu tenha conseguido agregar algo de bom na rotina de trabalho de vocês como vocês agregaram na minha.

Aos funcionários do departamento Seu Ângelo, Carmen e Grazi por sempre me darem apoio e suporte.

O secretário do PIPGCF, Alexandre, por esclarecer as dúvidas e oferecer o suporte necessário.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) pela oportunidade de desenvolver um trabalho científico deste porte.

## RESUMO

A manutenção da estabilidade da pressão arterial é essencial para a homeostase cardiovascular. Flutuações excessivas podem causar problemas deletérios, como danos vasculares ou redução da perfusão tecidual. Portanto, uma série de mecanismos trabalham no ajuste fino desta variável, como o barorreflexo, que influencia a pressão arterial através de ajustes vasculares e alterações da função cardíaca. Os sistemas adrenérgico e colinérgico provavelmente modulam o sistema vascular. Estes mecanismos são mal compreendidos nos anfíbios e são potencialmente relevantes, uma vez que estes animais estão sob a influência da gravidade e estão sob estresse hídrico potencial. Tais fatores podem alterar o volume vascular ou afetar a hemodinâmica com efeito considerável sobre o sistema cardiovascular. Portanto, avaliamos a relevância da modulação autonômica do sistema vascular em rã-touro, *Lithobates catesbeianus*. O presente trabalho traz algumas novas informações sobre a modulação vascular neste grupo. Observamos que o controle adrenérgico tem relativa relevância para os ajustes vasculares. Apesar de ser preponderante no circuito sistêmico, a regulação adrenérgica não é a única responsável pelo controle da MAP. Durante a hipovolemia, o bloqueio adrenérgico duplo (inativação dos ajustes vasculares e simpáticos cardíacos) não afetou os parâmetros vasculares avaliados. Além disso, observamos que o controle colinérgico está presente e tem maior relevância na vasculatura pulmonar.

**Palavras-chave:** Modulação autonômica. Hipovolemia. *Lithobates catesbeianus*

## ABSTRACT

Maintaining blood pressure stability is essential for cardiovascular homeostasis. Excessive fluctuations may cause deleterious problems such as vascular damage or reduction in tissue perfusion. Therefore, a series of mechanisms work on the fine adjustment of this variable, such as the baroreflex, which influences blood pressure through vascular adjustments and cardiac function alterations. The adrenergic and cholinergic systems likely modulate the vascular system. These mechanisms are poorly understood in amphibians, and they are potentially relevant since these animals are under the influence of gravity and are under potential hydric stress. Such factors can change vascular volume or affect hemodynamics with considerable effect on the cardiovascular system. Therefore, we evaluated the relevance of autonomic modulation of the vascular system in bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*. The present work brings some new information about vascular modulation in this group. We observed that the adrenergic control has relative relevance for vascular adjustments. Despite being preponderant in the systemic circuit, adrenergic regulation is not the only responsible for MAP control. During hypovolemia, dual adrenergic blockade (inactivating vascular and cardiac sympathetic adjustments) did not affect the vascular parameters evaluated. Furthermore, we observed that cholinergic control is present and has higher relevance in the pulmonary vasculature.

**Key-words:** Autonomic modulation. Hypovolemia. *Lithobates catesbeianus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Rã touro (Shaw, 1802) (*Lithobates catesbeianus*).....20

**Figura 2.** Resposta da P AM (kPa) e  $f_H$  (bpm) à injeção de fenilefrina (Fe, 5 $\mu$ g/kg) antes e após do bloqueio autonômico com propranolol e fentolamina. (A) e (B) representam a resposta cardiovascular à fenilefrina antes do bloqueio autonômico. (C) e (D) representam a resposta à fenilefrina depois do bloqueio autonômico. Dados estão representados por dados brutos de cada indivíduo. Teste t foi realizado para averiguar diferenças entre médias (368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05).....27

**Figura 3.** Resposta da PAM (kPa) e  $f_H$  (bpm) à injeção de Isoproterenol (Iso, 5 $\mu$ g/kg) antes e após do bloqueio autonômico com propranolol e fentolamina. (A) e (B) representam a resposta cardiovascular ao isoproterenol antes do bloqueio autonômico. (C) e (D) representam a resposta ao isoproterenol depois do bloqueio autonômico. Dados estão representados por dados brutos de cada indivíduo. Teste t (A,C e D) Wilcoxon (B) foram utilizados para averiguar diferenças entre médias (368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05).....28

**Figura 4.** Resposta cardiovascular, pressão arterial média (PAM - KPa) e frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm), à redução de volume vascular (- 30%). (A) e (B) apresentam a condição controle, com modulação autonômica íntegra. (C) e (D) demonstram as respostas sem a modulação cardíaca, após bloqueio  $\beta$ -adrenérgico. (E) e (F) apresentam as respostas cardiovasculares e após bloqueio  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. (Anova de medidas repetidas- Tukey, 368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05).....30

**Figura 5.** Resposta cardiovascular, pressão arterial média (PAM - KPa) e frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm), à reposição de volume vascular (+ 30% ). (A) e (B) apresentam a condição controle, com modulação autonômica íntegra. (C) e (D) demonstram as respostas sem a modulação cardíaca, após bloqueio  $\beta$ -adrenérgico. (E) e (F) apresentam as respostas cardiovasculares e após bloqueio  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico. Dados

estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. (Anova de medidas repetidas- Tukey, 368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05).....31

**Figura 6.** Registro original de artéria mesentérica durante protocolo de miografia. As setas apontam a resposta vascular à estimulação com KPSS, curva estímulo-resposta ao EFS e protocolo de bloqueio autonômico (Atropina  $10^{-5}$  M, fentolamina  $10^{-5}$  M e propranolol  $10^{-5}$  M). Estímulos de 16 Hz foram utilizados antes e após o tratamento com as drogas bloqueadoras: A) atropina e fentolamina; B) fentolamina e atropina; e C) propranolol e atropina.....35

**Figura 7.** Curva estímulo-resposta ao EFS da (A) artéria pulmonar, (B) artéria mesentérica e (C) veia femoral. Frequências de estímulo variam entre 0,5 Hz até 16 Hz. Dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam valores distintos (346,88 g  $\pm$  9,55 g; Friedman-Dunn, p<0.05).....36

**Figura 8.** Força de contração da artéria pulmonar gerada por EFS (16 Hz) antes e após bloqueio farmacológico com (A) atropina e fentolamina; (B) fentolamina e atropina e (C) propranolol e atropina. Letras diferentes indicam valores distintos (346,88 g  $\pm$  9,55 g; A- One-way ANOVA seguido de Tukey; B e C- Friedman seguido de Dunn; n=6; p<0,05).....37

**Figura 9.** Força de contração da artéria mesentérica gerada por EFS (16 Hz) antes e após bloqueio farmacológico com (A) atropina e fentolamina; (B) fentolamina e atropina e (C) propranolol e atropina. Letras diferentes indicam valores distintos (346,88 g  $\pm$  9,55 g; A- One-way ANOVA seguido de Tukey; B e C- Friedman seguido de Dunn; n=6; p<0,05).....38

**Figura 10.** Força de contração de artéria pulmonar antes e após a aplicação de lidocaína ( $10^{-3}$  M). Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. (346,88 g  $\pm$  9,55 g; Friedman- Dunn, n=4, p<0,05).....40

**Figura 11.** Contração de artéria mesentérica antes e depois de lidocaína ( $10^{-3}$  M).  
Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. (346,88 g  $\pm$  9,55 g; Friedman- Dunn,  
n=3, p<0,05).....41

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Pressão arterial média (PAM, kPA) e frequência cardíaca média ( $f_H$ , bpm) durante protocolo de redução e reposição de volume vascular em *Lithobates catesbeianus*. Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Asteriscos denotam diferenças entre o tratamento e a medida controle, que foi feita logo antes durante o protocolo. A eficácia dos bloqueios  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgico foram testados com teste t ou Wilcoxon, de acordo com as características de distribuição dos dados. Os experimentos de retirada e retorno de sangue foram analisados com Anova de medidas repetidas e Tukey,  $368,28 \text{ g} \pm 21,57 \text{ g}$ ;  $n=7$ ,  $p<0,05$ .....32

**Tabela 2.** Força de contração vascular na curva estímulo-resposta da artéria pulmonar, artéria mesentérica e veia femoral. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam valores diferentes ( $346,88 \text{ g} \pm 9,55 \text{ g}$ ;  $n=23$ ; Friedman-Dunn,  $p<0,05$ ).....57

**Tabela 3.** Força de contração vascular após EFS (16 Hz) e bloqueio autonômico com atropina ( $10^{-5} \text{ M}$ ), fentolamina ( $10^{-5} \text{ M}$ ) e propranolol ( $10^{-5} \text{ M}$ ). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam valores diferentes ( $346,88 \text{ g} \pm 9,55 \text{ g}$ ;  $n=23$ ; One-way ANOVA seguido de Tukey - Artéria pulmonar e mesentérica- EFS, Atropina e Fentolamina; Friedman seguido de Dunn - Artéria pulmonar e mesentérica- EFS, Fentolamina e Atropine e EFS, Propranolol e atropina. Consideramos  $p<0,05$  para todos os casos.....58

## LISTA DE SIGLAS

bpm- batimentos por minuto

EFS- Estimulação de campo elétrico

$f_H$ - Frequência cardíaca

kPa- Quilopascal

KPSS- Solução fisiológica rica em  $K^+$

PA- Pressão arterial

PAM- Pressão arterial média

PSS- Solução fisiológica

SNA- Sistema nervoso autonômico

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 16 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 21 |
| 2.1 <i>Objetivo geral</i> .....                                       | 21 |
| 2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....                                | 21 |
| <b>3 METODOLOGIA</b> .....  | 22 |
| 3.1 <i>Animais</i> .....  | 22 |
| 3.2 <i>Hemorragia e controle autonômico de pressão arterial</i> ..... | 22 |
| 3.3 <i>Reatividade Vascular</i> .....                                 | 24 |
| 3.3.1 <i>Curva estímulo-resposta e bloqueio farmacológico</i> .....   | 24 |
| 3.4 <i>Bloqueio com lidocaína</i> .....                               | 25 |
| 3.5 <i>Análise estatística</i> .....                                  | 25 |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | 26 |
| 4.1 <i>Hemorragia e controle autonômico de pressão arterial</i> ..... | 26 |
| 4.1.1 <i>Fenilefrina e Isoproterenol</i> .....                        | 26 |
| 4.1.2 <i>Redução induzida de volume vascular</i> .....                | 29 |
| 4.1.3 <i>Retorno de volume vascular</i> .....                         | 29 |
| 4.2 <i>Reatividade vascular</i> .....                                 | 33 |
| 4.2.1 <i>Estímulo de campo elétrico (EFS)</i> .....                   | 33 |
| 4.2.2 <i>Bloqueio autonômico</i> .....                                | 33 |
| 4.2.2.1 <i>Artéria pulmonar</i> .....                                 | 33 |
| 4.2.2.2 <i>Artéria mesentérica</i> .....                              | 33 |
| 4.2.3 <i>Bloqueio com lidocaína</i> .....                             | 39 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | 41 |
| 5.1 <i>Hemorragia e controle autonômico de pressão arterial</i> ..... | 42 |
| 5.2 <i>Reatividade vascular</i> .....                                 | 45 |
| 5.2.1 <i>Artéria pulmonar</i> .....                                   | 46 |

|   |    |
|---|----|
| 5.2.2 <i>Artéria mesentérica</i> .....    | 46 |
| 5.2.3 <i>Veia femoral</i> .....           | 47 |
| 5.2.4 <i>Bloqueio com lidocaína</i> ..... | 49 |
| <b>6 CONCLUSÕES</b> .....                 | 50 |
| <b>7 REFERÊNCIAS</b> .....                | 51 |
| <b>8 MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....       | 57 |

## 1 INTRODUÇÃO

A pressão arterial é o resultado da combinação de alguns fatores complexos. A seção arterial está em constante enchimento à taxa proporcionada do débito cardíaco e em constante esvaziamento a taxas proporcionadas pela resistência periférica. Além disso, este compartimento pode ter seu volume alterado por contrações do músculo liso vascular. Todos estes fatores estão sob modulação do sistema nervoso autonômico (SNA) (HOLT et al., 1946). Diversos fatores podem causar flutuações momentâneas de pressão arterial (PA) de forma que este parâmetro deve estar sob contínuo monitoramento e ajuste.

A manutenção da PA em níveis adequados à homeostasia de cada espécie é fundamental. Eventos de pressão arterial baixa podem causar redução da perfusão de sangue em órgãos e tecidos e podem causar choque (WEHRWEIN; JOYNER, 2013). Eventos com elevação de PA podem também causar problemas, como danos mecânicos no próprio sistema vascular e também em órgãos além de hiperfiltração em alguns leitos capilares. A gravidade deste problema pode ser ilustrada com casos de acidente vascular cerebral (WEHRWEIN; JOYNER, 2013).

Um dos mecanismos importantes no controle imediato da pressão arterial é o sistema barorreflexo. Neste mecanismo, o monitoramento da PA é realizado por barorreceptores transmuralis fásicos, localizados em vasos centrais. As mudanças de tensão na parede vascular afetam os disparos aferentes ao longo dos ciclos de bombeamento cardíaco (BAGSHAW, 1985; COWLEY, 1992). Esse mecanismo parece ser bem conservado nos vertebrados e foi observado em representantes de todos os grupos: peixes (SANDBLUM; AXELSSON, 2005), anfíbios (MILLARD; MOALLI, 1980), répteis (FILOGONIO et al., 2019), aves (SMITH, 1994) e mamíferos (COLEMAN, 1980).

Dependendo de quais receptores são acionados, ocorrem diferentes respostas, como por exemplo, os receptores atriais quando acionados causam aumento da atividade simpática no nó sinoatrial, o que leva a um aumento de frequência cardíaca (HAINSWORTH, 2014). Esse papel do sistema nervoso

autônomo sobre o coração é responsável pelo controle da pressão arterial de curto prazo (GUYENET, 2006). Os sensores localizados nos grandes vasos captam alterações de pressão arterial média (PAM) e enviam sinais neurais aferentes que após serem processados pelo sistema nervoso central, causam mudanças nas respostas eferentes simpáticas e parassimpáticas ao coração e vasos sanguíneos, havendo assim, o controle de PAM (WEHRWEIN; JOYNER, 2013). Além disto, há modulação em múltiplos pontos do sistema vascular alterando o fluxo sanguíneo em redes capilares durante o ciclo cardíaco. Desta forma, durante as elevações de pressão, há aumento da atividade dos barorreceptores, causando relaxamento das artérias. Na redução de PA, há diminuição dos disparos dos barorreceptores, causando aumento na contração das artérias (MANDOKI et al., 2013). Um dos mecanismos para esta ação é bem descrito em mamíferos e envolve a presença de receptores adrenérgicos nos vasos. Estes seriam os responsáveis por ligar as flutuações de pressão arterial às modificações do tônus vascular (BEVAN; LAHER, 1991). Assim, a inervação vascular é essencial para a regulação rápida da PA.

Os padrões de inervação vascular variam entre grupos de vertebrados. Contudo, de forma geral, a inervação adrenérgica exerce controle proeminente sobre a vasculatura se comparada à inervação colinérgica. Além deste aspecto geral, há um aparente aumento da relevância adrenérgica para as modulações autonômicas nos grupos mais recentes de vertebrados, incluindo a modulação autonômica para o controle cardiovascular (TAYLOR; JORDAN; COOTE, 1999).

Infelizmente, há muito menos informações sobre a modulação autonômica vascular em outros grupos vertebrados. Em anfíbios, parece haver padrão similar aos mamíferos, em relação a relevância simpática neste controle. Em *Rhinela marina*, foi descrito que todas as principais artérias possuem axônios adrenérgicos (MORRIS et al., 1986); todos os vasos pré-glomerulares, incluindo a aorta dorsal, possuem inervação adrenérgica (MORRIS; GIBBINS, 1983). Além disso, a artéria pulmonar também possui fibras nervosas adrenérgicas (HALLER; ROGERS, 1978). Contudo, há o relato de que o músculo vascular pulmonar de anuros seria inervado tanto por fibras adrenérgicas quanto colinérgicas (CAMPBELL, 1971).

Na salamandra *Ambystoma tigrinum*, foi observado a presença de inervação adrenérgica nos vasos branquiais e em pequena escala na aorta dorsal (MALVIN; DAIL, 1986). Okamoto e Tagawa (1990) investigaram a presença de inervação adrenérgica em *Lithobates catesbeianus*, *Xenopus laevis*,

*Pelophylax nigromaculatus* e *Bufo japonicus* e indicam que a veia porta hepática desses anfíbios tem uma pequena quantidade de plexos de nervos colinérgicos. A veia gastrointestinal é inervada de maneira moderada em *L. catesbeiana* e, por fim, nenhuma fibra colinérgica foi encontrada na veia pré-abdominal de *X. laevis* e *B. japonicus*.

As informações sobre este grupo são fundamentais para qualquer discussão acerca da evolução dos padrões de inervação vascular e sua relevância hemodinâmica em vertebrados. Este grupo foi o primeiro a estabelecer hábitos de uso do ambiente terrestre por longo tempo. Ou seja, foi o primeiro a submeter-se às demandas hemodinâmicas causadas pela ação da gravidade sobre os fluidos. Um dos principais desafios para a manutenção da hemodinâmica vascular é a força da gravidade, que tem um efeito considerável nos animais terrestres. Nestes animais a gravidade não é compensada pelo empuxo da coluna d'água (LILLYWHITE, 1996) e assim, a modulação de mudanças rápidas de pressão sanguínea é fundamental para a homeostasia. Todos os animais terrestres estão sujeitos aos desafios hemodinâmicos causado pela gravidade, como mudanças rápidas de retorno venoso, de pressão arterial, de perfusão sanguínea e variações no débito cardíaco (LILLYWHITE, 1996; ARMELIN et al., 2014). Portanto, essa instabilidade hemodinâmica requer um monitoramento constante e compensação de modulação autonômica (LILLYWHITE, 1996). Neste contexto, a modulação autonômica do sistema vascular tem um papel de grande relevância na manutenção da homeostase da pressão sanguínea ajustando constantemente o tônus vascular de acordo com as flutuações de pressão e fluxo (BEVAN; LAHER, 1991). A manutenção do gradiente de pressão é indispensável para garantir um fluxo sanguíneo contra as dificuldades hemodinâmicas em animais terrestres e assim, gradientes maiores seriam necessários para contrapor desafios hemodinâmicos maiores (LILLYWHITE, 1996). Este aspecto poderia ser observado em alguns grupos de répteis. Espécies de serpentes aquáticas apresentam uma pressão sanguínea arterial menor do que os animais terrestres (SEYMOUR; LILLYWHITE, 1976). Para estes autores, maiores variações hemodinâmicas no ambiente terrestre remeteriam a necessidade de manutenção de gradiente de pressão maior e assim, os ajustes de pressão sofreriam influência do hábito das espécies animais.

Outro fator importante na homeostase do sistema vascular é a manutenção do balanço hídrico. Alterações de volume total nos compartimentos

corpóreos podem causar alguns problemas que o sistema cardiovascular deve confrontar, como as alterações de volemia, de osmolaridade e de viscosidade (HILLMAN; WITHERS, 1988; HILLMAN, 1978; SHOEMAKER, 1964). Hillman (1978) avaliou os efeitos da desidratação em *Xenopus laevis* e observou que o volume plasmático diminui e o nível de hematócritos e solutos plasmáticos aumenta. Shoemaker (1964) observou que a urina diluída de *Rhinella marina* é utilizada em casos de desidratação para a manutenção da concentração de sódio plasmático em níveis normais. Também observou que durante o período de desidratação, a concentração de solutos nos tecidos era maior do que no plasma e que também ocorre retenção de água, devido à alta concentração de solutos.

A rã-touro (Shaw, 1802) (*Lithobates catesbeianus*) é uma espécie nativa do leste da América do Norte, mas que pode ser encontrada no Brasil, especialmente em regiões ocupadas pela Mata Atlântica (GIOVANELLI; HADDAD; ALEXANDRINO, 2008). A rã-touro é uma espécie invasora que preda as espécies nativas e parece ter se adaptado bem às condições que encontrou no Brasil. Leivas et al (2012) identificaram os tipos de alimentos ingeridos pelas rãs localizadas no estado do Paraná, Brasil. Foi visto que a maior parte de sua dieta provém da ingestão de invertebrados (86% dos itens), mas também se alimentam de vertebrados (14% dos itens). Medeiros e colegas (2016) realizaram estudos na região sul do país para compreender a reprodução dessa espécie no Brasil, e observaram que a atividade reprodutiva da rã-touro ocorre durante períodos com um fotoperíodo longo. Kaefer e colaboradores (2007) observaram que *L. catesbeianus* no sul do Brasil possuem um ciclo reprodutivo quase contínuo, sendo este diminuído somente nos meses mais frios do ano. Os autores também indicam que a capacidade desta espécie de invadir outros locais pode estar associada a algumas características reprodutivas como o desenvolvimento gonadal contínuo, período reprodutivo contínuo, alta fecundidade e maturidade sexual antecipada.

Para atuar no meio em que vive, os anuros devem ser aptos a exercer modulação autonômica nas alterações hemodinâmicas tanto no ambiente aquático quanto terrestre. Portanto, nossa hipótese é que esses animais devem possuir inervação e modulação adrenérgica vascular, além da inervação e modulação colinérgica

Para analisar a presença e o papel de diferentes inervações e receptores vasculares no controle vascular, utilizamos um método de investigação farmacológico com estimulação de campo elétrico (EFS) *in vitro* de preparações de artéria pulmonar, artéria mesentérica e veia femoral, bem como um protocolo farmacológico de bloqueadores adrenérgicos *in vivo*.



**Figura 1.** Rã touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar aspectos fundamentais acerca da modulação autonômica sobre o sistema vascular de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).

### 2.2 Objetivos específicos

(1) Averiguar a presença de controle adrenérgico e seu papel no controle vascular de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante hipovolemia.

(2) Avaliar a presença de modulação autonômica adrenérgica e colinérgica assim como, a capacidade relativa de resposta vascular entre tais estímulos, em alguns vasos de grande porte de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) tanto do circuito sistêmico quanto pulmonar (*in vitro*).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas rãs touro adultas (*Lithobates catesbeianus*) (n=23; média  $\pm$  erro padrão 346,88 g  $\pm$  9,55 g para os experimentos *in vitro* e n=7; média  $\pm$  erro padrão 368,28 g  $\pm$  21,57 g para os experimentos *in vivo*) e obtidas através de um fornecedor comercial de São Carlos (São Carlos-SP, Brasil) e transportados até o Departamento de Ciências Fisiológicas na UFSCar, onde foram mantidas em tanques com capacidade de 1000 litros, com suprimento constante de água à 25 °C, com área úmida e plataforma seca, e abrigo. Os animais foram alimentados três vezes na semana com ração comercial para anfíbios (Aquos, Brasil) e a alimentação foi interrompida 5 dias antes dos experimentos.

Para os experimentos *in vitro*, os animais foram eutanasiados com anestesia terminal de benzocaína a 0,03% (MITCHELL, 2009). Após os experimentos *in vivo*, os animais foram eutanasiados com overdose de benzocaína (MITCHELL, 2009). Todos os procedimentos foram autorizados pelo Conselho de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar).

#### 3.2 Hemorragia e controle autonômico de pressão arterial

A anestesia dos animais foi realizada com MS-222, com 0,3 g para cada 100 ml de água destilada (ZENA; GARGAGLIONI; BÍCEGO, 2013). Após a verificação da eficácia da anestesia (~30 minutos), iniciamos o procedimento cirúrgico para a canulação da artéria femoral. Damos início ao protocolo injetando anestésico local (lidocaína, 2%) na região de incisão. Um cateter (PE50) foi inserido na artéria femoral para aferição de pressão arterial média. Finalizamos o procedimento com a sutura da incisão e aplicação intraperitoneal de antibiótico Chemitril (11 mg/kg) e anti-inflamatório Flunixin (1,1mg/kg).

Os animais permaneceram em uma câmara com um fio de água corrente até a completa recuperação da anestesia. Após isso, eles foram mantidos em uma câmara térmica, à 25°C, para aclimatação e realização do experimento.

O protocolo experimental foi iniciado após 24 horas de recuperação do procedimento cirúrgico. Conectamos o cateter arterial à transdutores de pressão (Baxter Edward PX600), conectados a um amplificador de sinal e conversor A/D (Bridge Amp/Powerlab, ADInstruments) para registro contínuo do sinal de pressão (Labchart, ADInstruments). Os transdutores foram calibrados contra uma coluna de água. O registro foi mantido até a constatação de estabilização de PA e  $f_H$  em níveis de repouso.

Após cerca de 30 minutos de registro em condição de repouso, iniciamos o protocolo farmacológico com a injeção dos agonistas adrenérgicos para avaliar a resposta vascular à tais estímulos. Iniciamos com injeção de dose de  $5\mu\text{g}/\text{Kg}$  do agonista  $\alpha$ -adrenérgico, fenilefrina (SANDBLOM et al., 2016); além de uma dose de  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  do agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol (SKALS et al., 2005). Isto foi seguido pelo protocolo de hipovolemia, causada pela retirada de 30% de volume de sangue. O volume sanguíneo total foi calculado para cada indivíduo de acordo com sua massa (A rã-touro possui volemia de cerca de 8-10% de seu peso total - PROSSER; WEINSTEIN, 1950). O volume de sangue retirado foi mantido em uma seringa com heparina, em movimento constante a fim de evitar a coagulação do mesmo. Após a estabilização do sinal de pressão, o sangue foi re-injetado no animal. A perda de volemia mimetizará perda de fluido por transpiração esperada em um animal anfíbio com respiração cutânea (desde que desconectado de fonte de água). Este é um valor fisiológico para a espécie e condições indicadas.

O processo descrito foi seguido pela injeção de bloqueadores catecolaminérgicos. Assim, após injeção de  $2\text{ mg}/\text{kg}$  do bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, propranolol (CAIROLI et al, 1967), foi repetido o processo de alteração e recuperação de volemia. Posteriormente, foi realizada a injeção de  $2\text{ mg}/\text{kg}$  do bloqueador  $\alpha$ -adrenérgico, fentolamina (SKALS et al., 2005). Novamente, foi realizada a retirada e retorno do sangue nas condições descritas. Finalizamos o protocolo farmacológico com injeção de  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  de fenilefrina (SANDBLOM et al., 2016) e de  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  de isoproterenol (SKALS et al., 2005) para testarmos a eficácia do bloqueio autonômico. O protocolo experimental teve duração total de 3-5h.

### 3.3 Reatividade Vasculiar

#### 3.3.1 Curva estímulo-resposta e bloqueio farmacológico

Para os experimentos de miografia, a artéria pulmonar, a artéria mesentérica e a veia femoral foram dissecadas em anéis de 2 mm de comprimento (RODRIGUES et al., 2011). Cada anel foi montado em uma cuba do miógrafo (Mulvany-Halpern, modelo 210 DMT-EUA, Marierra, GA) para a medição de tensão isométrica (PowerLab-Labchart, ADInstruments). Cada cuba foi preenchida com 5 ml de solução fisiológica (PSS, em  $\text{mmol l}^{-1}$ ): 125 NaCl, 2,5 KCl, 1NaH<sub>2</sub>OPO<sub>4</sub>, 1MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,5 CaCl<sub>2</sub>, 10 glicose com temperatura constante de 25 °C, pH 7,4, com uma mistura de gases de 98% de oxigênio e 2% de gás carbônico sendo borbulhada na solução fisiológica. Os vasos foram normalizados, onde as artérias foram montadas com uma pressão de 3,72 kPa (CLAËSSON; ABE; WANG, 2015) e a veia femoral com uma pressão de 0,5 kPa (HILLMAN; WITHERS; KIMMEL, 1998).

Para verificar a contratilidade dos vasos, foi utilizado uma solução fisiológica rica em K<sup>+</sup> (KPSS: NaCl foi substituído por KCl em uma base equimolar). Após estabilização dos vasos, as cubas foram lavadas com PSS por pelo menos três vezes. A presença de terminações nervosas foram testadas com estimulação de campo elétrica (EFS - *electrical field stimulation*) em uma curva estímulo-resposta com frequências de estímulo de intensidade crescente (0,5 Hz-16 Hz, 60 V, por 30s, com pulsos quadrados de 0,5 ms de duração e 0,2 ms de intervalo). Utilizamos 10 minutos de intervalo mínimo entre os estímulos (FILOGONIO et al., 2020). O estimulador elétrico (S88, Grass stimulator- Astro-Medical) foi conectado à eletrodos de platina, acoplados a um suporte plástico. Os eletrodos foram posicionados à aproximadamente 1 mm de distância dos vasos (CAMPOS et al., 2018; FILOGONIO et al., 2020).

Após a caracterização da curva-resposta de EFS, avaliamos o efeito bloqueador com antagonistas colinérgicos e adrenérgicos. Para esse protocolo, os vasos foram agrupados em três diferentes grupos experimentais para avaliar a relevância de terminais nervosos autonômicos na geração de contração vascular. As drogas bloqueadoras utilizadas passaram por testes prévios para a verificação de dose. O primeiro grupo recebeu atropina ( $10^{-5}$  M) e depois uma adição de fentolamina ( $10^{-5}$  M). O segundo grupo recebeu fentolamina ( $10^{-5}$  M) e depois adição de atropina ( $10^{-5}$  M). O terceiro grupo recebeu propranolol ( $10^{-5}$  M) e depois adição de atropina ( $10^{-5}$  M). Para avaliar a resposta após o bloqueio

com cada droga, após 30 minutos de incubação, estimulamos cada vaso novamente (16 Hz, 60 V, 30 s). Ao final do protocolo, adicionamos KPSS novamente para avaliar se os vasos ainda estavam funcionais.

### 3.4 Bloqueio com lidocaína

Para verificar se a resposta vascular observada nos experimentos de curva estímulo-resposta foi causada por liberação de neurotransmissores, utilizamos o bloqueio nervoso por lidocaína (bloqueador de canal de sódio) nos vasos que responderam ao estímulo elétrico (artéria pulmonar e artéria mesentérica). Após a montagem dos vasos nas cubas e verificação de sua viabilidade com KPSS, testamos a resposta à um agonista muscarínico, a acetilcolina ( $10^{-5}$  M); e a um agonista adrenérgico, a fenilefrina ( $10^{-5}$  M). Logo em seguida, realizamos a curva estímulo-resposta e incubamos a lidocaína ( $10^{-3}$  M) por 30 minutos. Após esse período, realizamos novamente uma curva estímulo-resposta para averiguar a resposta após o bloqueio. Finalizamos com o teste de resposta ao agonista muscarínico, a acetilcolina ( $10^{-5}$  M), e ao agonista adrenérgico, a fenilefrina ( $10^{-5}$  M). Ao final do protocolo, adicionamos KPSS novamente para avaliar a viabilidade dos vasos.

### 3.5 Análise estatística

Os dados tiveram a normalidade avaliada com o teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre as frequências de estimulação nos experimentos *in vitro* foram testadas com Friedman seguido do pós teste de Dunn. Cada grupo de EFS com bloqueio autonômico foi testado com One-way ANOVA seguido de Tukey ou Friedman seguido de Dunn (um teste por vaso para cada grupo experimental). O bloqueio de lidocaína também foi testado com Friedman seguido por Dunn.

A eficácia dos bloqueios  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgico nos experimentos *in vivo* foram testados com teste t ou Wilcoxon, de acordo com as características de distribuição dos dados. Os experimentos de retirada e retorno de sangue foram analisados com Anova de medidas repetidas e Tukey.

Testes foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Todos os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão. Os testes e gráficos foram feitos com o programa GraphPad Prism 6.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Hemorragia e controle autonômico de pressão arterial

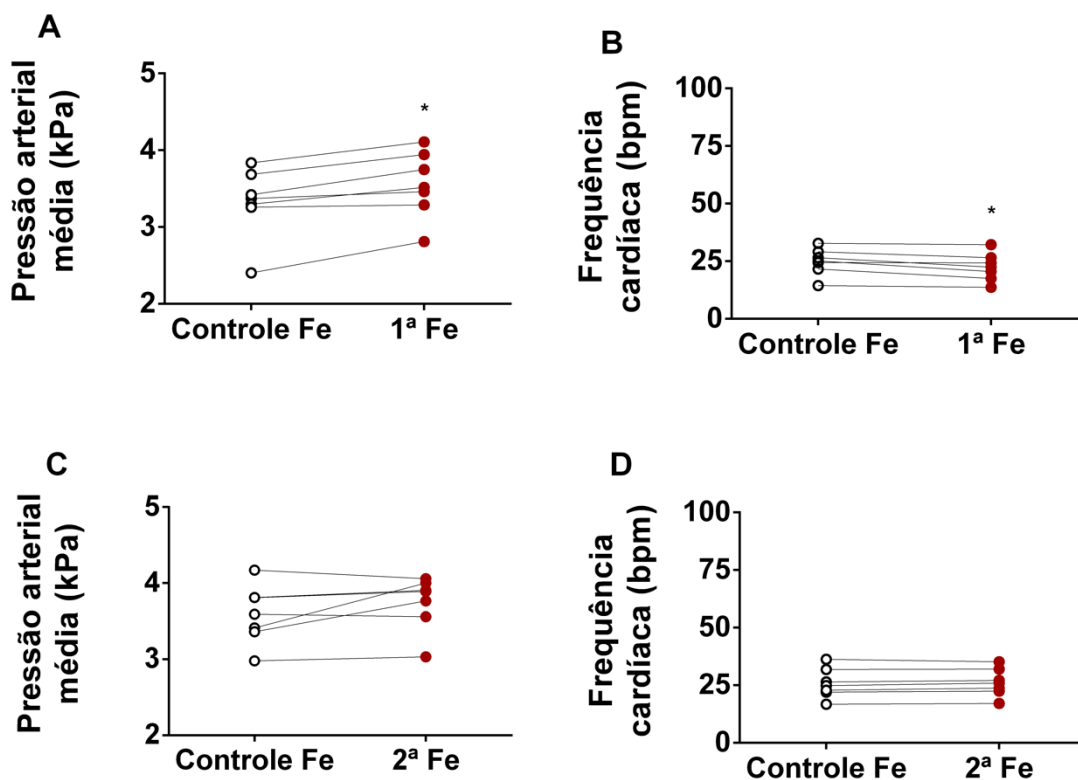
#### 4.1.1 Fenilefrina e Isoproterenol

A administração de agonista  $\alpha$ -adrenérgico, fenilefrina, após bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico com fentolamina demonstrou a eficácia do mesmo (Fig 2; Tabela 1). Na ausência do bloqueador os valores de PAM e  $f_H$  variaram de  $3,325 \text{ kPa} \pm 0,1730 \text{ kPa}$  e  $24,87 \text{ bpm} \pm 2,197 \text{ bpm}$  para  $3,554 \text{ kPa} \pm 0,1641 \text{ kPa}$  e  $22,46 \text{ bpm} \pm 2,279 \text{ bpm}$ , respectivamente. Tal resposta atesta a eficácia da dose de fenilefrina utilizada em promover alteração cardiovascular (Fig 2; Tabela 1).

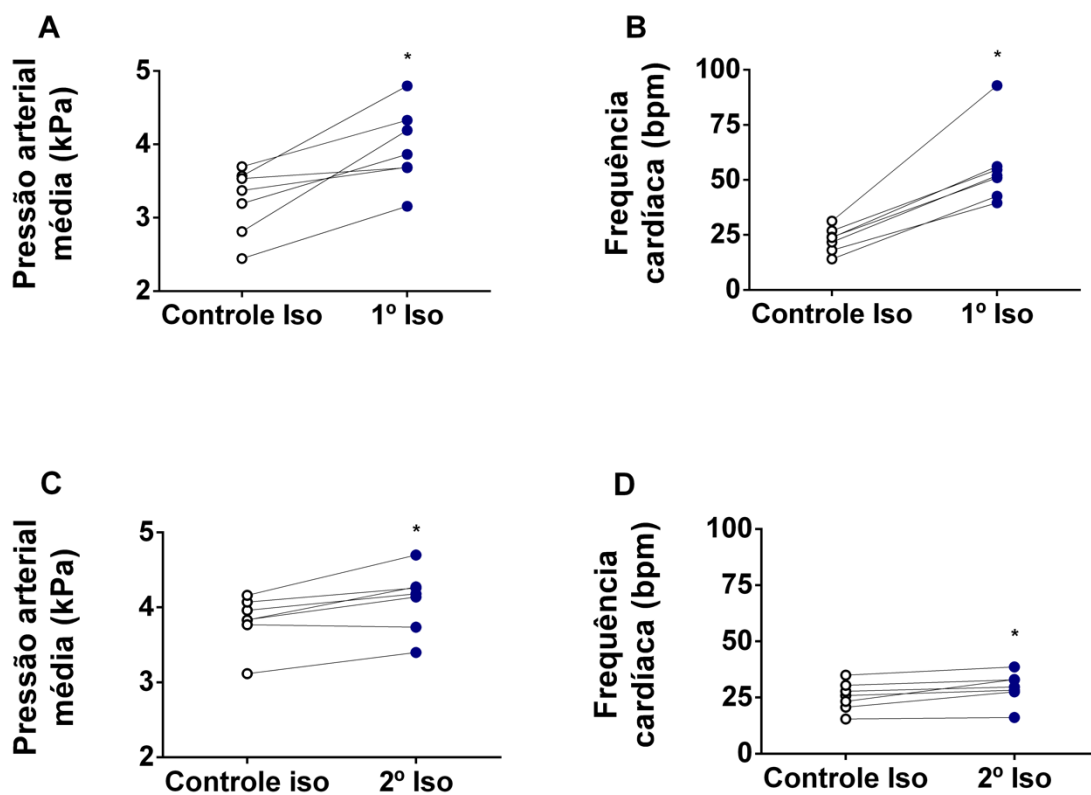
Após o bloqueio, a resposta foi abolida. A PAM e  $f_H$  foram mantidas em valores próximos oscilando de  $3,590 \text{ kPa} \pm 0,1456 \text{ kPa}$  e  $25,88 \text{ bpm} \pm 2,447 \text{ bpm}$  à  $3,745 \text{ kPa} \pm 0,1342 \text{ kPa}$  e  $26,24 \text{ bpm} \pm 2,277 \text{ bpm}$ , respectivamente. Apesar de uma leve alteração, não houve diferença entre médias. Isto confirma a eficácia do bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico com a dose utilizada (Fig 2; Tabela 1).

Da mesma forma, o bloqueio  $\beta$ -adrenérgico, com propranolol, foi eficaz em inibir a resposta à dose de isoproterenol, agonista  $\beta$ -adrenérgico, utilizada (Fig 3; Tabela 1). Na ausência do bloqueador o valor médio de PAM foi elevado de  $3,231 \text{ kPa} \pm 0,1720 \text{ kPa}$  para  $3,958 \text{ kPa} \pm 0,2009 \text{ kPa}$ . A  $f_H$  média aumentou de  $22,82 \text{ bpm} \pm 2,133 \text{ bpm}$  para  $55,52 \text{ bpm} \pm 6,635 \text{ bpm}$  (Figura 3).

Após o bloqueio com propranolol e fentolamina a PAM ainda foi elevada com um efeito muito menor variando de  $3,820 \text{ kPa} \pm 0,1290 \text{ kPa}$  para  $4,098 \text{ kPa} \pm 0,1577 \text{ kPa}$ . Não houve aumento da  $f_H$ . Seu valor médio oscilou de  $25,50 \text{ bpm} \pm 2,427 \text{ bpm}$  para  $29,43 \text{ bpm} \pm 2,632 \text{ bpm}$ . Desta forma, foi observada uma inibição eficaz do bloqueio  $\beta$ -adrenérgico utilizado. (Figura 3).



**Figura 2.** Resposta da PAM (kPa) e  $f_H$  (bpm) à injeção de fenilefrina (Fe, 5 $\mu$ g/kg) antes e após do bloqueio autonômico com propranolol e fentolamina. (A) e (B) representam a resposta cardiovascular à fenilefrina antes do bloqueio autonômico. (C) e (D) representam a resposta à fenilefrina depois do bloqueio autonômico. Dados estão representados por dados brutos de cada indivíduo. Teste t foi realizado para averiguar diferenças entre médias (368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05).



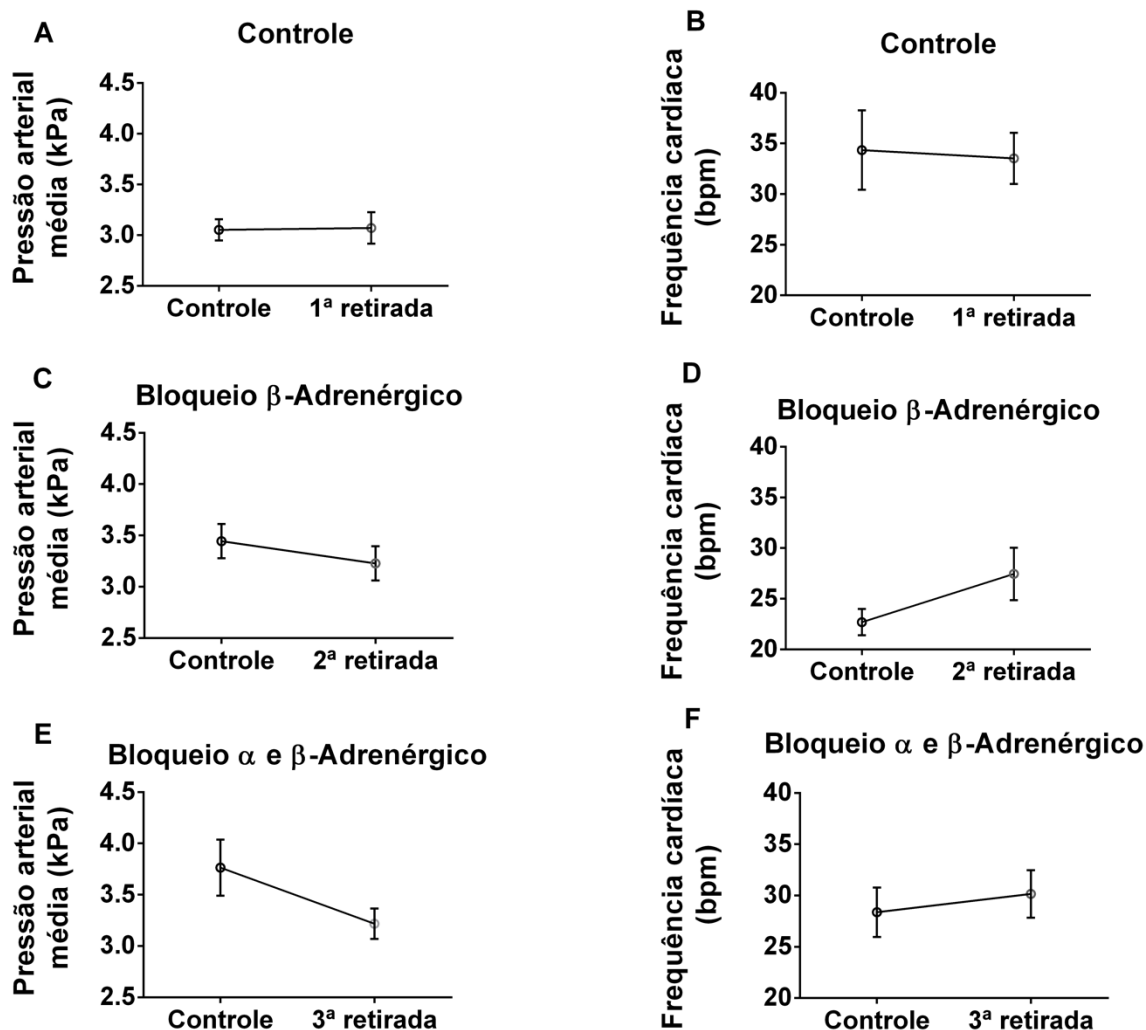
**Figura 3.** Resposta da PAM (kPa) e  $f_H$  (bpm) à injeção de Isoproterenol (Iso, 5 $\mu$ g/kg) antes e após do bloqueio autonômico com propranolol e fentolamina. (A) e (B) representam a resposta cardiovascular ao isoproterenol antes do bloqueio autonômico. (C) e (D) representam a resposta ao isoproterenol depois do bloqueio autonômico. Dados estão representados por dados brutos de cada indivíduo. Teste t (A, C e D) Wilcoxon (B) foram utilizados para averiguar diferenças entre médias (368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05).

#### *4.1.2 Redução induzida de volume vascular*

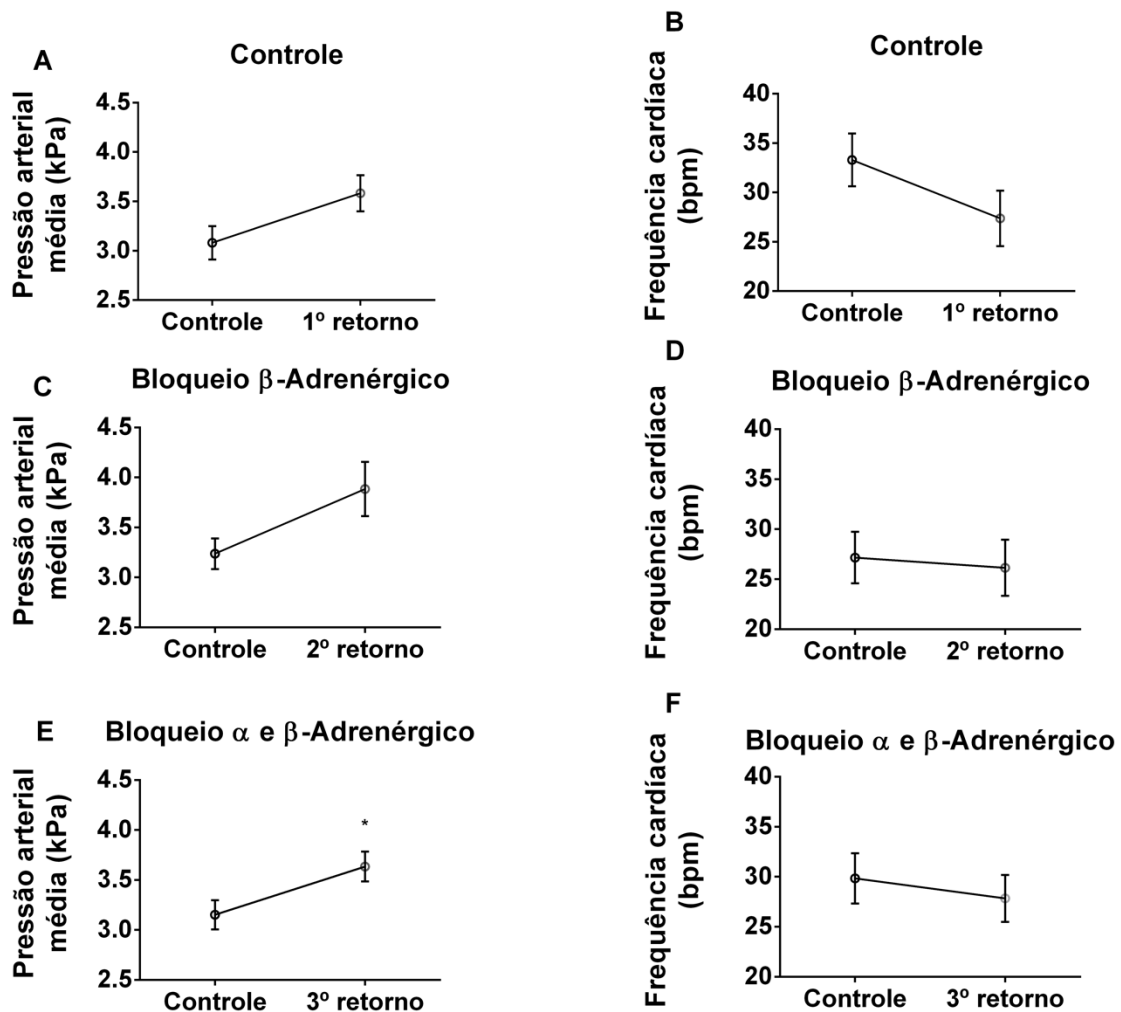
Tanto a PAM quanto  $f_H$  permaneceram estáveis durante todos os protocolos de retirada de volume sanguíneo (-30% - Fig 4; Tabela 1). Na retirada controle houve pouca variação dos parâmetros analisados. Durante os bloqueios autonômicos, tanto somente com propranolol quanto com propranolol e fentolamina, houve uma variação maior entre os parâmetros, porém não foram considerados estatisticamente relevantes. Portanto, mesmo na presença de bloqueio duplo adrenérgico, a retirada de sangue não provoca uma mudança considerável nos parâmetros de PAM e  $f_H$ .

#### *4.1.3 Retorno de volume vascular*

Após recuperação de volume, apesar de haver uma diferença mais acentuada entre os dados controle e o retorno de cada grupo, somente a PAM após o bloqueio duplo foi estatisticamente relevante (Fig 5; Tabela 1). Os parâmetros avaliados não passaram por nenhuma mudança estatisticamente relevante tanto no controle quanto após bloqueio com propranolol. Já após o bloqueio duplo adrenérgico houve um aumento estatisticamente relevante de PAM, indo de  $3,152 \text{ kPa} \pm 0,1457 \text{ kPa}$  para  $3,635 \text{ kPa} \pm 0,1494^* \text{ kPa}$ , porém a  $f_H$  não sofreu uma alteração significativa nesse mesmo bloqueio, indo de  $29,84 \text{ bpm} \pm 2,516 \text{ bpm}$  para  $27,84 \text{ bpm} \pm 2,351 \text{ bpm}$ .



**Figura 4.** Resposta cardiovascular, pressão arterial média (PAM - KPa) e frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm), à redução de volume vascular (- 30%). (A) e (B) apresentam a condição controle, com modulação autonômica íntegra. (C) e (D) demonstram as respostas sem a modulação cardíaca, após bloqueio  $\beta$ -adrenérgico. (E) e (F) apresentam as respostas cardiovasculares e após boqueio  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. (Anova de medidas repetidas- Tukey, 368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05).



**Figura 5.** Resposta cardiovascular, pressão arterial média (PAM - kPa) e frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm), à reposição de volume vascular (+ 30%). (A) e (B) apresentam a condição controle, com modulação autonômica íntegra. (C) e (D) demonstram as respostas sem a modulação cardíaca, após bloqueio  $\beta$ -adrenérgico. (E) e (F) apresentam as respostas cardiovasculares e após bloqueio  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. (Anova de medidas repetidas- Tukey,  $368,28 \text{ g} \pm 21,57 \text{ g}$ ;  $n=7$ ,  $p<0,05$ ).

**Tabela 1.** Pressão arterial média (PAM, kPA) e frequência cardíaca média ( $f_H$ , bpm) durante protocolo de redução e reposição de volume vascular em *Lithobates catesbeianus*. Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Asteriscos denotam diferenças entre o tratamento e a medida controle, que foi feita logo antes durante o protocolo. A eficácia dos bloqueios  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgico foram testados com teste t ou Wilcoxon, de acordo com as características de distribuição dos dados. Os experimentos de retirada e retorno de sangue foram analisados com Anova de medidas repetidas e Tukey, 368,28 g  $\pm$  21,57 g; n=7, p<0,05.

| Tratamento                            | PA (kPA)            | $f_H$ (bpm)        |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------|
| <b>Controle</b>                       | 3,235 $\pm$ 0,1126  | 22,91 $\pm$ 2,132  |
| <b>Antes da 1ª Fenilefrina</b>        | 3,325 $\pm$ 0,1730  | 24,87 $\pm$ 2,197  |
| <b>1ª Fenilefrina</b>                 | 3,554 $\pm$ 0,1641* | 22,46 $\pm$ 2,279* |
| <b>Antes do 1º Isoproterenol</b>      | 3,231 $\pm$ 0,1720  | 22,82 $\pm$ 2,133  |
| <b>1º Isoproterenol</b>               | 3,958 $\pm$ 0,2009* | 55,52 $\pm$ 6,635* |
| <b>Antes da 1ª retirada de sangue</b> | 3,053 $\pm$ 0,1039  | 34,34 $\pm$ 3,915  |
| <b>1ª retirada de sangue</b>          | 3,071 $\pm$ 0,1560  | 33,53 $\pm$ 2,524  |
| <b>Antes do 1º retorno de sangue</b>  | 3,081 $\pm$ 0,1683  | 33,30 $\pm$ 2,671  |
| <b>1º retorno de sangue</b>           | 3,582 $\pm$ 0,1821  | 27,37 $\pm$ 2,807  |
| <b>Antes do Propranolol</b>           | 3,584 $\pm$ 0,1839  | 27,01 $\pm$ 2,520  |
| <b>Propranolol</b>                    | 4,363 $\pm$ 0,3354  | 32,22 $\pm$ 1,783* |
| <b>Antes da 2ª retirada de sangue</b> | 3,444 $\pm$ 0,1662  | 22,69 $\pm$ 1,295  |
| <b>2ª retirada de sangue</b>          | 3,228 $\pm$ 0,1669  | 27,45 $\pm$ 2,595  |
| <b>Antes do 2º retorno de sangue</b>  | 3,237 $\pm$ 0,1545  | 27,16 $\pm$ 2,576  |
| <b>2º retorno de sangue</b>           | 3,884 $\pm$ 0,2717  | 26,15 $\pm$ 2,810  |
| <b>Antes da Fentolamina</b>           | 3,900 $\pm$ 0,2629  | 26,16 $\pm$ 2,911  |
| <b>Fentolamina</b>                    | 4,926 $\pm$ 0,3525  | 30,50 $\pm$ 1,249  |
| <b>Antes da 3ª retirada de sangue</b> | 3,764 $\pm$ 0,2737  | 28,37 $\pm$ 2,407  |
| <b>3ª retirada de sangue</b>          | 3,217 $\pm$ 0,1483  | 30,16 $\pm$ 2,316  |
| <b>Antes do 3º retorno de sangue</b>  | 3,152 $\pm$ 0,1457  | 29,84 $\pm$ 2,516  |
| <b>3º retorno de sangue</b>           | 3,635 $\pm$ 0,1494* | 27,84 $\pm$ 2,351  |
| <b>Antes da 2ª Fenilefrina</b>        | 3,590 $\pm$ 0,1456  | 25,88 $\pm$ 2,447  |
| <b>2ª Fenilefrina</b>                 | 3,745 $\pm$ 0,1342  | 26,24 $\pm$ 2,277  |
| <b>Antes do 2º Isoproterenol</b>      | 3,820 $\pm$ 0,1290  | 25,50 $\pm$ 2,427  |
| <b>2º Isoproterenol</b>               | 4,098 $\pm$ 0,1577* | 29,43 $\pm$ 2,632* |

## 4.2 Reatividade vascular

### 4.2.1 Estímulo de campo elétrico (EFS)

A estimulação por campo elétrico causou uma resposta de contração tanto na artéria pulmonar quanto na artéria mesentérica. Para as mesmas frequências de estimulação, EFS causou uma contração de maior amplitude na artéria pulmonar ( $0,61 \text{ mN} \pm 0,47 \text{ mN}$  com 0,5 Hz;  $8,46 \text{ mN} \pm 1,40 \text{ mN}$  com 16 Hz; Fig. 7A) do que na artéria mesentérica ( $0,39 \text{ mN} \pm 0,13 \text{ mN}$  com 0,5 Hz;  $3,38 \text{ mN} \pm 0,61 \text{ mN}$  com 16 Hz; Fig. 7B). A veia femoral não respondeu ao EFS (Fig. 7C). A ausência de resposta impossibilitou seu uso no protocolo de bloqueio farmacológico.

### 4.2.2 Bloqueio autonômico

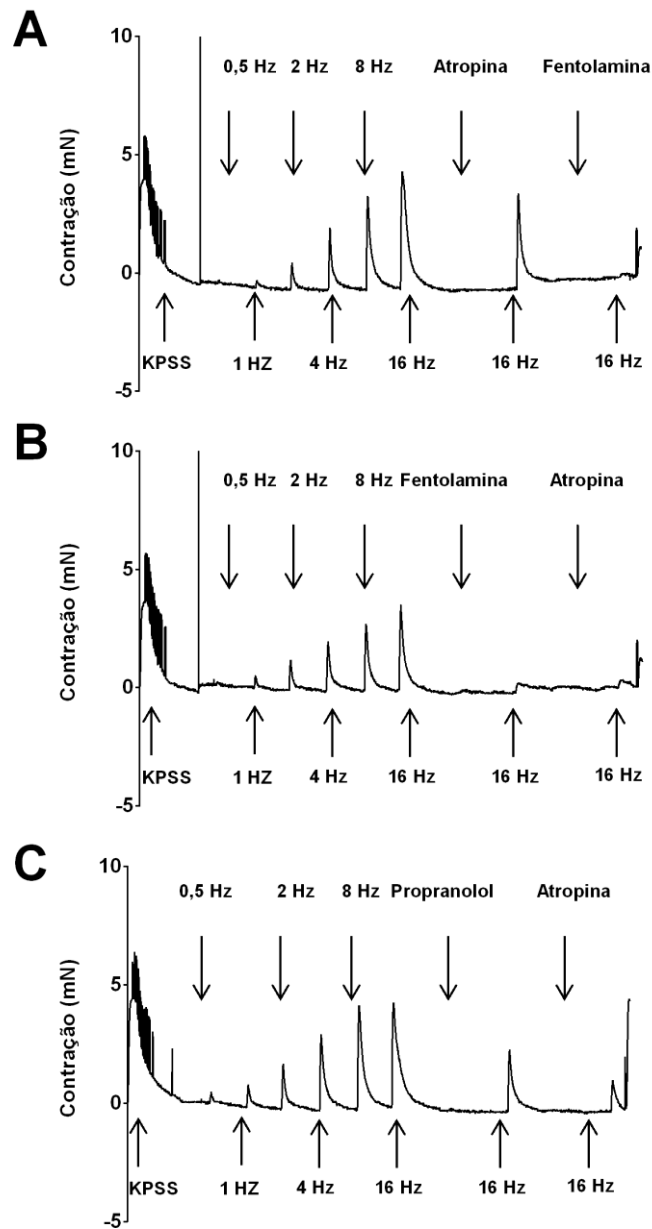
#### 4.2.2.1 Artéria pulmonar

A adição de atropina aboliu completamente as contrações causadas pelo EFS na artéria pulmonar, tanto no primeiro grupo ( $8,39 \text{ mN} \pm 1,96 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $0,07 \text{ mN} \pm 0,04 \text{ mN}$  após atropina; Fig. 8A) quanto no segundo grupo experimental ( $6,84 \text{ mN} \pm 1,22 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $-0,02 \text{ mN} \pm 0,02 \text{ mN}$  após atropina; Fig. 8B). Atropina também reduziu em cerca de 88% das contrações no terceiro grupo experimental ( $9,92 \text{ mN} \pm 3,50 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $1,29 \text{ mN} \pm 1,27 \text{ mN}$  após atropina; Fig. 8C). Fentolamina suprimiu cerca de 22% de contração no segundo grupo ( $6,84 \text{ mN} \pm 1,22 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $5,32 \text{ mN} \pm 0,93 \text{ mN}$  após fentolamina; Fig. 8B). Fentolamina também foi utilizado no primeiro grupo experimental, entretanto não foi possível quantificar seu poder de bloqueio após o uso da atropina. Propranolol reduziu as contrações em aproximadamente 4% ( $9,92 \text{ mN} \pm 3,50 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $9,54 \text{ mN} \pm 3,34 \text{ mN}$  após propranolol; Fig. 8C).

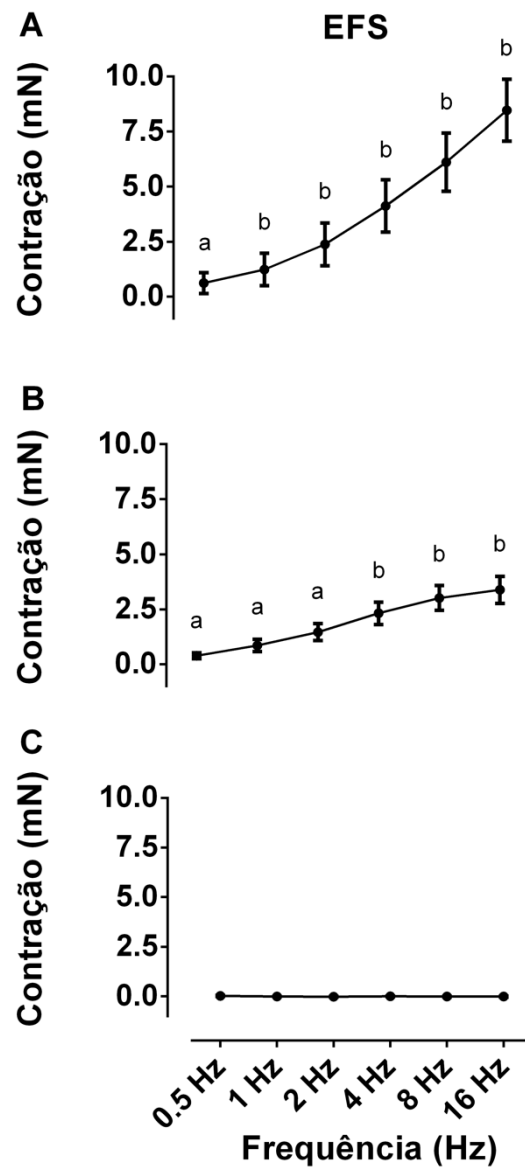
#### 4.2.2.2 Artéria mesentérica

Atropina bloqueou o efeito de contração da artéria mesentérica causada pelo EFS. A supressão foi de cerca de 15,4% de contração no primeiro grupo ( $3,95 \text{ mN} \pm 1,11 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $3,38 \text{ mN} \pm 1,19 \text{ mN}$  após atropina; Fig. 9A), e 3,8% ( $2,68 \text{ mN} \pm 0,52 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $0,18 \text{ mN} \pm 0,06 \text{ mN}$  após atropina; Fig. 9B) no segundo grupo. No terceiro grupo, atropina reduziu a contração em 39,4% ( $3,38 \text{ mN} \pm 1,28 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $0,62 \text{ mN} \pm 0,31 \text{ mN}$  após atropina; Fig. 9C). Fentolamina

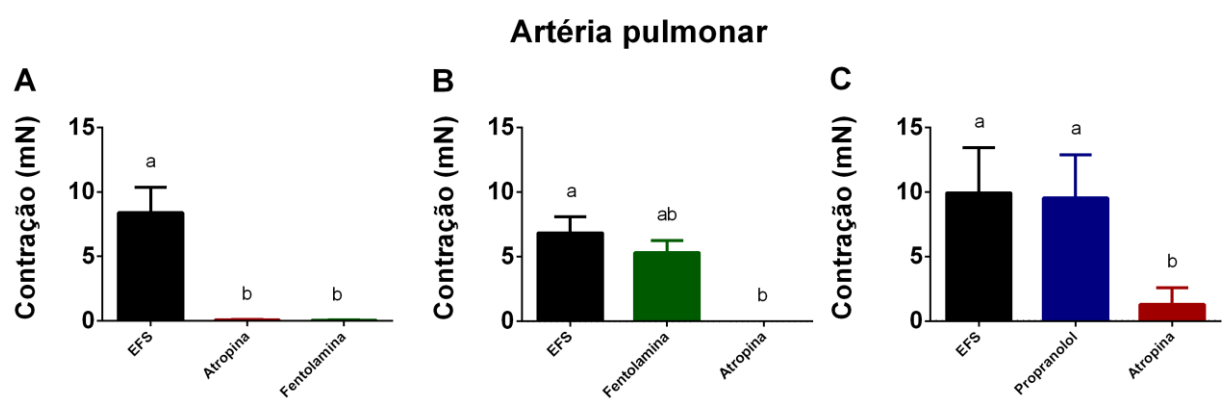
reduziu as contrações em cerca de 64,1% no primeiro grupo ( $3,95 \text{ mN} \pm 1,11 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $0,82 \text{ mN} \pm 0,50 \text{ mN}$  após fentolamina; Fig 9A), e 92,4% no segundo grupo ( $2,68 \text{ mN} \pm 0,52 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $0,27 \text{ mN} \pm 0,06 \text{ mN}$  após fentolamina; Fig 9C). No terceiro grupo, propranolol causou uma redução de 42,5% na contração ( $3,38 \text{ mN} \pm 1,28 \text{ mN}$  com 16 Hz para  $1,90 \text{ mN} \pm 0,68 \text{ mN}$  após fentolamina; Fig 9C). Entretanto, somente a atropina obteve um efeito estatisticamente significante (Fig. 9C).



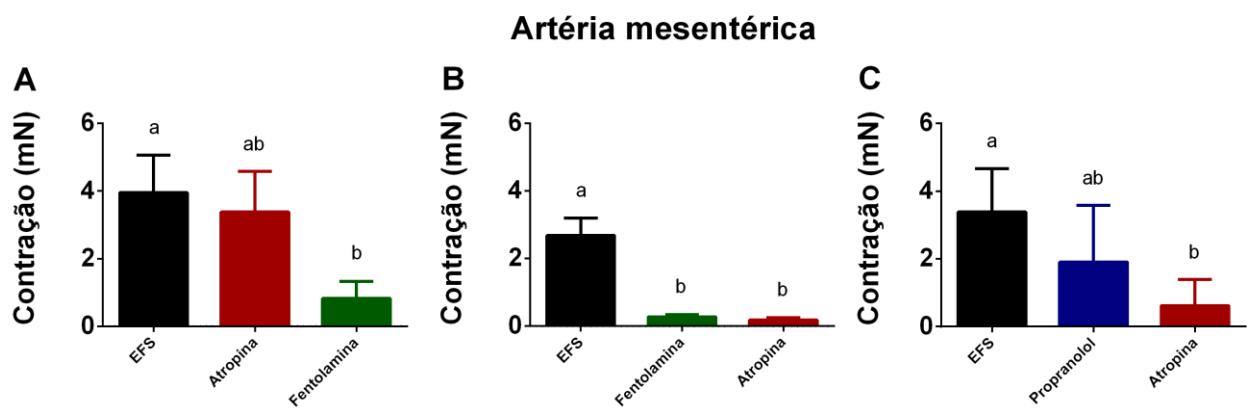
**Figura 6.** Registro original de artéria mesentérica durante protocolo de miografia. As setas apontam a resposta vascular à estimulação com KPSS, curva estímulo-resposta ao EFS e protocolo de bloqueio autonômico (Atropina  $10^{-5}$  M, fentolamina  $10^{-5}$  M e propranolol  $10^{-5}$  M). Estímulos de 16 Hz foram utilizados antes e após o tratamento com as drogas bloqueadoras: A) atropina e fentolamina; B) fentolamina e atropina; e C) propranolol e atropina.



**Figura 7.** Curva estímulo-resposta ao EFS da (A) artéria pulmonar, (B) artéria mesentérica e (C) veia femoral. Frequências de estímulo variam entre 0,5 Hz até 16 Hz. Dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam valores distintos (346,88 g  $\pm$  9,55 g; Friedman-Dunn,  $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Força de contração da artéria pulmonar gerada por EFS (16 Hz) antes e após bloqueio farmacológico com (A) atropina e fentolamina; (B) fentolamina e atropina e (C) propranolol e atropina. Letras diferentes indicam valores distintos ( $346,88 \text{ g} \pm 9,55 \text{ g}$ ; A- One-way ANOVA seguido de Tukey; B e C- Friedman seguido de Dunn;  $n=6$ ;  $p<0,05$ ).

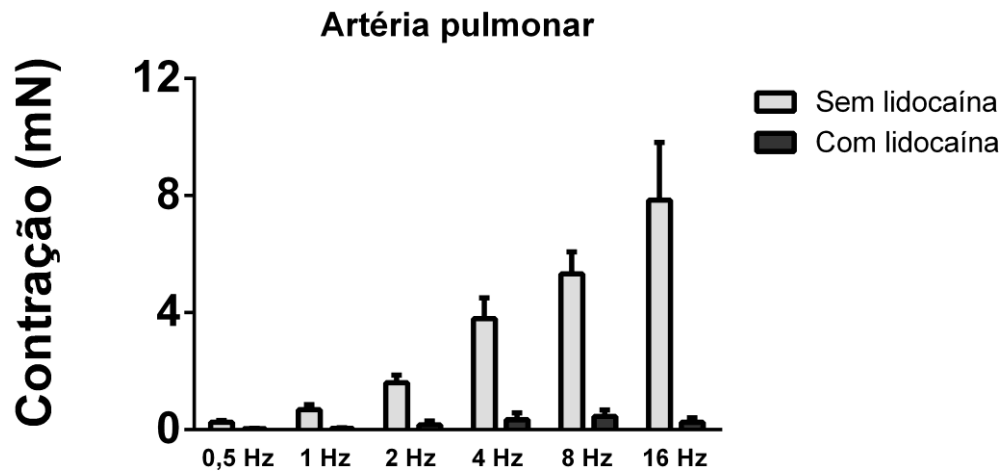


**Figura 9.** Força de contração da artéria mesentérica gerada por EFS (16 Hz) antes e após bloqueio farmacológico com (A) atropina e fentolamina; (B) fentolamina e atropina e (C) propranolol e atropina. Letras diferentes indicam valores distintos (346,88 g  $\pm$  9,55 g; A- One-way ANOVA seguido de Tukey; B e C- Friedman seguido de Dunn; n=6; p<0,05).

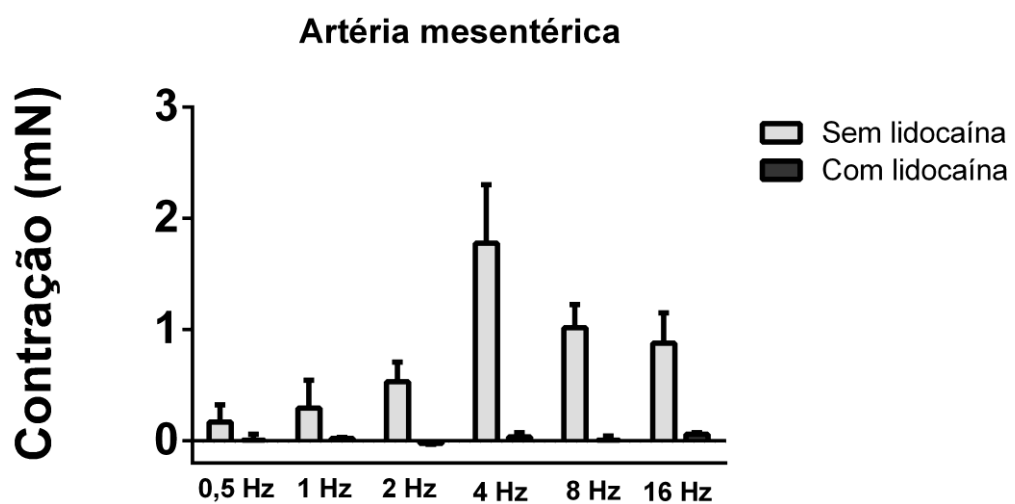
#### 4.2.3 Bloqueio com lidocaína

O uso da lidocaína causou bloqueio ao EFS tanto na artéria pulmonar quanto na artéria mesentérica. Na artéria pulmonar na frequência de 0,5 Hz a lidocaína causou um bloqueio de 88% da contração (0,25 mN  $\pm$  0,06 mN sem lidocaína e 0,03 mN  $\pm$  0 mN com lidocaína; Fig 10). Na frequência de 1 Hz, houve o bloqueio de 94% de contração (0,68 mN  $\pm$  0 mN sem lidocaína e 0,04 mN  $\pm$  0,02 mN com lidocaína; Fig 10). Com 2 Hz de frequência, houve bloqueio de 90% (1,60 mN  $\pm$  0,25 mN sem lidocaína e 0,16 mN  $\pm$  0,13 mN com lidocaína; Fig 10). Com 4 Hz, houve bloqueio de 91% (3,79 mN  $\pm$  0,71 mN sem lidocaína e 0,34 mN  $\pm$  0,22 mN com lidocaína; Fig 10). Com 8 Hz, houve bloqueio de 91% (5,35 mN  $\pm$  0,74 mN sem lidocaína e 0,45 mN  $\pm$  0,21 mN com lidocaína; Fig 10). E na frequência de 16Hz, houve bloqueio de 96% (7,84 mN  $\pm$  1,96 mN sem lidocaína e 0,25 mN  $\pm$  0,15 mN com lidocaína; Fig 10).

Já na artéria mesentérica, a frequência de 0,5 Hz causou bloqueio de contração de 81% (0,12 mN  $\pm$  0,09 mN sem lidocaína e -0,01 mN  $\pm$  0,03 mN com lidocaína; Fig 11). Na frequência de 1 Hz (0,19 mN  $\pm$  0,17 mN sem lidocaína e -0,02 mN  $\pm$  0 mN com lidocaína; Fig 11) houve um bloqueio de 94% da contração. Com 2 Hz, houve um bloqueio de 97% (0,35 mN  $\pm$  0,19 mN sem lidocaína e -0,03 mN  $\pm$  0,01 mN; Fig 11). Com 4 Hz, houve o bloqueio de 94% (1,19 mN  $\pm$  0,66 mN sem lidocaína e 0,06 mN  $\pm$  0,03 mN com lidocaína; Fig 11). O EFS com 8 Hz frequência causou um bloqueio de 98% (0,68 mN  $\pm$  0,34 mN sem lidocaína e 0 mN  $\pm$  0,02 mN com lidocaína; Fig 11) e, por fim, 91% de bloqueio com 16 Hz (0,73 mN  $\pm$  0,21 mN sem lidocaína e 0,06 mN  $\pm$  0 mN com lidocaína; Fig 11).



**Figura 10.** Força de contração de artéria pulmonar antes e após a aplicação de lidocaína ( $10^{-3}$  M). Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. ( $346,88 \text{ g} \pm 9,55 \text{ g}$ ; Friedman- Dunn,  $n=4$ ,  $p<0,05$ ).



**Figura 11.** Contração de artéria mesentérica antes e depois de lidocaína ( $10^{-3}$  M). Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. (346,88 g  $\pm$  9,55 g; Friedman- Dunn, n=3, p<0,05).

## 5 DISCUSSÃO

Apesar de anfíbios serem um grupo importante no entendimento de diversos aspectos de controle cardiovascular, há poucos trabalhos que tentam compreender seus aspectos modulatórios. Logo, esse trabalho se propôs a avaliar as características modulatórias no sistema cardiovascular, e com isso, foi possível observar que de modo geral, a modulação adrenérgica tem um papel moderado no controle vascular dessa espécie, já a modulação colinérgica é a maior responsável pela modulação no circuito pulmonar. Essas descobertas são de grande relevância, já que tentar entender os mecanismos que controlam o sistema cardiovascular de anuros nos ajuda a compreender os aspectos fisiológicos da evolução da modulação autonômica nos vertebrados. Entretanto, algumas dúvidas ficam com os resultados gerados nesse trabalho e que são ideias para trabalhos futuros a serem realizados com esse grupo, como por exemplo, por qual mecanismo as rãs conseguem controlar sua volemia durante hemorragia e qual o papel do sistema linfático nessa questão.

### 5.1 Hemorragia e controle autonômico de pressão arterial

Com o presente experimento, observamos que os parâmetros avaliados não sofreram mudanças consideráveis após alteração de volume vascular simulada por hemorragia em animais sem bloqueio autonômico e sem fonte de água externa. O resultado se manteve, mesmo após bloqueio  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico e sem água disponível durante o experimento. Nestes testes, não houve alterações significativas de PAM e  $f_H$ , indicando que o sistema adrenérgico não possui participação considerável no controle de PAM e  $f_H$  em hipovolemia; ou que a ação deste sistema pode ser compensada por outras modulações. Além disso, os mecanismos de modulação presentes são eficientes para a manutenção dos parâmetros cardiovasculares, tanto durante a redução de volume, quanto após seu retorno.

Alguns autores investigaram o efeito da redução de volume vascular nos parâmetros cardiovasculares de anfíbios. Michalicek e Campbell (1993) observaram que em *Rhinella marina*, a retirada de sangue causou um aumento de  $f_H$  e PAM, com posterior recuperação para os níveis pré-hemorrágicos. Entretanto, com o bloqueio autonômico, os autores puderam avaliar que o aumento de  $f_H$  pode ser causado pela liberação de catecolaminas. Estes autores indicaram que a redução de volemia pode causar aumento de tônus simpático, que leva a um aumento de  $f_H$  e evita uma queda

considerável de PAM. Por sua vez, Hillman e Withers (1988) investigaram o impacto da redução de volemia em *Rhinella marina* e *Lithobates catesbeianus*. Foi observado que, em *R. marina*, o fluxo sanguíneo sofre alterações após a retirada de 5% de sangue em relação ao peso inicial. Em *L. catesbeianus*, essas alterações ocorreriam após a retirada de 2%. Também foi observado que, em ambas as espécies, a frequência cardíaca máxima não sofreu alterações durante a perda de volume; houve declínio da pressão arterial média durante esse processo e que ocorreu um aumento da resistência periférica nesses animais.

Já em répteis, Smits e Lillywhite (1985) observaram que nas serpentes *Elaphe obsoleta* e *Crotalus viridis*, o volume sanguíneo perdido foi de menos de 50% do volume retirado durante o processo de redução de volemia. Também foram observadas que ambas as espécies recuperaram cerca de 90% do volume retirado depois de 2 horas do experimento. Isso ocorre devido à capacidade dessas espécies de mover o líquido extracelular para os compartimentos vasculares, recuperando o volume sanguíneo rapidamente.

Essas investigações também foram realizadas em aves e mamíferos. Ploucha e Fink (1986) investigaram o efeito da hemorragia em ratos e frangos conscientes, e os autores afirmaram que a ave manteve a PAM através de um mecanismo independente do tônus vascular periférico. O rato manteve a PAM através do reflexo cardíaco e respostas vasculares periféricas. Estes resultados indicam que diversos mecanismos podem estar presentes e envolvidos neste tipo de ajuste.

Alguns mecanismos podem estar relacionados com a manutenção dos parâmetros no presente estudo, incluindo a participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos vasculares. Estudos feitos em gatos evidenciam a importância do controle  $\beta$ -adrenérgico na reabsorção de líquidos para o compartimento vascular durante eventos de hemorragia. Lundvall e Hillman (1978) avaliaram o papel dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos com e sem bloqueio autonômico após redução de volemia. Foi observado que esses receptores são responsáveis pela dilatação dos vasos e esfíncteres proporcionando a absorção de líquido dos músculos para o sistema vascular. Hillman (1981) corrobora a ideia de que a absorção de líquido dos músculos para os vasos é modulada pelo sistema  $\beta$ -adrenérgico, e ainda conclui em seu trabalho que esse mecanismo atua em diferentes níveis de hipovolemia.

O bloqueio  $\beta$ -adrenérgico realizado no presente experimento não causou mudanças significativas nos parâmetros vasculares avaliados, indicando que esses receptores podem não ter papel considerável na manutenção de volume sanguíneo ou há sinergia em mecanismos moduladores vasculares para tal ajuste. O sistema  $\alpha$ -

adrenérgico também está relacionado com a manutenção de volume, foi visto que em ratos nefrectomizados, a ativação  $\alpha$ -adrenérgica durante hemorragia causa um aumento da concentração de íons potássio no plasma, o que acarreta no movimento de fluido intracelular para os vasos sanguíneos (NAGASHIMA, 1995). Apesar de ambos os sistemas estarem envolvidos no controle de volume após hemorragia, no presente estudo, o único parâmetro que sofreu alteração após o bloqueio duplo foi a PAM após o retorno de sangue, os outros parâmetros não sofreram alterações consideráveis.

A circulação linfática não foi avaliada no presente estudo, entretanto, esse sistema está intimamente ligado com a manutenção de volume sanguíneo. Desta forma, não podemos descartar o seu papel nos resultados apresentados. O papel deste sistema já foi avaliado em estudos de redução de volemia. Cope e Litwin (1962) avaliaram o papel desse sistema em cães. Foi observado que após eventos de hemorragia, o fluxo proveniente do sistema linfático aumenta consideravelmente e se mantém constante por 24 horas, causando um aumento tanto de plasma quanto de proteínas presente na corrente sanguínea. Já em anfíbios, Baustian (1988) averiguou o papel do sistema linfático na compensação de volume sanguíneo em *Rhinella marina*. Após retirada de 74% do volume inicial de sangue em animais com o coração linfático destruído, foi observado que não houve recuperação de volume sanguíneo. Os animais morreram após 1 a 3 dias do início do protocolo, após um período de hemoconcentração. Zwemer e Foglia (1943) observaram que após a destruição dos corações linfáticos, houve uma acumulação de líquido no interstício de *Rhinella arenarum*. Tal acúmulo formou edema e com a falta de um sistema para recuperar o líquido aos vasos sanguíneos, o problema levou os animais à morte. Hillman (2018) afirma que o único mecanismo possível para anuros controlarem o volume sanguíneo frente à perda de plasma é através do retorno de líquido intersticial promovido pelo sistema linfático, já que esse grupo é incapaz de produzir pressão suficiente para mover o líquido intersticial aos capilares e assim fazer a correção de volume. O sistema autonômico parece ter papel fundamental na regulação do sistema linfático em anfíbios. Crossley e Hillman (1999) observaram que o coração linfático de *Rhinella marina* está sob controle dos barorreceptores localizados na artéria pulmocutânea. Em situações onde ocorre aumento de pressão arterial no animal, há queda na frequência de contração dos corações linfáticos, diminuindo o retorno de líquido ao sistema cardiovascular.

A presença de inervação efetiva em seções vasculares e o tipo de modulação autonômica vascular compõem informações relevantes para a compreensão dos fatores modulatórios e capacidade de ajustes frente a variações de volemia. Investigações *in vitro*, com reatividade vascular podem ajudar a explicar parte dos mecanismos presentes.

## 5.2 Reatividade vascular

### 5.2.1 Artéria pulmonar

Com o presente experimento, foi possível observar que há controle colinérgico na artéria pulmonar e que ela é responsável por 100% da contração causada pelo EFS, já que atropina aboliu completamente a resposta ao estímulo elétrico. Essa informação corrobora algumas observações prévias no sapo-cururu, *Rhinella marina* (CAMPBELL, 1971), no qual a estimulação vagal causou um aumento da resistência vascular pulmonar dependente do sistema colinérgico. Além disso, constrição arterial pulmonar causada pelo truncus vago-simpático foi dependente da atividade colinérgica na rã *Lithobates pipiens* (LUCKHARDT; CARLSON, 1921). Similarmente, o nervo vago foi apontado como a eferência vasomotora nos vasos pulmonares na rã *Xenopus laevis* (EMILIO; SHELTON, 1972).

A relevância do sistema parasimpático no controle do desvio intracardíaco através da modulação excitatória colinérgica vagal da artéria pulmonar foi descrita em diferentes espécies de répteis, como em quelônios e squamatas (MILSOM; LANGILLE; JONES, 1977; LILLYWHITE; DONALD, 1989; TAYLOR et al., 2009; LEITE et al., 2013; LEITE et al., 2014; KIRBY; SMITH; CROSSLEY, 2019; BURGGREN, 1978). Infelizmente, estas informações são dispersas e incipientes e apesar de evidências, há muito pouca informação contundente acerca da inervação e dimensão da resposta. Em squamatas, a inervação colinérgica foi relatada com uma distribuição por toda a extensão das artérias pulmonares (FILOGONIO et al., 2020).

Nossos resultados contribuem para a ideia de que o controle excitatório colinérgico da artéria pulmonar tem um papel fundamental no controle do desvio intracardíaco, ideia que é contrária da hipótese de que a direção do sangue no desvio é puramente controlada por diferentes distensibilidades de vasos sistêmicos e pulmonares (HILLMAN; HEDRICK; KOHL, 2014; FILOGONIO; LEITE; WANG, 2017 a), ou como resultado do balanço de resistências periféricas nos dois circuitos (BURGGREN; FILOGONIO; WANG, 2020).

Répteis tem sido o principal grupo para estudos do desvio sanguíneo intracardíaco (LEITE et al., 2013; LEITE et al., 2014; EME et al., 2009; EME et al., 2010; BURGGREN; FILOGONIO; WANG, 2020). Contudo, sugerimos que anfíbios podem ser um grupo chave na compreensão de diversos aspectos acerca da modulação vascular: a inervação vascular parasimpática, sua relevância no suporte hemodinâmico frente as alterações causadas pelo uso do ambiente terrestre, o controle do desvio intra-cardíaco, e também para obter algumas ideias referentes ao processo evolutivo referente a redução desta inervação em grupos de maior demanda metabólica.

Ademais, nós observamos que os bloqueadores adrenérgicos  $\alpha$  e  $\beta$  não causaram uma diminuição significativa da resposta ao EFS. Esse resultado é similar aquele que indica o pequeno efeito depressor mediado pelo sistema adrenérgico na pressão de perfusão em *R. marina*, onde há uma inervação adrenérgica reduzida na artéria pulmonar (CAMPBELL, 1971). A estimulação adrenérgica parece ter um efeito reduzido no circuito pulmonar em pulmonados não mamíferos, quando comparado com a regulação colinérgica. Por exemplo, a fenilefrina, um agonista  $\alpha$ -adrenérgico, causou uma pequena contração na artéria pulmonar, enquanto o isoproterenol, um agonista  $\beta$ -adrenérgico, causou uma pequena vasodilatação na piramboia africana, *Protopterus aethiopicus* (FILOGONIO; LEITE; WANG, 2017 b). De maneira similar, em répteis, a estimulação  $\alpha$ -adrenérgica induz uma pequena vasoconstrição, com pouca ou nenhuma vasodilatação causada pela estimulação  $\beta$ -adrenérgica (HICKS, 1994; OVERGAARD et al., 2002; GALLI et al., 2007; FILOGONIO et al., 2020). Entretanto, a falta de resposta adrenérgica ao EFS no nosso estudo não refuta a presença de receptores adrenérgicos na artéria pulmonar e o papel das catecolaminas circulantes.

### 5.2.2 Artéria mesentérica

A artéria mesentérica teve sua resposta de contração bloqueada pela fentolamina e em menor grau pela atropina, ocorrendo uma falta de bloqueio pelo propranolol. Esses resultados indicam presença de controle  $\alpha$ -adrenérgico e em menor grau muscarínico na artéria mesentérica de *L. catesbeianus*.

A relevância da inervação simpática na circulação sistêmica também foi observada em *R. marina*. Essa espécie foi descrita como tendo uma inervação adrenérgica extensa no seu sistema vascular. Fibras nervosas adrenérgicas inervam a sua artéria pulmonar (HALLER; ROGERS, 1978); todos os vasos pré-glomerulares,

incluindo a aorta dorsal possuem inervação adrenérgica (MORRIS; GIBBINS, 1983); além disso, um conjunto de axônios adrenérgicos está presente em todas as artérias principais (MORRIS et al, 1986).

Na cascavel, *C. durissus*, a contração vascular do circuito sistêmico é mediada por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, já a vasodilatação é mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (GALLI et al., 2007). Na “cobra-rato”, *Elaphe obsoleta*, os vasos sistêmicos são densamente inervados por nervos adrenérgicos e esse tipo de inervação sugere a presença de um mecanismo mediado por inervação adrenérgica para o controle de fluxo sanguíneo em casos onde ajustes a gravidade são necessários (DONALD; LILLYWHITE, 1988). Da mesma maneira, na circulação sistêmica de tartarugas, *Trachemys scripta*, receptores  $\alpha$ -adrenérgicos são responsáveis pela constrição, observado após injeção de norepinefrina, e também são responsáveis pelo tônus vascular, que foi validado pela injeção de fentolamina (OVERGAARD et al., 2002).

Além do controle adrenérgico, há o controle colinérgico presente na artéria mesentérica de *L. catesbeianus*. A presença de controle muscarínico na musculatura vascular havia sido mencionada anteriormente por Campbell e colaboradores (1978) onde foi visto a presença de inervação colinérgica no músculo liso da vasculatura pulmonar de *B. marinus*. Já Siggins e Weitsen (1971) observaram que há inervação colinérgica das arteríolas e esfíncteres pré-capilares na membrana retrolingual de *Lithobates pipiens*.

Logo, podemos observar a importância do controle adrenérgico e em parte colinérgico na artéria mesentérica de *L. catesbeianus*. É interessante que esta modulação esteja presente em vasos sistêmicos em anfíbios. Ainda há muito pouco conhecimento sobre dispersão de tal característica em grupos de vertebrados. Informações como esta são essenciais para entender qual é o padrão dos grupos, e também para especular quais os fatores seletivos que provocaram as alterações entre os padrões existentes. Atualmente, as análises tomam o padrão dos mamíferos como referência para análises e conjecturas. Contudo, tais procedimentos podem levar a conjecturas inconsistentes, já que as inferências sobre as modulações com base em mamíferos podem estar tomando uma exceção como padrão.

### 5.2.3 Veia femoral

A veia femoral não respondeu ao EFS, logo, inferimos uma falta de controle autonômico nervoso nesse vaso. A inervação do compartimento venoso tem um papel

fundamental nos ajustes de retorno venoso e, conseqüentemente, nos ajustes de débito cardíaco (GUYTON, 1955; JOYCE; WANG, 2020). Portanto, tal resultado foi inesperado. A relevância da inervação adrenérgica no retorno venoso foi observada e bem descrita em mamíferos (GUYTON, 1955; JOYCE; WANG, 2020). Contrações consideráveis causadas por EFS foram descritas para a veia safena em cães ((VANHOUTTE; CLEMENT; LEUSEN, 1967) e veia femoral de ratos (MANDEL et al., 2013). Da mesma maneira, o mesmo efeito foi observado em vertebrados ectotérmicos, como as serpentes (DONALD; LILLYWHITE, 1988) e lagartos (FURNESS; MOORE, 1970).

Apesar de termos utilizado uma veia de alto calibre para esse experimento, foi utilizado somente um segmento da seção vascular deste animal. Anfíbios possuem uma circulação respiratória dividida entre os circuitos pulmonar e cutâneo. Estes retornam no circuito pulmonar e sistêmico, respectivamente. Assim, o retorno venoso sistêmico é complexo já que parte dele origina-se no sistema respiratório (FARMER, 1999). Um arranjo tão complexo como este pode ter os pontos modulatórios relevantes em alguns locais discretos do compartimento venoso. A análise de tal aspecto requer um experimento dedicado envolvendo estimulação nervosa *in situ*, com registro concomitante de múltiplos pontos da vasculatura; ou experimentos *in vitro*, envolvendo a reatividade vascular de múltiplos segmentos da seção venosa.

De outro modo, catecolaminas circulantes podem controlar parte da modulação venosa. Por exemplo, em elasmobrânquios, constrição  $\alpha$ -adrenérgica foi importante no controle do tônus dos vasos, e estimulação  $\beta$ -adrenérgica causou relaxamento na vasculatura venosa (SANDBLOM; AXELSSON; FARRELL, 2006). Em cascavéis, o sistema venoso está sob considerável regulação adrenérgica (SKALS et al., 2005). Em cães, fenilefrina reduziu a capacidade periférica vascular, causando uma mudança do sangue venoso para a circulação arterial (APPLETON et al., 1985). O controle adrenérgico das veias posteriores é considerado como um mecanismo importante na regulação da hemodinâmica de *Elaphe obsoleta* em relação a sua capacidade de suportar alterações hemodinâmicas ortostáticas (CONKLIN et al., 1996). Isso é especialmente importante para animais terrestres que necessitam sobreviver frente às dificuldades hemodinâmicas causadas pela gravidade, especialmente às contrárias ao retorno venoso. Animais aquáticos possuem as forças gravitacionais contrabalanceadas pelo empuxo da coluna d'água e assim o retorno venoso não enfrenta tais problemas. Infelizmente, não há estudos suficientes sobre a regulação vascular venosa em anfíbios. Esse grupo é chave na compreensão de

como a regulação venosa se desenvolveu nos vertebrados e como foi alterada com a capacidade de uso do meio terrestre.

#### 5.2.4 Bloqueio com lidocaína

Nossos resultados indicam que a contração causada pelo EFS é de fato causada pelas terminações nervosas presentes nos vasos. Em nosso estudo, foi visto que há um bloqueio claro da resposta ao EFS na presença de lidocaína à  $10^{-3}$  M, tanto na artéria pulmonar (Fig. 5) quanto na artéria mesentérica (Fig. 6). Isso está de acordo com relatos sobre o mecanismo de ação deste fármaco, que nos quais foi descrito que a lidocaína tem um papel inibidor na resposta da corrente voltagem-dependente de canais de sódio e potássio (BRÄU; VOGEL; HEMPELMANN, 1998) e também cálcio (XU et al., 2003). O mecanismo também foi observado em células nervosas de rato isoladas por Kaneda e colaboradores (1989). Estes autores relataram que a lidocaína causava um bloqueio na corrente voltagem-dependente de sódio. Oyama e colaboradores (1989) observaram que em *L. catesbeianus*, a lidocaína causou uma diminuição da amplitude de resposta voltagem-dependente dos canais de cálcio a partir da concentração de  $10^{-5}$  M e foi completamente bloqueada em uma concentração de  $10^{-3}$  M. Além disso, nesse mesmo estudo foi observado que a lidocaína também causou uma diminuição na corrente voltagem-dependente dos canais de sódio, causando uma diminuição de corrente a partir da concentração de  $10^{-6}$  M e bloqueio total em  $10^{-2}$  M. Logo, podemos afirmar que os resultados obtidos em resposta ao estímulo elétrico em artéria pulmonar e artéria mesentérica, no presente trabalho, ocorrem devido a presença de terminações nervosas nos vasos avaliados. Os demais segmentos não teriam inervação presente.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho traz algumas informações novas sobre a modulação vascular de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), entre elas, a importância relativa do controle adrenérgico nessa espécie. Pudemos averiguar que apesar de estar presente no circuito sistêmico, a regulação adrenérgica não é a única responsável pelo controle de PAM, já que em uma situação de hipovolemia o bloqueio duplo adrenérgico, inativando ajustes simpáticos vasculares e cardíacos, não demonstrou ter grande efeito sobre os parâmetros vasculares avaliados. Além disso, observamos que o controle colinérgico está presente e tem um grau de importância maior no circuito pulmonar. O controle adrenérgico é preponderante no circuito sistêmico.

## 7 REFERÊNCIAS

- APPLETON, C., OLAJOS, M., MORKIN E., GOLDMAN S. Alpha-1 Adrenergic control of the venous circulation intact dogs. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 233, p. 729-734, 1985.
- ARMELIN, V. A. et al. Autonomic control of heart rate during orthostasis and the importance of orthostatic-tachycardia in the snake Python molurus. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 184, n. 7, p. 903–912, out. 2014.
- BAGSHAW, R. J. EVOLUTION OF CARDIOVASCULAR BARORECEPTOR CONTROL. **Biological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 121–162, maio 1985.
- BAUSTIAN, M. The Contribution of Lymphatic Pathways during Recovery from Hemorrhage in the Toad Bufo marinus. **Physiological Zoology**, v. 61, n. 6, p. 555–563, nov. 1988.
- BEVAN, J. A.; LAHER, I. Pressure and flow-dependent vascular tone. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 9, p. 2267–2273, jun. 1991.
- BRÄU, M, E; VOGEL, W; HEMPELMANN, G. Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in peripheral nerve. **Anesth Analg**, v. 87, p.885-889, 1998.
- BURGGREN, W, W. Influence of intermittent breathing on ventricular depolarization patterns in chelonian reptiles. **J. Physiol**, v, 278, p, 349-364, 1978.
- BURGGREN, W.; FILOGONIO, R.; WANG, T. Cardiovascular shunting in vertebrates: a practical integration of competing hypotheses. **Biological Reviews**, v. 95, n. 2, p. 449–471, abr. 2020.
- CAIRIOLI, V, J; CROUT, J, R. Role of the autonomic nervous system in the resting tachycardia of experimental hyperthyroidism. **Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, v.158, p,55-65, 1 out 1967.
- CAMPBELL, G. Autonomic innervation of the pulmonary vascular bed in a toad (Bufo marinus). **Comparative and General Pharmacology**, v. 2, n. 7, p. 287–294, set. 1971.
- CAMPBELL, G.; HALLER, C. J.; ROGERS, D. C. Fine structural and cytochemical study of the innervation of smooth muscle in an amphibian (Bufo marinus) lung before and after denervation. **Cell and Tissue Research**, v. 194, n. 3, dez. 1978.
- CAMPOS, R. et al. Electrical field stimulation-induced contractions on Pantherophis guttatus corpora cavernosa and aortae. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0196123, 19 abr. 2018.
- CLAËSSON, D.; ABE, A. S.; WANG, T. Autonomic regulation of heart rate during specific dynamic action associated with digestion in the bullfrog Lithobates catesbeianus. **Zoologia (Curitiba)**, v. 32, n. 6, p. 492–496, dez. 2015.
- COLEMAN, T. G. Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 238, n. 4, p. H515–H520, 1 abr. 1980.
- CONKLIN, D. J. et al. Blood vessel adaptation to gravity in a semi-arboreal snake. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 165, n. 7, p. 518–526, jan. 1996.

- COPE, O.; LITWIN, S. B. Contribution of the Lymphatic System to the Replenishment of the Plasma Volume Following a Hemorrhage: **Annals of Surgery**, v. 156, n. 4, p. 655–667, out. 1962.
- COWLEY, A. W. Long-term control of arterial blood pressure. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 231–300, 1 jan. 1992.
- CROSSLEY II, D. A.; HILLMAN, S. S. The Role of Pulmocutaneous Baroreceptors in the Control of Lymphatic Heart Rate in the Toad *Bufo marinus*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 72, n. 1, p. 109–115, jan. 1999.
- DONALD, J, A., LILLYWHITE, H, B. Adrenergic innervation of the large arteries and veins of the semiarboreal rat snake *Elaphe obsoleta*. **J Morphol**, v. 198, p. 25-32, 1988.
- EME, J; GWALTHNEY, J; BLANK, J, M; OWERKOWICZ, T; BARRON, G; HICKS, J,W. Surgical removal of right-to-left cardiac shunt in the American alligator (*Alligator mississippiensis*) causes ventricular enlargement but does not alter apnoea or metabolism during diving. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 3553–3563, 2009.
- EME, J.; GWALTHNEY, J.; OWERKOWICZ, T., BLANK, J. M. & HICKS, J. W. Turning crocodylian hearts into bird hearts: growth rates are similar for alligators with and without right-to-left cardiac shunt. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 2673–2680, 2010.
- EMILIO, M. G.; SHELTON, G. Factors affecting blood flow to the lungs in the amphibian, *Xenopus laevis*. **Journal Experimental Biology**, v. 56, p. 67-77, 1972.
- FARMER, C. G. Evolution of the vertebrate cardio-pulmonary system. **Annual Review of Physiology**, v. 61, n. 1, p. 573–592, mar. 1999.
- FILOGONIO, R; LEITE, C, A, C; WANG, T. Vascular distensibilities have minor effects on intracardiac shunt in reptiles. **Zoology**, v.122, p.46-51, 2017a.
- FILOGONIO, R; JOYCE, W; WANG, T. Nitrgergic cardiovascular regulation in the African lungfish *Protopterus aethiopicus*.**Comp Biochem Physiol**, v. 207, p. 52-56. 2017b.
- FILOGONIO, R. et al. Evaluation of the sequence method as a tool to assess spontaneous baroreflex in reptiles. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 331, n. 7, p. 374–381, ago. 2019.
- FILOGONIO, R. et al. Cholinergic regulation along the pulmonary arterial tree of the South American rattlesnake: vascular reactivity, muscarinic receptors, and vagal innervation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 319, n. 2, p. R156–R170, 1 ago. 2020.
- FURNESS, J. B.; MOORE, J. The adrenergic innervation of the cardio-vascular system of the lizard *Trachysaurus rugosus*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 108, n. 2, p. 150–176, 1970.
- GALLI, G. L. J. et al. The adrenergic regulation of the cardiovascular system in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 3, p. 510–520, nov. 2007.
- GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. **Biological Invasions**, v. 10, n. 5, p. 585–590, jun. 2008.

- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, maio 2006.
- GUYTON, A. C. Determination of cardiac output by equating venous return curves with cardiac response curves. **Physiol Rev**, v. 35, p. 123–129, 1955.
- HAINSWORTH, R. Cardiovascular control from cardiac and pulmonary vascular receptors: Cardiac and pulmonary reflexes. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 2, p. 312–319, 1 fev. 2014.
- HALLER, C. J.; ROGERS, D. C. The innervation and fine structure of paraneuronic cells in an amphibian pulmonary artery. **Cell and Tissue Research**, v. 195, n. 3, dez. 1978.
- HICKS, J. W. Adrenergic and Cholinergic Regulation of Intracardiac Shunting. **Physiological Zoology**, v. 67, n. 6, p. 1325–1346, nov. 1994.
- HILLMAN, J. Further studies on beta-adrenergic control of transcapillary fluid absorption from skeletal muscle to blood during hemorrhage. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 112, n. 3, p. 281–286, jul. 1981.
- HILLMAN, S. S. Some effects of dehydration on internal distributions of water and solutes in *Xenopus laevis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 61, n. 2, p. 303–307, jan. 1978.
- HILLMAN, S, S; HEDRICK, M, S; KOHL, Z, F. Net cardiac shunts in anuran amphibian: physiology or physics. **Journal of Experimental Biology**, v. 2017, p. 2844-2847, 2014.
- HILLMAN, S. S. Anuran amphibians as comparative models for understanding extreme dehydration tolerance: a unique negative feedback lymphatic mechanism for blood volume regulation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 315, n. 4, p. R790–R798, 1 out. 2018.
- HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C. The hemodynamic consequences of hemorrhage and hypernatremia in two amphibians. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 157, n. 6, p. 807–812, 1988.
- HILLMAN, S.; WITHERS, P.; KIMMEL, P. Plasma catecholamines with hemorrhage in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 280, n. 2, p. 174–181, 1 fev. 1998.
- HOLT, J. P. et al. The regulation of arterial blood pressure. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 146, n. 3, p. 410–421, 1 jun. 1946.
- JOYCE, W.; WANG, T. What determines systemic blood flow in vertebrates? **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 4, p. jeb215335, 15 fev. 2020.
- KAEFER, I, L; BOELTER, R,A; CECHIN, S, Z. Reproductive biology of the invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in southern Brazil. **Ann. Zool. Fennici**, v. 44, p.435-444, 19 dez 2007.
- KANEDA, M; OYAMA, Y; IKEMOTO, Y; AKAIKE, N. Blockade of the voltage-dependent sodium current in isolated rat hippocampal neurons by tetrodotoxin and lidocaine. **Brain Research**, v.484, p.348-351, 1989.
- KIRBY, A, R.; SMITH, B.; CROSSLEY, D, A. Regulation of blood flow in the pulmonary and systemic circuits during submerged swimming in common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). **Journal of Experimental Biology**, v, 222, 2019.

- LEITE, C. A. C.; TAYLOR, E. W.; WANG, T.; ABE, A. S.; ANDRADE, D. O. V. de. Ablation of the ability to control the right-to-left cardiac shunt does not affect oxygen uptake, specific dynamic action or growth in the rattlesnake *Crotalus durissus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 1881–1889, 2013.
- LEITE, C. A. C. et al. Loss of the Ability to Control Right-to-Left Shunt Does Not Influence the Metabolic Responses to Temperature Change or Long-Term Fasting in the South American Rattlesnake *Crotalus durissus*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 87, n. 4, p. 568–575, jul. 2014.
- LEIVAS, P. T.; LEIVAS, F. W. T.; MOURA, M. O. Diet and trophic niche of *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Anura). **Zoologia (Curitiba)**, v. 29, n. 5, p. 405–412, out. 2012.
- LILLYWHITE, H. B. Gravity, blood circulation, and the adaptation of form and function in lower vertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 275, n. 2–3, p. 217–225, 1 jun. 1996.
- LILLYWHITE, H.; DONALD, J. Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. **Science**, v. 245, n. 4915, p. 293–295, 21 jul. 1989.
- LUCKHARDT, A. B.; CARLSON, A. J. Studies on the visceral sensory nervous system. **American Journal of Physiology**, v. 56, p. 72-112, 1 mai. 1921.
- LUNDEVALL, J.; HILLMAN, J. Fluid transfer from skeletal muscle to blood during hemorrhage Importance of beta adrenergic vascular mechanisms. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 102, n. 4, p. 450–458, abr. 1978.
- MALVIN, G. M.; DAIL, W. G. Adrenergic innervation of the gills, pulmonary arterial plexus, and dorsal aorta in the neotenic salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Journal of Morphology**, v. 189, n. 1, p. 67–70, jul. 1986.
- MANDEL, Y. et al. Vasoconstriction by Electrical Stimulation: New Approach to Control of Non-Compressible Hemorrhage. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2111, dez. 2013.
- MANDOKI, J. J. et al. Pulsatile diastolic increase and systolic decrease in arterial blood pressure: Their mechanism of production and physiological role. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 112, n. 3, p. 55–57, ago. 2013.
- MEDEIROS, C. I. et al. Reproductive phenology of the American Bullfrog in subtropical Brazil: photoperiod as a main determinant of seasonal activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3 suppl, p. 1909–1921, 11 jul. 2016.
- MICHALICEK, J.; CAMPBELL, G. Autonomic regulation of heart rate and blood pressure in hemorrhaged toads. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 2, p. R262–R267, 1 fev. 1993.
- MILLARD, R. W.; MOALLI, R. Baroreflex sensitivity in an amphibian, *Rana catesbeiana*, and a reptilian, *Pseudemys scripta elegans*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 213, n. 2, p. 283–288, ago. 1980.
- MILSOM, W, K.; LANGILLE, B, L.; JONES, D, R. Vagal control of pulmonary vascular resistance in the turtle *Chrysemys scripta*. **Can J Zool**, v. 55, p. 359-367. 1977.
- MITCHELL, M. A. Anesthetic Considerations for Amphibians. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, n. 1, p. 40–49, jan. 2009.
- MORRIS, J, L.; GIBBINS, L, L.; CAMPBELL, G.; MURPHY, R.; FURNESS, J, B.; COSTA, M. Innervation of the large arteries and heart of the toad (*Bufo marinus*)

- by adrenergic and peptide-containing neurons. **Cell. Tissue. Res**, v. 243, p. 171-184, 1986.
- MORRIS, JUDITHL.; GIBBINS, IANL. Innervation of the renal vasculature of the toad (*Bufo marinus*). **Cell and Tissue Research**, v. 231, n. 2, maio 1983.
- NAGASHIMA, K. Effects of  $\alpha$ -Adrenergic Activation on the Shift of Electrolytes and fluid after hemorrhage in rats. **Japanese Journal of Pjysiology**, v.45, p.381-395, 24 mar 1995.
- OYAMA, Y; SADOSHIMA, J; TOKUTOMI, N; AKAIKE, N. Some properties of inhibitory action of lidocaine on the  $Ca^{2+}$  current of single isolated frog sensory neurons. **Brain Research**, v.442, p. 223-228, 1988.
- OKAMOTO, K.; TAGAWA, T. Aminergic, Cholinergic and Peptidergic Innervation of Hepatic Portal Vein in the Anuran Amphibians. **Zoological Science**, v.7, p. 605-612, 1990.
- OVERGAARD, J. et al. Adrenergic control of the cardiovascular system in the turtle *Trachemys scripta*. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 21, p. 3335–3345, 1 nov. 2002.
- PLOUCHA, J. M.; FINK, G. D. Hemodynamics of hemorrhage in the conscious rat and chicken. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 251, n. 5, p. R846–R850, 1 nov. 1986.
- PROSSER, C, L; WEINSTEIN, S, J, F, Comparison of blood volume in animals with open and closed circulatory systems. **Physiological Zoology**, v. 23, n. 2, p. 113-124, 1950.
- RODRIGUES, G. J. et al. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 3, p. 331–337, out. 2011.
- SANDBLUM, E.; AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 5, p. 821–829, 1 mar. 2005.
- SANDBLUM, E.; AXELSSON, M.; FARRELL, A. P. Central venous pressure and mean circulatory filling pressure in the dogfish *Squalus acanthias*: adrenergic control and role of the pericardium. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 5, p. R1465–R1473, nov. 2006.
- SANDBLUM, E et al. Cardiac reflexes in a warming world: thermal plasticity of barostatic control and autonomic tones in a temperate fish. **Journal of Experimental Biology**, v.219, p.2880-2887, 2016.
- SEYMOUR, R,S; LILLYWHITE, H, B. Blood pressure in snakes from different habitats. **Nature**, v.264, p.664-666, 1976.
- SIGGINS, G, R; WEITSEN, H, A. Cytochemical and physiological evidence for cholinergic. neurogenic vasodilation of amphibian arterioles and precapillary sphincters. **Microvascular Research**, v.3, p.208-322, 1971.
- SHOEMAKER, V. H. The effects of dehydration on electrolyte concentrations in a toad, *Bufo marinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 13, n. 3, p. 261–271, nov. 1964.
- SKALS, M. et al. Venous tone and cardiac function in the South American rattlesnake *Crotalus durissus*: mean circulatory filling pressure during adrenergic stimulation in anaesthetised and fully recovered animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 19, p. 3747–3759, 1 out. 2005.

- SMITH, F. M. Blood Pressure Regulation by Aortic Baroreceptors in Birds. **Physiological Zoology**, v. 67, n. 6, p. 1402–1425, nov. 1994.
- SMITS, A. W.; LILLYWHITE, H. B. Maintenance of blood volume in snakes: transcapillary shifts of extravascular fluids during acute hemorrhage. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 155, n. 3, p. 305–310, 1985.
- TAYLOR, E. W. et al. The unequal influences of the left and right vagi on the control of the heart and pulmonary artery in the rattlesnake, *Crotalus durissus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 1, p. 145–151, 1 jan. 2009.
- TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central Control of the Cardiovascular and Respiratory Systems and Their Interactions in Vertebrates. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 855–916, 1 jul. 1999.
- VANHOUTTE, P.; CLEMENT, D.; LEUSEN, I. The Reactivity of Isolated Veins to Electrical Stimulation. **Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie**, v. 75, n. 4, p. 641–657, jan. 1967.
- WEHRWEIN, E. A.; JOYNER, M. J. Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system. In: **Handbook of Clinical Neurology**. v. 117, p.89-102, 2013.
- XU, F. et al. Local Anesthetics Modulate Neuronal Calcium Signaling through Multiple Sites of Action. **Anesthesiology**, v. 98, n. 5, p. 1139–1146, 1 maio 2003.
- ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; BÍCEGO, K. C. Role of brain nitric oxide in the cardiovascular control of bullfrogs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 165, n. 2, p. 263–271, jun. 2013.
- ZWEMER, R. L.; FOGLIA, V. G. Fatal Loss of Plasma Volume After Lymph Heart Destruction in Toads. **Experimental Biology and Medicine**, v. 53, n. 1, p. 14–17, 1 maio 1943.

## 8 MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 2.** Força de contração vascular na curva estímulo-resposta da artéria pulmonar, artéria mesentérica e veia femoral. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam valores diferentes (346,88 g  $\pm$  9,55 g; n=23; Friedman-Dunn,  $p < 0,05$ ).

| Curva Estímulo-Resposta    |                  |                  |                   |                   |                  |                  |
|----------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                            | 0,5 Hz (mN)      | 1 Hz (mN)        | 2 Hz (mN)         | 4 Hz (mN)         | 8 Hz (mN)        | 16 Hz(mN)        |
| <b>Artéria pulmonar</b>    | 0,61 $\pm$ 0,47a | 1,23 $\pm$ 0,74a | 2,37 $\pm$ 0,97b  | 4,12 $\pm$ 1,19b  | 6,10 $\pm$ 1,32b | 8,46 $\pm$ 1,40b |
| <b>Artéria mesentérica</b> | 0,39 $\pm$ 0,13a | 0,86 $\pm$ 0,27a | 1,46 $\pm$ 0,39a  | 2,31 $\pm$ 0,50b  | 3,01 $\pm$ 0,56b | 3,38 $\pm$ 0,61b |
| <b>Veia femoral</b>        | 0,02 $\pm$ 0,02a | 0,00 $\pm$ 0,01a | -0,02 $\pm$ 0,02a | -1,66 $\pm$ 0,01a | 0,00 $\pm$ 0,02a | 0,00 $\pm$ 0,02a |

**Tabela 3.** Força de contração vascular após EFS (16 Hz) e bloqueio autonômico com atropina ( $10^{-5}$  M), fentolamina ( $10^{-5}$  M) e propranolol ( $10^{-5}$  M). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam valores diferentes (346,88 g  $\pm$  9,55 g; n=23; One-way ANOVA seguido de Tukey - Artéria pulmonar e mesentérica- EFS, Atropina e Fentolamina; Friedman seguido de Dunn - Artéria pulmonar e mesentérica- EFS, Fentolamina e Atropine e EFS, Propranolol e atropina. Consideramos  $p < 0,05$  para todos os casos.

| <b>Bloqueio autonômico</b> |                  |                      |                         |
|----------------------------|------------------|----------------------|-------------------------|
| <b>Artéria pulmonar</b>    | <b>EFS (mN)</b>  | <b>Atropina (mN)</b> | <b>Fentolamina (mN)</b> |
|                            | 8,39 $\pm$ 1,96a | 0,07 $\pm$ 0,04bc    | 0,05 $\pm$ 0,04bc       |
|                            | <b>EFS</b>       | <b>Fentolamina</b>   | <b>Atropina</b>         |
|                            | 6,84 $\pm$ 1,22a | 5,32 $\pm$ 0,93ac    | -0,02 $\pm$ 0,02bd      |
|                            | <b>EFS</b>       | <b>Propranolol</b>   | <b>Atropina</b>         |
|                            | 9,92 $\pm$ 3,50a | 9,54 $\pm$ 3,34ac    | 1,29 $\pm$ 1,27bd       |
| <b>Artéria mesentérica</b> | <b>EFS</b>       | <b>Atropina</b>      | <b>Fentolamina</b>      |
|                            | 3,95 $\pm$ 1,11a | 3,38 $\pm$ 1,19ac    | 0,82 $\pm$ 0,50bc       |
|                            | <b>EFS</b>       | <b>Fentolamina</b>   | <b>Atropina</b>         |
|                            | 2,68 $\pm$ 0,52a | 0,27 $\pm$ 0,06bc    | 0,18 $\pm$ 0,06bc       |
|                            | <b>EFS</b>       | <b>Propranolol</b>   | <b>Atropina</b>         |
|                            | 3,38 $\pm$ 1,28a | 1,90 $\pm$ 0,68ac    | 0,62 $\pm$ 0,31bc       |