

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 26/09/2018.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE ZOOLOGIA (DOUTORADO)**

**Controle cardiovascular autonômico e metabolismo em embriões de
lagartos (Reptilia; Lepidosauria)**

MARINA RINCON SARTORI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Área de Zoologia).

Setembro - 2016

Controle cardiovascular autonômico e metabolismo em embriões de lagartos (Reptilia; Lepidosauria)

MARINA RINCON SARTORI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Área de Zoologia).

Orientador: Augusto Shinya Abe

Setembro - 2016

598.1 Sartori, Marina Rincon
S251c Controle cardiovascular autonômico e metabolismo em
embriões de lagartos (Reptilia; Lepidosauria) / Marina Rincon
Sartori. - Rio Claro, 2016
141 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Augusto Shinya Abe


1. Réptil. 2. Regulação cardiovascular. 3.
Desenvolvimento embrionário. 4. Iguana. 5. Squamata. 6.
Frequência cardíaca. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

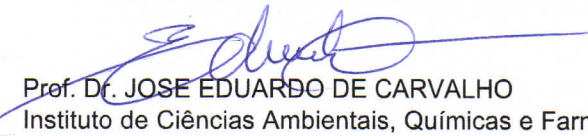
TÍTULO DA TESE: Controle cardiovascular autonômico e metabolismo em embriões de lagartos (Reptilia; Lepidosauria)

AUTORA: MARINA RINCON SARTORI
ORIENTADOR: AUGUSTO SHINYA ABE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. AUGUSTO SHINYA ABE
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. JOSE EDUARDO DE CARVALHO
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP -
Campus Diadema - SP



Prof. Dr. WILFRIED KLEIN
Departamento de Biologia / USP - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / SP



Profa. Dra. ANA LUCIA KALININ
Departamento de Ciências Fisiológicas - Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa / Universidade
Federal de São Carlos/ SP



Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE FLORINDO
Departamento de Zoologia e Botânica / UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto - SP

Rio Claro, 26 de setembro de 2016

Agradecimentos

Um doutorado se resume a anos de dedicação e aprendizado. Nesse período há um grande amadurecimento, pessoal e profissional. E não é possível chegar até o fim sem o apoio e suporte de diversas pessoas, tanto as diretamente quanto as indiretamente envolvidas. Muitas não serão citadas nesta breve seção de agradecimentos mas a todos os que compartilharam comigo muitos desses momentos gostaria de deixar o meu sentimento de gratidão.

Agradeço imensamente ao meu orientador por ter me acolhido por tantos anos no Jacarezário. Sempre presente, fornecendo todo o apoio e confiança desde os meus primeiros passos na carreira acadêmica. Meu orientador é um exemplo, por todo o seu conhecimento e por tudo o que construiu ao longo de sua carreira.

Um agradecimento especial ao Ted Taylor, o nosso querido Tedinho, que esteve presente desde o início, na concepção do projeto, durante a execução e mesmo distante, auxiliou na preparação dos manuscritos para publicação. Tedinho é sem dúvida, uma inspiração, pelo seu amor à ciência.

Agradeço ao financiamento recebido pela FAPESP (Processo 2012/16537-0) e pelas bolsas de estágio no exterior (BEPE) concedidas no ano de 2013 (/05677-9) e 2014 (/01666-5). Agradeço também aos auxílios “Travel Grants” concedidos pela Company of Biologist para atendimento aos congressos anuais da Experimental Biology Society, nos anos de 2013 e 2014.

Agradeço ao Cleo, um pesquisador cativante e competente, que esteve presente desde o início, motivador e auxiliador em várias questões. Agradeço ao Prof. Dane Crossley, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, por ser paciente e atencioso ao me ensinar e acompanhar o meu trabalho.

Aos amigos e companheiros do laboratório que ajudaram diretamente, Laura, Renato, Kevin, Zac e Janna. Agradeço aos funcionários do Jacarezário e da UNESP, Ayrton, Fernando Bonati, Fernando, Carlinhos, Joniel, pela convivência do dia a dia e pelo cuidado dos animais. Aos colegas, alunos e professores da fisiologia comparada e todo o grupo do INCT, por todas as experiências compartilhadas nos cursos e congressos desse período.

Agradeço aos meus amigos em geral, que acompanham a minha trajetória e estão sempre na torcida pelo meu sucesso, em especial gostaria de citar alguns nomes de amigos de longa data, Lúcia, Mari Alegre, Diego, Mari Franchi, Lígia, Alexandre, Bia, Cibele, Penapolense, Heloíse, Marcela. Por fim agradeço a toda a minha família e ao Tiago, que são a base de tudo, me dão apoio, carinho e forças para seguir em frente, seja qual for o desafio.

Olho o ovo na cozinha com atenção superficial para não quebrá-lo. Tomo o maior cuidado de não entendê-lo. Sendo impossível entendê-lo, sei que se eu o entender é porque estou errando. Entender é a prova do erro. Entendê-lo não é o modo de vê-lo – Jamais pensar no ovo é um modo de tê-lo visto. - Será que sei do ovo? É quase certo que sei. – Assim: existo, logo sei. O que eu não sei do ovo é o que realmente importa. O que eu não sei do ovo me dá o ovo propriamente dito.”

Clarice Lispector – O ovo e a galinha

Resumo

Durante o desenvolvimento embrionário de répteis ocorrem mudanças em relação à demanda de oxigênio, devido à contínua formação de tecidos e crescimento do embrião. Além disso, os ovos de répteis estão sujeitos a variações ambientais, como mudanças de temperatura, que influenciam diretamente as taxas de processos fisiológicos do embrião. Estudos indicam que, em geral, sob temperatura constante, o consumo de oxigênio aumenta ao longo do período embrionário em três padrões distintos dentre os répteis: exponencial, sigmoidal e em pico. Desta forma, ajustes cardiovasculares devem acompanhar essas mudanças do padrão metabólico, compatibilizando a oferta de oxigênio à demanda necessária para cada estágio do desenvolvimento. Em adultos, uma das formas de se adequar o provimento de oxigênio pelo sistema circulatório ocorre através do controle neural do coração, via sistema autônomo simpático e parassimpático. O controle autonômico induz a aceleração ou diminuição da frequência cardíaca (f_H), através dos neurotransmissores, resultando no aumento ou diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos. No entanto, no embrião, o sistema nervoso ainda não está completamente formado e os mecanismos de regulação utilizados são pouco conhecidos nos répteis. Dessa forma, neste projeto procuramos determinar o padrão de metabolismo (VO_2) e f_H em embriões do lagarto iguana, *Iguana iguana*. Foi também estudada a relação entre o VO_2 e a f_H durante a fase embrionária e os efeitos cronotrópicos da temperatura. E para finalizar, avaliamos os mecanismos de controle do coração pelo sistema nervoso autônomo em embriões de iguanas e em uma segunda espécie de lagarto, o teiú (*Salvator merianae*), que pertence a um clado distinto dentro da Ordem Squamata. Nossos resultados indicam que durante a fase embrionária de répteis: i. não há um acoplamento entre a taxa metabólica e a f_H , ii. a temperatura exerce um efeito direto na f_H e os ninhos escavados em profundidade minimizam as variações térmicas diárias, iii. há indícios de presença de receptores adrenérgicos e colinérgicos no coração do embrião logo após a oviposição, e iv. no entanto, o controle do coração é realizado principalmente via tônus adrenérgico, provavelmente através de catecolaminas circulantes enquanto o tônus colinérgico se inicia posteriormente, próximo à eclosão, devido a possível relação com o início do ritmo ventilatório e a necessidade de controle de interações cardiorrespiratórias.

Palavras-chave: frequência cardíaca, consumo de oxigênio, Sistema Cardiovascular, répteis, Squamata, ovo amniótico, Sistema Nervoso Autônomo, adrenérgico, colinérgico

Abstract

During the reptilian embryonic development a progressive change in oxygen demand occurs as the embryos differentiate new tissue and grow. Moreover, reptilian eggs are susceptible to environmental changes, especially in temperature, that directly influences metabolic processes in embryos. Studies have shown that under constant temperatures embryonic reptiles present increasing levels of oxygen uptake, in three distinct patterns: exponential, sigmoidal, and in peak. In order to match oxygen supply and demand there might be accompanying cardiovascular adjustments in each stage of the embryonic period. In adult organisms different levels of sympathetic and parasympathetic control of the heart, driven by neurotransmitters, promotes accelerations or reductions in heart rate (f_H), that ultimately alter the oxygen provision to embryonic tissues. However, the neural system is not completely formed during the embryonic development and cardiovascular regulatory mechanisms at this phase are not well understood. In this study we aimed to determine the patterns of metabolism (VO_2) and f_H in embryos of the green iguana, *Iguana iguana*. We also assessed the relationship between the VO_2 and f_H and chonotropic effects of temperature during the embryonic period. Finally, we investigated the autonomic control of the heart in embryos of iguanas and another lizard, the tegu (*Salvator merianae*), which belongs to another clade of the order Squamata. Our results show that in embryonic reptiles: i. a direct coupling between the metabolic rate and f_H is absent throughout the embryonic incubation, ii. there is a direct effect of temperature on the f_H and the depth in which nests are buried prevent major temperature changes, iii. there is an indication that cardiac receptors are present very early in development and iv. the control of the heart is mainly promoted by an adrenergic tonus via circulating catecholamines, and the onset of cholinergic tonus is delayed, occurring only close to hatching which may be related to the ventilatory rhythm and the need to control cardiorespiratory interactions.

Key-words: heart rate, oxygen consumption, Cardiovascular system, reptiles, Squamata, amniotic egg, Autonomic Nervous System, adrenergic, cholinergic

Sumário

	Página
Introdução geral	10
Referências	21
Capítulo I – An appraisal of the use of an infrared digital monitoring system for long-term measurement of heart rate in reptilian embryos	26
Abstract	27
Introduction	27
Material and Methods	28
Results	30
Discussion	31
References	33
Table	36
Figures	37
Capítulo II – Rates of O₂ consumption, heart rate and consequent O₂ pulse in embryos and hatchlings of the green iguana <i>Iguana iguana</i>	40
Abstract	41
Introduction	42
Material and Methods	43
Results	46
Discussion	48
References	51
Tables	55
Figures	57
Capítulo III – Pattern of heart rate and chronotropic effects of temperature in embryos of the lizard <i>Iguana iguana</i>	62
Abstract	62
Introduction	63
Material and Methods	64
Results	66
Discussion	67
References	69
Tables	72
Figures	73

Capítulo IV – The progressive onset of cholinergic and adrenergic control of heart rate during development in the green iguana, <i>Iguana iguana</i>	76
Abstract	77
Introduction	77
Material and Methods	79
Results	83
Discussion	85
References	90
Tables	94
Figures	95
Capítulo V – Controle autonômico do coração em embriões e adultos do lagarto teiú <i>Salvator merianae</i>	105
Resumo	105
Introdução	106
Material e Métodos	107
Resultados	108
Discussão	109
Referências	111
Tabela	113
Figuras	114
Conclusões Gerais	119
Perspectivas Futuras	120
Apêndice A – Manuscrito “Oxygen provision to developing embryos of the snapping turtle <i>Chelydra serpentina</i>”	121
Apêndice B – Paper “A role for histamine in cardiovascular regulation in late stage embryos of the red-footed tortoise, <i>Chelonoidis carbonaria</i> Spix, 1824”	140
Apêndice C – Paper “The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates”	141

1. Introdução Geral

1.1 A fisiologia do desenvolvimento

Segundo Burggren e Warburton (2005), as perguntas que a fisiologia comparada do desenvolvimento busca responder, tratam de quatro temas principais:

- 1) Como ocorre a divisão regulatória dos sistemas fisiológicos em desenvolvimento em um organismo ainda não completamente formado?
- 2) Como as mudanças das condições ambientais afetam os sistemas fisiológicos em desenvolvimento?
- 3) Como as diferenças em capacidade fisiológica refletem em diferenças de valor adaptativo e, conseqüentemente, na evolução dos organismos?
- 4) Como o desenvolvimento pode restringir a evolução?

Estudos de fisiologia do desenvolvimento utilizam com frequência três modelos de espécies experimentais, o peixe-zebra (*Danio rerio*), o camundongo (*Mus musculus*) e a galinha (*Gallus gallus*). Os estudos se beneficiam da extensa informação da biologia dessas espécies, incluindo grande informação genética, fácil acessibilidade aos embriões, dentre outros fatores (BURGGREN, 2000). Porém, dependendo da questão a ser elucidada, novos modelos animais podem ser descobertos, beneficiando-se do princípio de August Krogh, que propõe que para cada problema fisiológico há um animal mais conveniente para ser estudado (e.g. KREBS, 1975). Em outros casos, estudos de desenvolvimento são motivados pelo interesse comercial, no intuito de estimular o crescimento e o aumento da produção, através da ampliação dos conhecimentos da fisiologia embrionária e dos efeitos benéficos ou deletérios de interferências ambientais. Neste caso, o ovo de galinha é novamente um organismo extensivamente estudado, assim como espécies de peixes comerciais (BROOK, 1975; WOOD et al., 2014).

Muitos estudos encontraram semelhanças em embriões e larvas de espécies pertencentes a grupos distintos de animais, o que pode ser relacionado como “características universais” do embrião de vertebrado, porém, ao se proceder o desenvolvimento embrionário, muitas características tornam-se peculiares de cada espécie, especialmente com relação ao sistema cardiovascular (BURGGREN, 2000). O coração de vertebrados primordialmente possui formato tubular, porém ao se diferenciar, revela diferentes formatos, que estão estritamente correlacionados com a função (MOORMAN et al, 2003). diferentes formatos gradualmente revelam diferenças fisiológicas específicas de cada grupo.

No caso da fisiologia cardiovascular em embriões, a maioria dos estudos se concentra

em fetos de mamíferos como ovelhas, camundongos e ratos (e.g. JI et al., 2003, RYCHIK, 2004), seguidos de vários estudos em aves, como galinhas de diferentes linhagens, e o emu (e.g. CROSSLEY; ALTIMIRAS, 2000; RUIJTENBEEK et al., 2002, CROSSLEY et al., 2003a), e de alguns poucos em peixes e anfíbios (e.g. BURGGREN; FRITSCHÉ, 1997, JACOBSSON; FRITSCHÉ, 1999, SCHEWERTE; FRITSCHÉ, 2003, MILLER et al., 2011). Os répteis são o grupo menos estudado, apesar de sua diversidade, destacando-se especialmente estudos com o crocodiliano *Alligator mississippiensis* e o quelônio *Chelydra serpentina* (e.g. EME et al., 2011; CROSSLEY et al., 2003b; CROSSLEY; ALTIMIRAS, 2005, ALVINE et al., 2013).

1.2 Os répteis

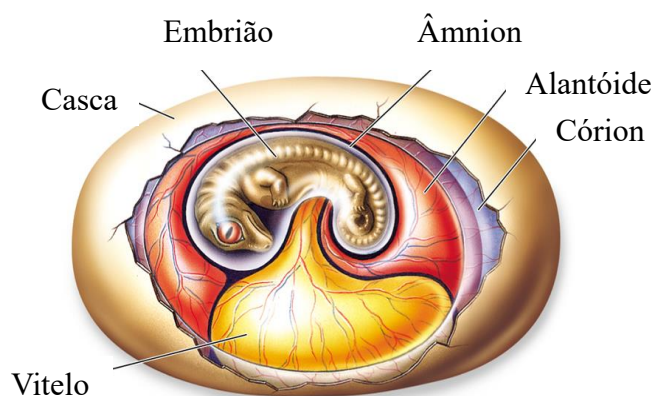
O grupo reptiliano é extremamente heterogêneo, tanto filogeneticamente quanto na ocupação de habitats, o que evidencia a importância de seu estudo. Os répteis tem origem polifilética a partir dos anfíbios, datada no período Triássico, em torno de 251 a 208 milhões de anos atrás (PORTER, 1972). Neste período pode-se traçar a origem dos quatro grupos, divididos com base na morfologia dos crânios: Anapsida, Sinapsida, Diapsida e Arcosauria. Anapsida é o grupo representado pelas atuais tartarugas viventes, que divergiu anteriormente ao estabelecimento das demais linhagens, sendo desta forma, o grupo mais isolado (CARROLL, 1969). Sinapsida é o grupo primitivo que deu origem aos precursores dos mamíferos. Diapsida engloba o grupo Lepidosauria, que se divergiu no grupo Ryncocephalia, que é representado por apenas um gênero vivente, o *Sphenodon*, e nos lagartos e serpentes (REIZS, 1997). Arcosauria, representado pelos jacarés e crocodilos viventes, tem sua ancestralidade compartilhada com os dinossauros e aves, através do grupo dos tecodontes (HUGHES, 1963).

De acordo com a base de dados mantida pelo pesquisador Peter Uetz (The Reptile Database), atualizado em agosto de 2015, o número de espécies de répteis viventes conhecidas é de 10.272, dentre as quais os lagartos são majoritários, com 6.145 espécies, seguidos de serpentes com 3.567, tartarugas com 341, crocodilianos com 25 e tuatara com apenas 1 espécie. Os répteis exploraram diversos habitats e desenvolveram especializações que permitiram que se distribuíssem por diversas zonas de extremos. Espécies de répteis são encontradas em ambientes de extremos de temperatura, desde desertos a ambientes abaixo de zero, extremos de salinidade, habitando zonas de água doce e salgada, extremos de altitude (POUGH et al., 2008) e extremos de disponibilidade de gases respiratórios, como ambientes anóxicos (MILTON; PRENTICE, 2007).

1.3 O ovo amniótico

Répteis representam a conquista definitiva do ambiente terrestre pelos vertebrados e, um dos principais motivos que possibilitou a total independência do meio aquático, foi o ovo amniótico, que propiciou que o desenvolvimento embrionário ocorresse independente do ambiente aquático (REISZ, 1997). O ovo amniótico, presente no grupo dos répteis e das aves, possui membranas extra-embrionárias que fornecem todos os nutrientes, água e permitem a passagem dos gases respiratórios necessários ao desenvolvimento do embrião. A casca confere proteção mecânica e possui poros que permitem a troca de água e de oxigênio e gás carbônico (RAHN et al., 1979). Logo abaixo da casca, encontra-se a membrana corioalantóica, que é vascularizada e realiza as trocas de gases respiratórios por meio de difusão com o ambiente externo através dos poros (PIIPER et al., 1980). O âmnion, envolve totalmente o embrião e, por ser uma membrana preenchida com líquido, o protege da dessecação que ocorreria caso estivesse em contato direto com o ar (ROMER, 1957). O alantóide também possui a função de armazenar água e excretas nitrogenados provenientes do metabolismo embrionário (e.g. SARTORI et al., 2012). O vitelo é uma reserva de proteínas e lipídeos, que garante o suprimento de combustível energético para a diferenciação e manutenção dos tecidos do embrião desde o período da oviposição até o período da eclosão dos filhotes (NOBLE, 1991). No entanto, ao contrário das aves, a maioria das espécies ovíparas de répteis depositam seus ovos em ninhos sem cuidado parental, estando dessa forma sujeitos à variabilidades ambientais de temperatura e umidade (GANS, 1996).

Fig. 1: Esquematização do ovo amniótico de répteis:



Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos3/biorepteis.php>. Acessado em 22 jul. 2016.

1.4 O desenvolvimento do sistema cardiovascular

Durante a embriogênese de vertebrados o primeiro sistema funcional e regulado é o cardiovascular. Em geral, o coração começa a bater precocemente no processo de desenvolvimento e em galinhas, por exemplo, inicia-se 3 dias após a oviposição, o que representa 14% do tempo de incubação de 21 dias (BURGGREN; WARBURTON, 1994). Nesta fase o coração não desempenha as funções de transporte, pois o processo de difusão é suficiente para suprir a demanda de oxigênio, porém possui a importante função de promover a angiogênese, dado a ligação entre morfogênese cardiovascular e fluxo sanguíneo (BURGGREN, 2004). A maturação do sistema cardiovascular ocorre através da junção entre o saco alantóico e o córion, formando a membrana corioalantóica irrigada com vasos sanguíneos e expansão dos vasos que irrigam o vitelo. A circulação extra-embriônica possui função análoga à placenta e ocorre em paralelo com a circulação intra-embriônica, que perfunde os órgãos internos em formação no embrião (BAUMANN; MEUER, 1992). Nos embriões mais tardios, após um considerável incremento de massa, o transporte através da convecção sanguínea é essencial para finalizar o desenvolvimento (BURGGREN; WARBURTON, 1994).

Para determinar o desenvolvimento do sistema cardiovascular, um dos parâmetros mais acessíveis é a medição da frequência cardíaca (f_H). Em algumas espécies de vertebrados o padrão da f_H ao longo do desenvolvimento foi determinado e uma grande variabilidade foi registrada. Em geral ocorre um aumento da f_H (HOLETON, 1971; WHITE, 1974; BURGGREN; DOYLE, 1986; PELSTER; BEMIS, 1991; PELSTER; BURGGREN, 1991) no estágio mais inicial do desenvolvimento. Em anfíbios pode-se observar uma relação marcante entre f_H e massa corpórea (M_b) como em *Lithobates catesbeianus*, e a ausência desta correlação em *Eleutherodactylus coqui* (BURGGREN; DOYLE, 1986). Em répteis, o crocodiliano *Alligator mississippiensis* apresenta uma redução acentuada seguida de um decaimento gradual da f_H até o momento da eclosão (CROSSLEY; BURGGREN, 2009). Em aves o padrão parece estar associado com a divisão entre aves precoces, relativamente independentes logo após a eclosão, e altriciais, que requerem um cuidado parental extensivo após a eclosão. Nas espécies de aves precoces observa-se um aumento hiperbólico ou uma diminuição da f_H ao final da incubação ou logo após o “pipping interno” (momento em que o embrião perfura a membrana, tendo acesso à câmara de ar, em torno de 48h antes da eclosão). Em espécies altriciais observa-se um aumento progressivo durante a segunda metade da incubação, sem um decaimento no momento do “pipping interno” (TAZAWA et al., 1991, 1994). Em mamíferos o padrão humano apresenta um aumento acentuado da f_H até o 50º dia após a concepção, em seguida estabiliza e declina após o nascimento, um padrão oposto ao do cão doméstico (HOWE et al., 1991).

O padrão da f_H em embriões de vertebrados pode ser influenciado por mudanças de permeabilidade da membrana, mudanças na região do marca-passo ao longo da incubação e diferentes taxas e início do controle autonômico colinérgico, adrenérgico e hormonal (BURGGREN; PINDER, 1991; CROSSLEY et al., 2003b; NECHAEVA et al, 2007). Apesar do batimento cardíaco de vertebrados ser iniciado e seguir o ritmo ditado pelo marca-passo a frequência de batimentos é modulada constantemente. Uma das formas de regulação do sistema cardiovascular e da f_H se dá através do sistema neural, mais especificamente pelo o sistema nervoso periférico, através das ramificações simpática e parassimpática, e também através do sistema humoral. Os nervos autonômicos e os hormônios agem nos receptores presentes no coração e nos vasos sanguíneos através da transdução de sinais do sistema nervoso central (KLABUNDE, 2011). Através das inervações neurais, que liberam neurotransmissores, ou através dos hormônios circulantes, que se ligam a receptores específicos localizados nas membranas do miócito cardíaco ou na célula muscular lisa do vaso sanguíneo, ocorrem respostas que podem aumentar ou diminuir a força de contração, dilatar ou restringir os vasos, resultando em um fluxo sanguíneo suficiente para a perfusão dos tecidos de acordo com as demandas do organismo (LEVICK, 1991).

A temperatura de incubação interfere sensivelmente na f_H de aves e é muito importante para determinar taxas de desenvolvimento e crescimento e a duração da incubação (DEEMING; FERGUSON, 1991). Além disso, sabe-se que em aves a tolerância térmica de embriões também varia em função do desenvolvimento, por exemplo, embriões em estágios iniciais sobrevivem por muito mais tempo quando expostos a temperaturas baixas do que embriões mais avançados (TAZAWA; RAHN, 1986). No entanto, há poucos estudos sobre a influência da temperatura na f_H de répteis mesmo estando sujeitos a temperaturas de incubação muito mais variáveis. As fêmeas grávidas tem papel fundamental na escolha da temperatura corpórea e seleção de locais de oviposição (ANGILLETTA et al., 2000). Sabe-se que a temperatura pode influenciar a duração da incubação, o tamanho dos filhotes (CASTILLA; SWALLOW, 1996; SHINE et al., 1997) e na determinação do sexo em algumas espécies (FERGUSON; JOANEN, 1983). Nos embriões de répteis a f_H aumenta de acordo com a temperatura, e é capaz de se aclimatar, assim como a f_H de organismos adultos (DU et al., 2010a).

A f_H elevada de embriões é benéfica por estar associada a altas taxas de desenvolvimento, correlacionado com um maior sucesso reprodutivo. O nível de f_H elevado dos embriões quando comparados à de filhotes e adultos, são possíveis devido a existência de uma reserva energética garantida, o vitelo (DU et al., 2010b). Estudos mostraram que a f_H é mais altas em lagartos e quelônios quando comparados com serpentes e crocodilianos e que em

Squamata o número de batimentos cardíacos ao longo do desenvolvimento total é menor. Em algumas espécies as fêmeas são capazes de reter os ovos por um tempo maior antes da oviposição e essas diferenças de extensão da embriogênese, realizada antes e depois da oviposição, garantem diferentes períodos de incubação e diferenças de número total de batimentos cardíacos. As famílias de Iguanídeos e Gekkonídeos são as que possuem o menor número de batimentos, devido a uma provável divergência filogenética quanto à embriogênese realizada dentro e fora da fêmea (DU et al., 2011).

1.5 Regulação do sistema cardiovascular

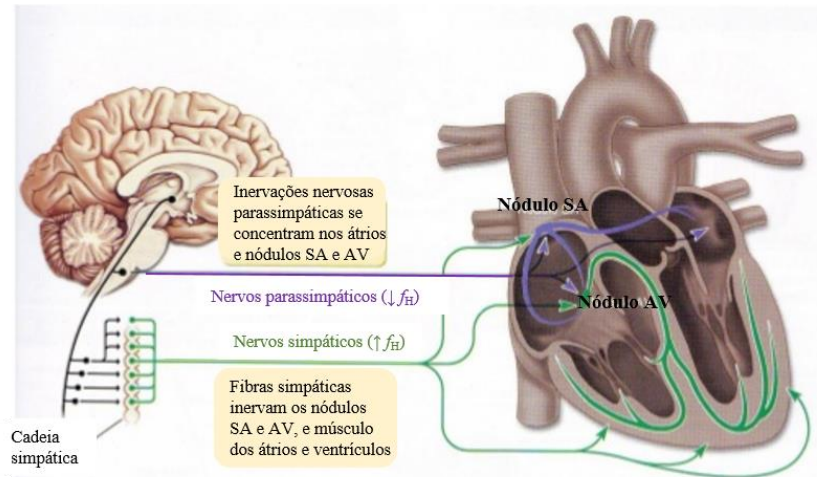
O sistema nervoso pode ser dividido em duas partes, o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC consiste do encéfalo e espinha vertebral enquanto o SNP consiste dos nervos cranianos, cervicais, espinhais, sacrais e nervos intrínsecos de cada sistema de órgãos. O SNP transporta informações do SNC para os órgãos efetores e levam informações sensoriais para serem processadas no SNC. O SNP é dividido em somático, que inerva músculos esqueléticos e os nervos e receptores sensoriais, e autônomo, que inerva músculos lisos, glândulas e vasos sanguíneos. Os nervos autonômicos controlam funções corporais, de forma involuntária (KRUK; PYCOCK, 1983).

O sistema autônomo é um dos principais efetores da regulação instantânea do sistema cardiovascular, e é um dos mecanismos que permite uma associação do débito cardíaco com o metabolismo. O sistema autônomo é dividido funcional e anatomicamente em simpático e parassimpático. O sistema parassimpático é responsável por processos que restauram as reservas de energia do organismo enquanto o sistema simpático é o responsável pelas respostas conhecidas como as de “fuga e luta”, promovendo a mobilização das reservas energéticas (HILL et al., 2012). No entanto, os dois sistemas estão sempre ativos, variando a dominância de cada um, dependendo da situação (KRUK; PYCOCK, 1983).

Em répteis adultos, durante o repouso, o coração é modulado predominantemente por influência do décimo nervo cranial, o vago, que libera o neurotransmissor acetilcolina (Ach). A acetilcolina, liberada pelo neurônio pós-ganglionar, se liga ao receptor muscarínico colinérgico presente no coração e promove redução da f_H e da força de contração (TAYLOR et al., 1999). O sistema simpático, por sua vez, libera catecolaminas, como a epinefrina ou norepinefrina, que se ligam aos receptores β -adrenérgicos do coração, promovendo aumento da taxa e da força de contração, que é geralmente associado, mas não restrito, ao exercício e condições de estresse do animal (OVERGAARD et al., 2002). A acetilcolina e a adrenalina são os responsáveis por iniciarem uma resposta no tecido efector após se ligarem aos receptores e,

dessa forma, são chamados de agonistas. Substâncias que bloqueiam ou impedem os agonistas de iniciarem uma resposta são chamados de antagonistas ou bloqueadores. Como exemplo de antagonistas temos a substância atropina, que bloqueia os receptores colinérgicos muscarínicos e o propranolol, que bloqueia os receptores β -adrenérgicos (KRUK; PYCOCK, 1983).

Fig. 2: Esquemática da inervação autonômica sobre o coração em mamíferos.



Fonte: Adaptado de McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. Fisiologia do exercício energia, nutrição e desempenho. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

Em embriões de aves e répteis o sistema nervoso autônomo está se desenvolvendo e o momento em que se torna maduro para desenvolver a regulação cardiovascular é variável entre as espécies. Receptores adrenérgicos e colinérgicos foram encontrados desde o primeiro quarto da incubação em aves (BARRY, 1950), porém a inervação neural ocorre apenas tardiamente, evidenciado pelo início da presença de tônus colinérgico inibitório apenas em momentos próximos à eclosão (CROSSLEY; ALTIMIRAS, 2012; CROSSLEY, 1999). O tônus β -adrenérgico excitatório está presente pelo menos a partir da segunda metade da incubação em várias espécies de aves até o momento estudadas, a partir de 50-70%, resultando dos altos níveis de catecolaminas encontrados na circulação (CROSSLEY; ALTIMIRAS, 2000). Em répteis o tônus adrenérgico também foi encontrado presente nos períodos estudados no alligator americano *Alligator mississippiensis* (EME et al., 2011), na tartaruga *Chelydra serpentina* (ALVINE et al., 2013) e na serpente *Lamprophis fuliginosus* (CROSSLEY; BURGGREN, 2009). Porém, o início do tônus colinérgico varia, estando presente desde os 70% da incubação na tartaruga *C. serpentina* e 90% na serpente *L. fuliginosus*, enquanto é ausente no alligator durante o período de incubação embrionária.

Devido à escassez de estudos e a importância do grupo reptiliano, que representa o elo evolutivo entre anfíbios, aves e mamíferos, este estudo visou determinar ao longo do desenvolvimento embrionário de uma espécie de lagarto, o iguana (*Iguana iguana*), dados cardiovasculares básicos como padrão de f_H e efeitos cronotrópicos da temperatura assim como a determinação do início do controle autônomo. Também avaliamos o papel da f_H no transporte de oxigênio para manutenção do desenvolvimento embrionário, relacionando a f_H com taxas metabólicas e de crescimento. Para avaliar uma espécie de lagarto pertencente à subordem Scleroglossa, um clado dicotômico à Iguania, selecionamos o teiú, *Salvator merianae*, em que determinarmos o padrão de frequência cardíaca e o papel do controle autonômico durante o período de desenvolvimento embrionário. Dessa forma, no escopo do trabalho, abordaremos dois dos principais temas da fisiologia comparada do desenvolvimento, no tocante às questões mecânicas de processos de função e regulação cardiovascular e os efeitos da temperatura no sistema cardiovascular em desenvolvimento.

1.6 A espécie *Iguana iguana*

A espécie *Iguana iguana* é um lagarto herbívoro que faz parte da família Iguanidae, no clado monofilético Iguania. Na ordem Squamata distingue-se um segundo clado, Scleroglossa, baseado em características morfológicas (CONRAD, 2008). A distribuição da espécie ocorre desde o México, América Central e boa parte da América do Sul, em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a espécie é encontrada na região Amazônica, parte da região Centro-Oeste, Pantanal, e na Caatinga. Um indivíduo adulto pode medir 180 cm de comprimento e pesar até 9 kg.

Fig. 3 Macho adulto do lagarto *Iguana iguana*, de aproximadamente 90 cm de comprimento total, pertencente ao criatório científico da UNESP Rio Claro (Jacarezário).



Fonte: arquivo pessoal.

Em cativeiro depositam aproximadamente entre 10 e 60 ovos em ninhos escavados no solo, nos períodos dos meses de setembro e outubro, que levam em torno de 70-74 dias para eclodir quando incubados artificialmente a 30°C (observações pessoais). A profundidade dos ninhos de iguana é de 25 a 50 cm (RAND, 1968). A profundidade do ninho tem direta influência no perfil térmico durante a incubação (HILLEL, 1980). Os ovos possuem cascas flexíveis, capazes de absorver água do meio externo, sendo que ao final da incubação apresentam o dobro do tamanho da oviposição (e.g. SARTORI et al., 2012).

1.7 A espécie *Salvator merianae*

O teiú (*Salvator merianae*) é um lagarto amplamente encontrado na América do Sul (AVILA-PIRES, 1995). É um dos maiores lagartos da família Teiidae, chegando até 5 kg e 1,6 m de comprimento (Fig. 4).

É uma espécie modelo para estudos fisiológicos, pois é um lagarto que possui atividade durante os meses quentes e chuvosos, e inatividade durante os meses mais frios e secos (ABE, 1983). Neste período de dormência, os teiús permanecem em seus abrigos, em jejum e com temperatura corpórea, metabolismo e função cardiorrespiratória reduzidos (ANDRADE et al., 2004). A reprodução ocorre logo após a emergência da dormência. As fêmeas depositam entre 20-60 ovos em ninhos construídos de folhas secas, cuja incubação dura em média 60 dias à temperatura de 30°C (observações pessoais).

Fig. 4 Fêmea adulta da espécie *Salvator merianae*, de aproximadamente 60 cm de comprimento total, pertencente ao criatório científico da UNESP, Rio Claro (Jacarezário).



Fonte: arquivo pessoal.

Conclusões gerais

Ressaltamos que este trabalho foi o primeiro a determinar a ontogenia do controle autonômico de lagartos, com o diferencial de acessar embriões desde o início do período de incubação, a partir de aproximadamente 5 dias após a oviposição. Ademais, o conjunto de estudos relacionados com o desenvolvimento cardiovascular e o metabolismo de embriões de lagartos revelou que:

- O monitor cardíaco digital Buddy ao ser utilizado para medições de longa duração promove o aquecimento dos ovos, o que causa um efeito direto na f_H . Esse efeito deve ser determinado através da medição interna da temperatura dos ovos ou pela realização de leituras instantâneas.
- O padrão de f_H presente em embriões de iguanas apresenta um padrão constante ao longo do desenvolvimento, que aparenta ser compartilhado entre as espécies do grupo Squamata. O padrão de metabolismo embrionário apresenta uma curva sigmóide, semelhante ao de algumas espécies de lagartos, porém, distinto do padrão de serpentes, relatado como exponencial.
- A f_H embrionária não possui uma forte associação com taxas metabólicas ou de crescimento, não devendo ser utilizada como um índice de desenvolvimento embrionário. A taxa metabólica e o pulso de oxigênio são fortemente correlacionados entre si e com o crescimento, podendo ser utilizados como indicadores de desenvolvimento.
- A temperatura afeta diretamente a f_H e é independente do estágio de maturação embrionária. Os ninhos enterrados no solo fornecem um ambiente protegido contra grandes variações térmicas, minimizando as flutuações diárias.
- Apesar da presença de receptores muscarínicos colinérgicos e β -adrenérgicos no coração embrionário de iguanas desde estágios logo após a oviposição, a completa inervação parece ocorrer apenas ao final do período de incubação. Dessa forma a presença de tônus adrenérgico excitatório durante todo o período de incubação de iguanas, se deve à provável atuação de catecolaminas circulantes. O tônus colinérgico inibitório tem início um período muito próximo à eclosão, possivelmente relacionado com início do ritmo ventilatório.
- Embriões de iguanas submetidos a condições de hipóxia aguda apresentam bradicardia, quando no início do desenvolvimento, indicando um efeito direto no

coração e taquicardia, quando em estágios mais avançados do desenvolvimento, indicando a atuação de catecolaminas.

Perspectivas futuras

Os trabalhos realizados ampliaram a perspectiva sobre o desenvolvimento da fisiologia cardiovascular, sua regulação e sua relação com o metabolismo, possibilitando novas abordagens tais como:

- determinação do padrão de f_H , VO_2 e controle autonômico em um maior número de espécies de Squamata, para confirmar possíveis associações filogenéticas ou ambientais; por exemplo, embriões de serpentes apresentam padrão distinto de VO_2 porém não há dados sobre o padrão de f_H e controle autonômico no período embrionário.
- avaliação da atuação de outros fatores não colinérgicos não adrenérgicos (NANC), que atuam no controle cardiovascular ao longo do desenvolvimento embrionário de répteis;
- investigação de ajustes cardiovasculares durante o desenvolvimento embrionário, como volume sistólico, débito cardíaco e diferença arteriovenosa de conteúdo de oxigênio, assim como alterações em fatores que afetam a capacidade de transporte de oxigênio do sistema cardiovascular como concentração de hemoglobina, curvas de afinidade da hemoglobina, etc.
- avaliação dos efeitos de longo prazo de incubações a diferentes temperaturas, por exemplo sob temperaturas flutuantes, ou sob diferentes níveis de gases respiratórios como hipóxia e hipercapnia;
- determinação de janelas críticas (“critical windows”), os períodos de maior vulnerabilidade à fatores ambientais, como mudanças de temperatura e níveis de gases respiratórios, durante o desenvolvimento embrionário, que influenciam a sobrevivência e os fenótipos dos filhotes.