

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANA JULIA SCHMIDT NIEDERAUER

LIBERAÇÃO BASAL E AÇÃO DA 6-NITRODOPAMINA IN VITRO EM ARTÉRIAS CARÓTIDA, CORONÁRIA, FEMORAL E RENAL DE SUÍNOS (SUS SCROFA DOMESTICUS)

CAMPINAS

2023

ANA JULIA SCHMIDT NIEDERAUER

LIBERAÇÃO BASAL E AÇÃO DA 6-NITRODOPAMINA IN VITRO EM ARTÉRIAS CARÓTIDA, CORONÁRIA, FEMORAL E RENAL DE SUÍNOS (SUS SCROFA DOMESTICUS)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI COORIENTADOR: DR. JOSÉ BRITTO JUNIOR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA JULIA SCHMIDT NIEDERAUER E ORIENTADA PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.

Campinas 2023

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Niederauer, Ana Julia, 1994-

N552L

Liberação basal e ação da 6-nitrodopamina *in vitro* em artérias carótida, coronária, femoral, renal de suínos (*sus acrofa domesticus*) / Ana Julia Schimidt Niederauer. — Campinas, SP: [s.n.], 2023.

Orientador: Gilberto de Nucci. Coorientador: José

Britto Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nitrocatecolaminas. 2. Óxido nítrico. 3. LC-MS/MS. 4. Calbindina 2. 5. Imuno-histoquímica. 6. Tetrodotoxina. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Britto Júnior, José, 1991-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Basal release and action of 6-nitrodopamine in swine cartotid, coronary, femoral and renal arteries (*sus acrofa domesticus*)

Palavras-chave em inglês:

Nitrocatecholam ines Nitric oxide LC-MS/MS Calbindin 2 Immunohistochem istry Tetrodotoxin

Área de concentração: Farmacologia Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]

Andre Alves de Moraes

Gobbato Icleia Siqueira Barreto **Data de defesa:** 09-10-2023

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: https://orcid.org/0009-0009-9564-651X
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/8462314143964832

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANA JULIA SCHMIDT NIEDERAUER

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI COORIENTADOR: DR. JOSÉ BRITTO JUNIOR
MEMBROS TITULARES:
1. Prof. Dr. Gilberto De Nucci
2. Prof. Dr. André Alves de Moraes Gobbato
3. Prof. Dra. Icleia Sigueira Barreto

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DATA DA DEFESA: 09/10/2023

Agradeço a Deus pela minha vida e presentear-me com a constante evolução intelectual e emocional.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr Gilberto de Nucci pelos ensinamentos, oportunidades e por sua grande amizade.

Agradeço ao meu pai, Paulo Victor Niederauer, a minha mãe, Nair Maria Niederauer, e irmã, Letícia Niederauer Torres pelo meu sustento, amor incondicional, e me ensinarem a nunca desistir de meus sonhos assim como nunca parar de estudar.

Agradeço ao meu marido, Renan Arthur Bosio Guimarães, pela paciência, carinho e apoio durante esta trajetória.

Aos Professores e colegas do Departamento de Farmacologia da Unicamp, pelos ensinamentos e paciência.

Obrigada.

RESUMO

A 6-nitrodopamina é uma nova catecolamina que é liberada de tecidos vasculares, como vasos do cordão umbilical humano, anéis aórticos de Chelonoidis carbonarius, Pantherophis guttatus e de Callithrix spp. Em anéis aórticos pré-contraídos, atua como potente vasodilatador por antagonizar os receptores dopaminérgicos D2-like. Aqui determinamos se os vasos suínos, como artérias carótidas, coronárias, renais, pulmonares e femorais e veia cava superior, liberam 6-nitrodopamina, dopamina, noradrenalina e adrenalina, medidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem. A ação vasorelaxante da 6-nitrodopamina foi avaliada in vitro em artérias carótidas, coronárias, renais e femorais pré-contraídas com U-46619 (3 nM) e comparada com a induzida pelo agonista do receptor D2 da dopamina L-741,626. A 6-nitrodopamina é liberada de todos os tecidos vasculares; o efeito vasorelaxante da 6-nitrodopamina não foi afetado pela pré-incubação dos L-NG-Nitro arginina metil éster tecidos com (L-NAME) [1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina- 1-one (ODQ) (100 mM), mas virtualmente abolido por remoção mecânica do endotélio. As contrações induzidas por estimulação de campo elétrico (EFS) foram significativamente potencializadas pela incubação prévia com L-NAME, mas não afetadas pela pré-incubação com ODQ. As contrações induzidas por EFS foram significativamente atenuadas pela pré-incubação com 6-nitrodopamina ou L-741.626. Em conclusão, vasos suínos apresentam liberação basal de 6-nitrodopamina, e a vasodilatação induzida por 6-nitrodopamina se deve ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2/D2like.

Palavras-chave – nitrocatecolaminas, óxido nítrico, LC-MS/MS, calretinina imunohistoquímica, tetrodotoxina.

ABSTRACT

6-nitrodopamine is a novel catecholamine that is released from vascular tissues, such as human umbilical cord vessels, aortic rings from *Chelonoidis carbonarius* Pantherophis guttatus and from Callithrix spp. In precontracted aortic rings, it acts a potent vasodilator by antagonizing dopamine D2-like receptors. Here we determined whether swine vessels such as carotid, coronary, renal, pulmonary, and femoral arteries and superior vena cava release 6-nitrodopamine, dopamine, noradrenaline, and adrenaline, as measured by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The vasorelaxant action of 6-nitrodopamine was evaluated in vitro in U-46619 (3 nM) precontracted carotid, coronary, renal and femoral arteries and compared to that induced by the dopamine D2-receptor agonist L-741,626. 6-nitrodopamine is released from all vascular tissues; the vasorelaxant effect of 6-nitrodopamine was not affected by preincubation of the tissues with either L-NG-Nitro arginine methyl ester (L-NAME) or 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (100 µM) but virtually abolished by mechanical removal of the endothelium. Electrical field stimulation (EFS)induced contractions were significantly potentiated by previous incubation with L-NAME, but not affected by ODQ preincubation. EFS-induced contractions were significantly attenuated by preincubation with either 6-nitrodopamine or L-741,626. In conclusion, swine vessels present basal release of 6-nitrodopamine, and the vasodilation induced by 6-nitrodopamine is due to blockade of the dopamine D₂/D₂-like receptors.

Keywords – nitrocatecholamines, nitric oxide, LC-MS/MS, calretinin immunohistochemistry, tetrodotoxin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-ND - 6-nitrodopamina;

AC - adenilatociclase;

ADR - Adrenalina;

ARRIVE - Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments;

AMPc - monofosfato cíclico de adenosina;

ATP -Trifosfato de adenosina;

BH4 - (6R)5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina;

CA²⁺- Cálcio ionizado

D1-like - Receptores dopaminérgicos da família D1 (D1 e D5);

D2-like - Receptores dopaminérgicos da família D2 (D2, D3, D4);

DA - Dopamina;

DBH - dopamina-β-hidroxilase;

EFS - estimulação do campo elétrico;

FAD - flavina adenina dinucleotídeo;

FMN - flavina mononucleotídeo;

FNMT - feniletanolamina N-metiltransferase;

HUA - Artérias umbilicais humana;

HVA- ácido homovanílico

K+ - potássio:

KHS - Krebs-Henseleit;

LC - Cromatografia líquida;

L-DOPA - 3,4 dihidroxifenilalanina;

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina-metil-éster;

L741,626 - (±)-3-[4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxypiperidinyl]methylindole (Antagonista do receptor D₂-like)

NA - Noradrenalina

NADPH - nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio

Na+ - sódio:

NO - óxido nítrico;

NOS - NO-sintases;

ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

PA - Pressão arterial;

pEC50 - logaritmo negativo do EC50;

PKA- Proteína quinase A;

SEM - Média ± erro padrão da média:

SNC - Sistema Nervoso Central:

TH - tirosina-hidroxilase:

TTX- tetrodotoxina

TXA2 - Tromboxano A2

U-46619- U-46619, 9,11-Dideoxy- 9α ,11 α -methanoepoxyprostaglandin F 2α (agonista tromboxano A2)

LISTA DE IMAGENS E FIGURAS

Imagem 1: Composição das camadas dos vasos em microscopia eletrônica (Pág. 11).

Fonte: https://stemcellthailand.org/endothelial-cells-endothelium/

Imagem 2: Estrutura molecular da adrenalina, noradrenalina e dopamina (Págs. 12-13).

Fonte: Imagem: https://www.caymanchem.com/

Imagem 3: Biossíntese das catecolaminas (Pág. 14).

Fonte: Rang, H.P; Dale, M.M. Farmacologia, Editora Elsevier, 7°edição, 2012.p.28,464.

Imagem 4: Modulação da adenilatociclase (AC) mediada por receptores dopaminérgicos. (GDP: guanosina difosfato, GTP: guanosina trifosfato) (Pág. 15)

Fonte: DE SOUZA, B. R. A modulação da via cAMP/PKA pelo sensor neural de cálcio-1 independe de receptores de dopamina. 2007.

Imagem 5: Estrutura molecular da 6-nitrodopamina. (Pág. 16)

Resultados:

Figura 1: Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-contraídos com U-46619. (Pág. 27)

Figura 2: Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-tratados com L-NAME. (Pág. 29)

Figura 3: Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-tratados com ODQ. (Pág. 31)

Figura 4: Efeito de L-NAME e ODQ nas contrações induzidas por Estímulo do campo elétrico (EFS). (Pág. 33)

Figura 5: Efeito da remoção do endotélio e tetrodotoxina (TTX) nas contrações induzidas por EFS. (Pág. 35)

Figura 6: Efeito de 6-ND e L-741.626 nas contrações induzidas por EFS em vasos com endotélio intacto. (Pág. 37)

Figura 7 e 8: Detecção imuno-histoquímica para calretinina em artérias suínas. (Pág. 39-40)

Figura 9-10-11-12-13-14: Detecção imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase em artérias suínas (Pág. 41-43)

LISTA DE TABELAS

<u>Resultados</u>

Tabela S7: Liberação basal diferencial de catecolaminas em artérias suínas (Pág. 25).

Tabela S1: A potência (pEC50) e a resposta máxima (Emax) das curvas de concentração-resposta a 6-Nitrodopamina e L-741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) em artérias suínas na ausência (E-) e presença (E+) de endotélio (Pág. 28).

Tabela S2: A potência (pEC50) e a resposta máxima (Emax) das curvas de concentração-resposta a 6-Nitrodopamina e L-741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) em artérias suínas na ausência e presença de um inibidor da NO sintase (L-NAME ;100 μM) (Pág. 30).

Tabela S3: A potência (pEC50) e a resposta máxima (Emax) das curvas de concentração-resposta para 6-Nitrodopamina e L-741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) em artérias suínas na ausência e presença de um inibidor heme-sítio da proteína solúvel guanilil ciclase (ODQ; 100 μM) (Pág. 32).

Tabela S4: Efeito de um inibidor da NO sintase (L-NAME;100 μM) e um inibidor heme-sítio da guanilil ciclase solúvel (ODQ;100 μM) na contração induzida por Estimulação de Campo Elétrico em artérias suínas isoladas (Pág. 34).

Tabela S5: Estimulação de campo elétrico induziu contração em artérias suínas isoladas na ausência e presença de endotélio (Ε) ou tetrodotoxina (TTx; 1 μΜ) (Pág. 36).

Tabela S6: Efeito de 6-nitrodopamina (6-ND) e L741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) na contração induzida por estimulação de campo elétrico em artérias suínas isolada (Pág. 38).

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	JUSTIFICATIVA	19
3.	OBJETIVOS	19
4.	MÉTODOS	20
4.1	População e amostra do estudo	20
4.2	Preparação arterial	20
4.3	Liberação basal de catecolaminas dos vasos suínos	20
4.4	Análise por LC-MS/MS	21
4.5	Efeito do 6-ND em anéis arteriais pré-contraídos	21
4.6 suíi	Contrações induzidas por estimulação de campo elétrico (EFS) de vas	
4.7	Imuno-histoquímica para anticorpo anti calretinina	22
4.8	Imuno-histoquímica para anticorpo anti-tirosina hidroxilase	23
5.	SUBSTÂNCIAS E MATERIAIS	24
6.	ANÁLISE DE DADOS	24
7.	RESULTADOS	26
7.1	Liberação basal de catecolaminas pelas artérias suínas	26
7.2	Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-contraídos com U-466	
7.3	Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-tratados com L-NAME	30
7.4	Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-tratados com ODQ	32
7.5	Efeito de L-NAME e ODQ nas contrações induzidas por EFS	34
7.4	Efeito da remoção do endotélio e TTX nas contrações induzidas por EFS	36
	Efeito de 6-ND e L-741.626 nas contrações induzidas por EFS em vasos n endotélio intacto	
7.6	Detecção imuno-histoquímica para calretinina em artérias suínas	40
	Deteccão imuno-histoquímica para o anticorpo anti-tirosina hidroxilase er érias coronária, carótida, femoral e renal	
8.	DISCUSSÃO	45
9.	CONCLUSÃO	49
10.	REFERÊNCIAS	50
11. HIS	APÊNDICE – FOTOMICROGRAFIAS DA DETECÇÃO IMUNO- STOQUÍMICA PARA O ANTICORPO ANTI-TIROSINA HIDROXILASE	62

1. INTRODUÇÃO

A morfologia dos vasos sanguíneos é constituída a partir de 3 camadas denominadas de túnicas: a túnica íntima (camada interna), revestida por lâmina elástica que envolve a luz dos vasos e é constituída pelas células endoteliais; túnica média (camada intermediária) formada por células musculares lisas espessas ricas em fibras de colágeno do tipo III; e a túnica adventícia (camada externa), formada por tecido conjuntivo frouxo composto por fibras elásticas, fibroblastos e colágeno tipo I. (Imagem 1) (1)

O endotélio, presente na túnica íntima, é a camada que reveste a parede interna de todos os vasos sanguíneos, composto por células endoteliais, nas quais possuem diversas funções como de homeostasia, para manutenção do fluxo laminar do sangue, função vasorreguladora a partir da síntese de fatores vasoconstritores e vasodilatadores; função de reparo celular e tissular, através da síntese de colágeno, elastina e glicoproteínas (1).

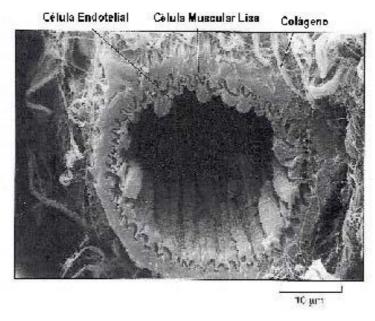


Imagem 1

O endotélio, como citado anteriormente, produz uma série de vasodilatadores e substâncias vasoconstritoras que regulam o tônus vasomotor (2,3) através da liberação de potentes vasodilatadores como a prostaciclina, óxido nítrico (NO), e vasoconstritores como a endotelina. (4)

O NO é um composto gasoso solúvel, que ao ser diluído, possui uma meia vida menor do que 10 segundos, devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato.

(5) A biossíntese de NO ocorre através de dois formatos, o primeiro, no qual a L-arginina é transformada em N^G-hidroxi-L-arginina, na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca²⁺, sendo necessário o O₂ para a formação de L-citrulina e NO. Devido à uma grande solicitação metabólica continuada da L-arginina, existe a neo-síntese da L-arginina nos túbulos proximais renais, a partir da citrulina, que também pode ser convertida diretamente em L-arginina no citoplasma das células endoteliais. É visto que a síntese da citrulina pode ser inibida por análogos da L-arginina, tais como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) e N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), e devido a este efeito em diversos tecidos a substituição do substrato (L-arginina) pelos análogos irá inibir a produção de NO e seus efeitos. (6)

O NO também pode ser sintetizado através do citocromo P₄₅₀ (6), a partir de três isoformas de NO sintase (NOS), a seguir: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Essas isoformas exibem padrões de expressão específicos de tecido e tipo celular. Todas as três isoformas utilizam L-arginina como substrato, oxigênio molecular e NADPH como co-substratos e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e (6R)5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH4) como cofatores. (7)

As catecolaminas: adrenalina, noradrenalina e dopamina (Imagem 2) são classificadas como um grupo de compostos orgânicos, que possuem em sua estrutura o grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno), conectado a um grupo amina por uma ponte etil. (8,9)

Adrenalina

Noradrenalina

Dopamina

Imagem 2: Estrutura molecular da ADR, NA e DA

A via de síntese das catecolaminas é dada através da enzima tirosina hidroxilase (TH), na qual catalisa a conversão do aminoácido tirosina, a partir do aminoácido fenilalanina, em L-DOPA (I-3,4-di-hidroxifenilalanina). Pela ação da dopa descarboxilase, ocorre a catalização de diversos outros aminoácidos L-aromáticos, como a L-histidina e L-triptofano, que são precursores na síntese de histamina e também da L-DOPA em dopamina. A dopamina-β-hidroxilase (DBH), localizada em vesículas sinápticas, converte a dopamina em noradrenalina (NA). A feniletanolamina N-metiltransferase (FNMT) catalisa a N-metilação da noradrenalina para adrenalina. Grande parte da adrenalina nas terminações nervosas ou das células cromafins é transportada pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT) para ser armazenada nas vesículas. E a metabolização das catecolaminas ocorre através das enzimas monoamino-oxidase (MAO-A e MAO-B), e do catecol-o-metiltransferase (COMT), presente em terminações nervosas adrenérgicas, formando consecutivamente o ácido homovanílico (HVA), o principal metabólito da DA. (10,11)

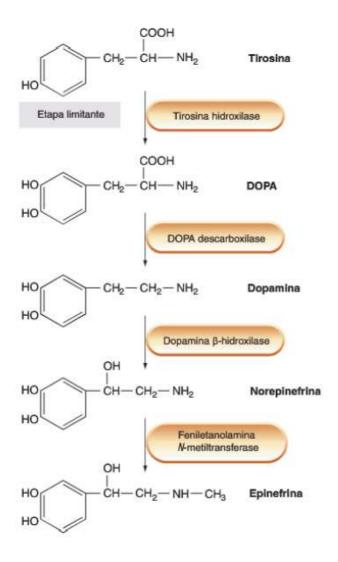


Imagem 3: Biossíntese das catecolaminas

A dopamina foi descrita pela primeira vez por George Barger, James Ewens e Henry Dale em 1910, sendo caracterizada como um composto de monoamina semelhante à epinefrina (12,13), no entanto, na década de 1950, Arvid Carlsson e seus colaboradores demonstraram que a dopamina é um neurotransmissor genuíno, descoberta na qual rendeu a Carlsson o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2000 (12). É precursora imediata da noradrenalina, presente no sistema nervoso central (SNC), onde funciona como neurotransmissor, bem como na medula suprarrenal, com função importante na modulação do tônus vascular, pressão arterial, função renal, adrenal, e equilíbrio do sódio. (14)

A dopamina tem efeitos inotrópicos e cronotrópicos diretos no coração dos mamíferos, além de causar constrição das artérias coronárias, possuindo um papel importante na fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica. (15)

Através da ativação de receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e $\beta 1,2,3$ -adrenérgicos, as catecolaminas modulam o tônus da vasculatura (16) e obtém respostas diferentes para cada receptor e tecido, uma vez que está envolvida em vários processos fisiológicos. (17)

Os efeitos fisiológicos gerados pela dopamina são mediados por receptores acoplados à proteína G (GPCR), a partir dos receptores dopaminérgicos, nos quais são divididos em 2 grupos: D_{1-like} (D₁ e D₅) e D_{2-like} (D₂, D₃, D₄). (11)

Conforme imagem 4, os receptores do tipo D_{1-like} são acoplados à proteína Gsα, com a despolarização da membrana (entrada de Na⁺ e saída de K⁺) e abertura dos canais de Ca²⁺ voltagem-dependente, e por conseguinte à propagação do estímulo elétrico, ocorre a ativação do adenilato ciclase (AC), resultando na conversão de ATP em AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) e consequentemente a ativação da PKA (proteína quinase A), que resulta em vasodilatação. (11)

Enquanto que os receptores do tipo D_{2-like} estão acoplados à proteína Giα e geram inibição da atividade da AC e redução dos níveis de AMPc e, consequentemente, a diminuição da ativação de PKA, ocasionando a vasoconstrição. (11)

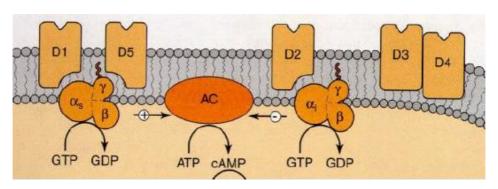


Imagem 4: (18) Modulação da adenilatociclase (AC) mediada por receptores dopaminérgicos. (GDP: guanosina difosfato, GTP: guanosina trifosfato)

Foi visto que a síntese e a liberação de catecolaminas está associada à existência de terminais nervosos nos vasos. (19-20)

Todavia, recentemente foi demonstrado que vasos umbilicais humanos (21), assim como aorta de *Chelonoidis carbonaria* (22) exibem liberação de

dopamina, sendo esta dependente da viabilidade do endotélio. Vale ressaltar que estes vasos não possuem inervação, demonstrado através de imuno-histoquímica, com ausência de marcadores nervosos. Foi identificado em células endoteliais de aorta de *Chelonoidis carbonaria* (23) e de artérias e veias umbilicais humanas, a presença da enzima tirosina hidroxilase, responsável por catalisar a conversão de L-tirosina em L-DOPA. (24)

É sabido que através de diferentes mecanismos bioquímicos ocorre formação de nitroderivados de catecolaminas, e que em pH fisiológico, NO reage de forma eficaz com neurotransmissores de catecolaminas (dopamina e noradrenalina) originando 6-nitroderivados. (25)

As nitrocatecolaminas: 6-Nitrodopamina (Imagem 5) 6е nitronoradrenalina, são produtos da presumível nitração dependente de óxido nítrico (NO) de dopamina e noradrenalina, e relatados como inibidores competitivos reversíveis do óxido nítrico neuronal sintase (nNOS) (26). Foi observado que a 6-nitronoradrenalina e 6-nitroadrenalina foram extraídas do cérebro de ratos (27,28) e o transporte de noradrenalina em sinaptossomas de ratos é bloqueado por 6-nitronoradrenalina (27). Essas nitrocatecolaminas têm sido propostas como mediadoras neuronais no sistema nervoso central, uma vez que a administração intratecal de 6-nitronoradrenalina induz analgesia devido à liberação de noradrenalina (29)

Imagem 5: Estrutura molecular da 6-ND

A estimulação de campo elétrico (EFS) é uma técnica na qual é aplicado uniformemente um estímulo de campo a um tecido isolado, em ondas de largura de pulso curto, (30,31). A EFS pode causar contração ou relaxamento do tecido, a depender do(s) mediador(es) liberado(s) (31,32). Ao ser realizado o estímulo de campo elétrico, foi visto que o mesmo induz contrações de vasos do cordão umbilical, dependentes da presença do endotélio, essas contrações são potencializadas na presença de L-NAME (inibidor de óxido nítrico sintase). O

cordão umbilical não detém de inervações, sendo comprovado através de técnica de imunofluorescência, na qual não foi identificado fibras nervosas. (24)

Tecidos vasculares como vasos do cordão umbilical humano (33) anéis aórticos de *Chelonoidis carbonarius* (34), *Pantherophis guttatus* (35) e de *Callithrix spp* (36) apresentam liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), ao serem analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). A síntese/liberação de 6-ND é inibida quando esses tecidos vasculares são pré-incubados com o inibidor de óxido nítrico sintase (L-NAME), e quando o endotélio é removido mecanicamente.

A 6-ND é um potente agente vasorrelaxante, comportando-se como um antagonista verdadeiramente seletivo do receptor D_{2-like} da dopamina nesses tecidos. No sistema cardiovascular, o 6-ND também atua como cronotrópico positivo (37), sendo cem vezes mais potente que as catecolaminas clássicas, noradrenalina e adrenalina.

Neste estudo, determinamos se os vasos de suínos, como artérias coronárias, carótidas, femorais e renais, liberam 6-ND e o efeito desta nova catecolamina sobre eles.

2. JUSTIFICATIVA

Tema de relevância, especificamente no quesito de xenotransplantes. Embora, de uma perspectiva imunológica, os órgãos de primatas não humanos sejam mais adequados geneticamente para xenotransplantes, muitas espécies de primatas não humanos estão em perigo de extinção ou são muito pequenos para fornecer órgãos apropriados para xenotransplantes em humanos adultos grandes. Por exemplo, no primeiro transplante de coração realizado em humano envolvendo um doador chimpanzé, o coração era muito pequeno para suportar a circulação (38). Desta maneira, os suínos são considerados a melhor espécie como fonte de xenotransplante, uma vez que sua disponibilidade é ilimitada e sua anatomia e fisiologia são próximas aos humanos (39). De fato, um xenotransplante com coração suíno foi realizado em uma pessoa (40). Assim, a obtenção de conhecimentos neste assunto, possibilitará no futuro, um avanço em terapia de diversas situações fisiopatológicas.

3. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

No presente estudo, é proposto ampliar a investigação sobre a ação da 6-nitrodopamina.

Objetivos Específicos

- a. Liberação da 6-ND, e observação de sua potência vasodilatadora em vasos suínos.
- b. Avaliar e quantificar por espectrometria de massa (LC-MS/MS) a liberação basal de 6-ND, dopamina, noradrenalina e adrenalina.
- c. Caracterizar o efeito vasodilatador da 6-ND em vasos pré-contraídos providos e desprovidos de endotélio;
- d. Efeito da 6-ND na contração induzida por EFS na presença e ausência de endotélio íntegro;
- e. Avaliar a presença do marcador de célula neural, calretinina, através de imuno-histoquímica em todos os vasos testados.
- f. Através da imuno-histoquímica avaliar a presença da enzima tirosina hidroxilase nas células endoteliais dos vasos testados.

4. MÉTODOS

4.1 População e amostra do estudo

Suínos machos adultos (*Sus scrofa domesticus*; 90 a 120 kg) foram fornecidos pela Granja Geraldo José Vermeulen (Hortolândia, SP, Brasil). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UNICAMP (CEUA; Protocolo nº 5585-1/2020 e 5526-1/2020) seguindo as Diretrizes Brasileiras para Produção, Manutenção e Uso de Animais para Ensino ou Pesquisa do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA), bem como seguindo as diretrizes ARRIVE (41).

4.2 Preparação arterial

Suínos machos adultos foram eutanasiados por cetamina (15 mg/kg; IM), fentanil (25 mg/kg; IV) e administração de tiopental (100 mg/kg; IV) seguido de exsanguinação. Após a eutanásia, a veia cava superior e as artérias carótidas, coronárias descendentes esquerdas, femorais, renais e pulmonares foram removidas, com cuidado especial para não danificar a camada endotelial ou dilatar demais os vasos durante o procedimento. As artérias foram colocadas em um recipiente com solução de Krebs-Henseleit fria (4°C) (KHS, em mM: NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2 e dextrose 5,6; pH 7,4, 95% O₂ / 5% CO₂). Quando necessário, a remoção das células endoteliais foi realizada esfregando suavemente os vasos com pinças.

4.3 Liberação basal de catecolaminas dos vasos suínos

Dois anéis (15 mm de diâmetro) de cada carótida, anéis descendentes da artéria coronária, femoral e renal e duas tiras da veia cava superior e da artéria pulmonar (15 mm de comprimento), com endotélio íntegro foram colocados em um órgão de 5 mL banho contendo KHS aquecido (37 °C) e oxigenado (95% O2 / 5% CO2) e ácido ascórbico (3 mM) por 30 minutos. As tiras foram incubadas por 30 minutos e uma alíquota de 2 mL foi coletada e armazenada a -20 °C até

a análise. Protocolos semelhantes foram realizados em anéis desnudados das artérias femoral e carótida.

4.4 Análise por LC-MS/MS

O método empregado para a quantificação de 6-ND (34) foi modificado para permitir a dosagem das quatro catecolaminas (6-ND, dopamina, noradrenalina e adrenalina) em uma única corrida cromatográfica. Resumidamente, a extração das catecolaminas do KHS (1 mL) foi realizada por extração em fase sólida. Utilizados como padrões internos, 50 μL (100 ng/mL) das catecolaminas deuteradas foram adicionados a 1 mL de KHS e as amostras foram homogeneizadas por 10 segundos. Os cartuchos poliméricos de extração em fase sólida reversa (SPE) Strata™-X de 33 µm foram pré-lavados com MeOH (1 mL) seguido de H2O deionizada (2 mL). Após a introdução da amostra no cartucho, o cartucho foi posteriormente lavado 3 vezes com H₂O deionizada. As catecolaminas foram então eluídas com 900 mL de MeOH/H2O (90/10, v/v) com ácido fórmico (0,1%). O eluato foi evaporado sob fluxo de N2 a 50 °C. O resíduo foi dissolvido em 100 mL de acetonitrila/H2O (50/50, v/v) com ácido fórmico 0,1% e transferido para frascos prontos para injeção na fase móvel 75% de A composto de H2O deionizado com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e 25% de B composto de acetonitrila/H2O (90/10, v/v) com ácido fórmico a 0,1. A fase móvel perfundiu um Sistema Shimadzu de Cromatografia Líquida LC ADvp acoplado a um Espectrômetro de Massa Triplo Quadrupolo Shimadzu 8060 operando no modo ESP+ a 350 mL/min (Shimadzu Corp., Kyoto, JP). Os resíduos dissolvidos foram injetados por um autoinjetor SIL-30AC a 8°C. As transições monitoradas por eletrospray monitoramento de reação múltipla (MRM), volume de injeção, tempo de execução e limite de quantificação foram descritos em outro lugar (35,37). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média.

4.5 Efeito do 6-ND em anéis arteriais pré-contraídos

Resumidamente, anéis (5 mm) das artérias carótida, coronária descendente esquerda, femoral e renal foram suspensos verticalmente entre dois ganchos de metal em banhos de órgãos de 10 mL contendo KHS,

continuamente gaseados com uma mistura de 95% O₂: 5% CO₂ (pH 7,4) a 37 °C. Os tecidos foram equilibrados sob uma tensão de repouso de 10 mN, e a tensão isométrica foi registrada usando o sistema PowerLab (ADInstruments, Inc., Dunedin, Nova Zelândia).

Os anéis arteriais com endotélio íntegro e desnudo foram pré-contraídos com o tromboxano A2 (TXA₂) mimético U-46619 (3 nM). Após a obtenção de uma contração sustentada, curvas cumulativas de concentração-resposta para 6-ND (10 pM - 1 μ M) ou o antagonista seletivo do receptor D₂ da dopamina L-741,626 (10 pM - 1 μ M) foram realizadas (42). Em um conjunto separado de experimentos, os anéis de artéria foram pré-incubados com o inibidor de óxido nítrico sintase L-NAME (100 μ M) ou o inibidor de heme-sítio da guanilil ciclase solúvel ODQ (100 μ M). As respostas de relaxamento foram expressas como porcentagem da resposta contrátil.

4.6 Contrações induzidas por estimulação de campo elétrico (EFS) de vasos suínos

Anéis arteriais com endotélio intacto e sem endotélio foram submetidos a EFS a 60 V por 30 segundos, a 8-16 Hz em pulsos de onda quadrada (largura de pulso de 0,3 ms, atraso de 0,1 ms), usando um estimulador Grass S88 (Grass Instruments, Astro-Med. Inc., West Warwick, RI, EUA). As contrações induzidas por EFS de anéis de artérias com endotélio intacto foram realizadas na presença ou não de L-NAME (100 μ M), ODQ (100 μ M), tetrodotoxina (TTX; 1 μ M), 6-ND (1 μ M) ou o antagonista seletivo do receptor D2 da dopamina L-741.626 (1 μ M). Cloreto de potássio (KCI, 80 mM) foi adicionado no início e no final dos protocolos experimentais para avaliar a reatividade do tecido após EFS. (21)

4.7 Imuno-histoquímica para anticorpo anti calretinina

A imuno-histoquímica foi realizada manualmente. Resumidamente, seções de 4 a 5 mm de amostras previamente fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina de artérias do *Sus domesticus* (ramo descendente anterior esquerdo da coronária, renal, carótida e femoral; N = 4, uma amostra por tipo de artéria) foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em uma série de banhos de etanol de concentração crescente. Em seguida, foram incubados em tampão citrato a pH 6,0 em vaporizador por 40 minutos (a aproximadamente 95

°C). Em seguida, os cortes foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente (25 °C) com anticorpo monoclonal de camundongo anticalretinina (código de catálogo: ab92341; diluição: 1:100 em PBS; Abcam, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente, essas seções foram incubadas com o NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra/Leica Biosystems, Wetzlar, DE), seguindo as instruções do fabricante e usando diaminobenzidina (líquido DAB, DakoCytomation, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) como cromógeno (que produz um precipitado marrom no local de ligação do anticorpo). Por fim, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e alocados em lamínulas com interface com Entellan. Seções fixadas em formalina e embebidas em parafina de plexo mioentérico humano e cérebro *Sus domesticus* foram usadas como controles positivos para a presença de calretinina. Todas as lâminas foram examinadas usando um microscópio trinocular Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, JP) acoplado a uma câmera digital CMOS de 10MP (AmScope, Irvine, CA, EUA).

4.8 Imuno-histoquímica para anticorpo anti-tirosina hidroxilase

As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% e, posteriormente foram submetidas ao protocolo de processamento histológico em um histotécnico da marca Lupetec. As amostras foram artérias do Sus domesticus (ramo descendente anterior esquerdo da coronária, renal, carótida e femoral; N = 4, uma amostra por tipo de artéria). Para a imuno-histoquímica foram feitos cortes de 4 µm. As amostras dispostas em lâminas silanizadas foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em uma série de banhos de etanol de concentração crescente. As amostras foram incubadas em tampão citrato a pH 6,0 em panela a vapor por 40 minutos (a aproximadamente 95°C). Em seguida, foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente (25°C) com anti-tirosina hidroxilase (código de catálogo: ab76442; diluição: 1:500 em PBS; Abcam, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente, essas amostras foram incubadas com o NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra/Leica Biosystems, Wetzlar, DE), seguindo as instruções do fabricante, e usando diaminobenzidina (líquido DAB, DakoCytomation, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) como cromógeno (que produz um precipitado marrom no local de ligação do

anticorpo). Por fim, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e montados em lamínulas com interface com Entellan. Cortes fixados em formalina e embebidas em parafina de gânglios da base humano e cerebelo de *Sus domesticus* foram usadas como controles positivos para a presença de tirosina hidroxilase. Todas as lâminas foram avaliadas, usando um microscópio trinocular Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, JP) acoplado a uma câmera digital CMOS de 10MP (AmScope, Irvine, CA, EUA).

5. SUBSTÂNCIAS E MATERIAIS

Dopamina, cloridrato de éster metílico de Nω-nitro-L-arginina (L-NAME) e ácido ascórbico foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, MO, EUA). Adrenalina, noradrenalina, L-741,626, 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ), tetrodotoxina e U-46619 foram adquiridos da Cayman Chemical Co (Ann Arbor, MI, EUA). 6-Nitrodopamina e 6-nitrodopamina-d₄ foram adquiridos da Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario, CA). Cloridrato de dopamina-d3, cloridrato de DL-noradrenalina-d6 e cloridrato de adrenalina-d6 foram adquiridos da CDN Isotopes (Pointe-Clair, Quebec, CA). Os cartuchos Strata™-X 33-mm Polymeric Reversed SPE foram adquiridos da Phenomenex (Torrance, CA, EUA) e as colunas GIST-HP C18 foram obtidas da Shimadzu Europa (Duisburg, DE). Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), sulfato de magnésio (MgSO₄), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e glicose foram adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, DE).

6. ANÁLISE DE DADOS

A análise de regressão não linear para determinar o pEC₅₀ foi realizada usando GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 9.4, San Diego, CA, EUA) com a restrição de que F = 0. Todos os dados de concentração-resposta foram avaliados para um ajuste a uma função logística em a forma: E = E_{max}/([1+(10c/10x)n]+F, onde E representa o aumento da resposta contrátil induzida pelo agonista; Emax é o efeito máximo do agonista; c é o logaritmo da concentração do agonista que produz 50% de E_{max}; x é o logaritmo da concentração da droga; o termo exponencial, n, é um parâmetro de ajuste de

curva que define a inclinação da linha concentração-resposta, e F é a resposta observada na ausência de droga adicionada. Os valores dos dados EC50 representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de n experimentos. Os valores de E_{max} foram expressos em níveis percentuais de relaxamentos da précontração induzida por U-46619 (protocolos de relaxamento).

Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de experimentos. Nos experimentos farmacológicos, o número de experimentos é expresso como x/y, onde x representa o número de animais e y o número de anéis empregados no experimento. As contrações foram quantificadas em mili-Newtons (mN). Um anel foi usado como resposta de controle e o outro anel foi incubado com um antagonista/inibidor. Um teste t não pareado de 2 caudas foi empregado e as diferenças entre os grupos e P < 0,05 foram consideradas significativas. Para análise de E_{max} e pEC50, foi usado um teste t não pareado.

7. RESULTADOS

7.1 Liberação basal de catecolaminas pelas artérias suínas

7. Vessel	6-Nitrodopamine	Dopamine	Noradrenaline	Adrenaline
Coronary artery E+	+	++++	-	-
Femoral artery E+	+	++	-	++++
Femoral artery E-	-	+	-	+
Carotid artery E+	+	++	-	+++
Carotid artery E-	-	+	-	+
Renal artery E+	++	-	-	-
Pulmonary artery E+	+	+++	-	++
Superior vena cava E+	+	++	-	++++

Tabela S7. Liberação basal diferencial de catecolaminas em artérias suínas.

Em vasos com endotélio intacto, a liberação basal de 6-ND foi observada nas artérias coronária, anéis carotídeos, artéria renal, artéria pulmonar, veia cava superior. Nos anéis arteriais com ausência de endotélio, o 6-ND não foi detectado nos anéis femoral e carotídeo.

Em vasos com endotélio intacto, a liberação basal de dopamina foi observada em artéria coronária, artéria femoral, artéria carótida. Níveis de dopamina foram detectados em artéria pulmonar, veias cavas superiores. Em vasos com ausência do endotélio, a dopamina foi detectada em artéria femoral, anéis da artéria carótida.

Em vasos com endotélio íntegro, a liberação basal de adrenalina foi detectada na artéria femoral, artéria carótida, artéria, veias cavas superiores. Nenhuma liberação basal de adrenalina foi detectada nos anéis das artérias coronárias e renais. Em vasos com ausência do endotélio, a adrenalina foi detectada em artéria, artéria carótida. Não foi detectada liberação basal de noradrenalina em nenhum dos vasos investigados.

Em vasos com endotélio intacto, a liberação basal de 6-ND foi observada em 10 de 20 anéis de artéria coronária $(0,2\pm0,1\ ng/mL)$, em 10 de 32 anéis de artéria femoral $(0,3\pm0,1\ ng/mL)$, em 12 de 32 anéis carotídeos $(0,2\pm0,1\ ng/mL)$, em 10 de 10 anéis de artéria renal $(1,0\pm0,3\ ng/mL)$, em 16 de 36 tiras de artéria pulmonar $(0,2\pm0,1\ ng/mL)$, em 12 de 20 veia cava superior $(0,2\pm0,1\ ng/mL)$. Nos anéis arteriais despidos de endotélio, o 6-ND não foi detectado nos anéis femoral $(14\ anéis)$ e carotídeo $(16\ anéis)$.

Em vasos com endotélio intacto, a liberação basal de dopamina foi observada em 6 de 20 anéis de artéria coronária (25,2 \pm 9,5 ng/mL), em 10 de 32 anéis de artéria femoral (0,7 \pm 0,2 ng/mL), em 16 de 32 anéis da artéria carótida (2,1 \pm 0,5 ng/mL). Níveis de dopamina foram detectados em 30 de 36 tiras de artéria pulmonar (5,6 \pm 1,7 ng/mL), em 4 de 20 veias cavas superiores (2,1 \pm 0,5 ng/mL). Em vasos despidos de endotélio, a dopamina foi detectada em 6 dos 14 anéis da artéria femoral (0,2 \pm 0,1 ng/mL) e 6 dos 16 anéis da artéria carótida (0,2 \pm 0,1 ng/mL).

Em vasos com endotélio íntegro, a liberação basal de adrenalina foi detectada em 20 dos 20 anéis da artéria femoral (17,6 \pm 6,2 ng/mL) e em 32 dos 32 anéis da artéria carótida (10,4 \pm 5,7 ng/mL), em 12 dos de 24 tiras de artéria pulmonar (0,7 \pm 0,1 ng/mL) e em 20 de 20 veias cavas superiores (17,8 \pm 4,0 ng/mL). Nenhuma liberação basal de adrenalina foi detectada nos anéis das artérias coronárias e renais. Em vasos despidos de endotélio, a adrenalina foi detectada em 10 dos 14 anéis da artéria femoral (0,4 \pm 0,1 ng/mL) e 8 dos 16 anéis da artéria carótida (0,2 \pm 0,1 ng/mL). Não foi detectada liberação basal de noradrenalina em nenhum dos vasos investigados.

7.2 Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-contraídos com U-46619



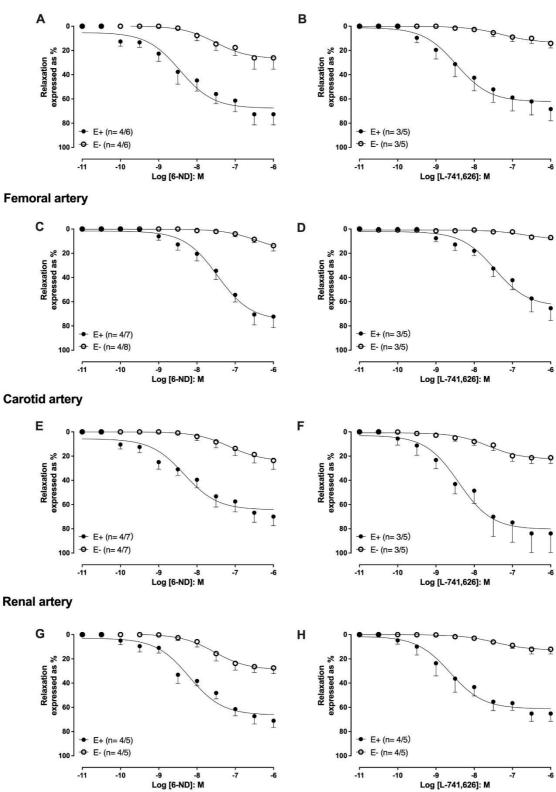


Figura 1

Drug/Vessel	pEC ₅₀ (log [M]	E _{max} [%]	n
6-Nitrodopamine			
Coronary artery E+	8.49 ± 0.37	72.65 ± 8.79	4/6
Coronary artery E-	7.67 ± 0.21*	26.08 ± 9.38*	4/6
Femoral artery E+	7.54 ± 0.15	72.30 ± 9.28	4/7
Femoral artery E-	5.45 ± 0.75*	13.73 ± 4.46*	4/8
Carotid artery E+	8.53 ± 0.26	69.88 ± 7.67	4/7
Carotid artery E-	7.22 ± 0.34*	23.56 ± 7.31*	4/7
Renal artery E+	8.11 ± 0.13	71.06 ± 5.5	4/5
Renal artery E-	7.33 ± 0.32*	27.48 ± 4.77*	4/5
L-741,626			
Coronary artery E+	8.45 ± 0.20	68.32 ± 9.68	3/5
Coronary artery E-	6.51 ±1.22*	14.10 ±3.86*	3/5
Femoral artery E+	7.47 ± 0.19	65.40 ± 10.34	3/5
Femoral artery E-	7.07 ± 0.37 *	7.06 ± 1.85*	3/5
Carotid artery E+	8.40 ± 0.22	83.82 ±15.08	4/5
Carotid artery E-	7.67 ± 0.25*	21.32 ± 4.85*	4/5
Renal artery E+	8.59 ± 0.33	65.16 ± 6.48	4/5
Renal artery E-	7.96 ± 0.31*	12.05 ± 3.88*	4/5

Tabela S1: A potência (pEC₅₀) e a resposta máxima (Emax) das curvas de concentraçãoresposta a 6-Nitrodopamina e L-741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) em artérias suínas na ausência (E-) e presença (E+) de endotélio.

Em anéis de artéria coronária pré-contraídos com a substância U-46619 (3 nM), composto com papel de agonista do tromboxano A2, a 6-ND (Fig. 1A) e L-741.626 (Fig. 1B) causaram relaxamentos dependentes da concentração, que foram fortemente reduzidos em anéis arteriais sem endotélio (Figs. 1A e 1B; Tabela S1). Resultados semelhantes foram observados nos anéis da artéria femoral (Figs. 1C e 1D; Tabela S1), anéis da artéria carótida (Figs. 1E e 1F) e nos anéis da artéria renal (Figs. 1G e 1H; Tabela S1)

^{*}pEC₅₀ é definido como o logaritmo negativo de EC₅₀; Emax é o efeito máximo na concentração máxima da droga; n é o número de anéis de vaso. * P < 0.05 em comparação com os respectivos valores de controle.

7.3 Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-tratados com L-NAME

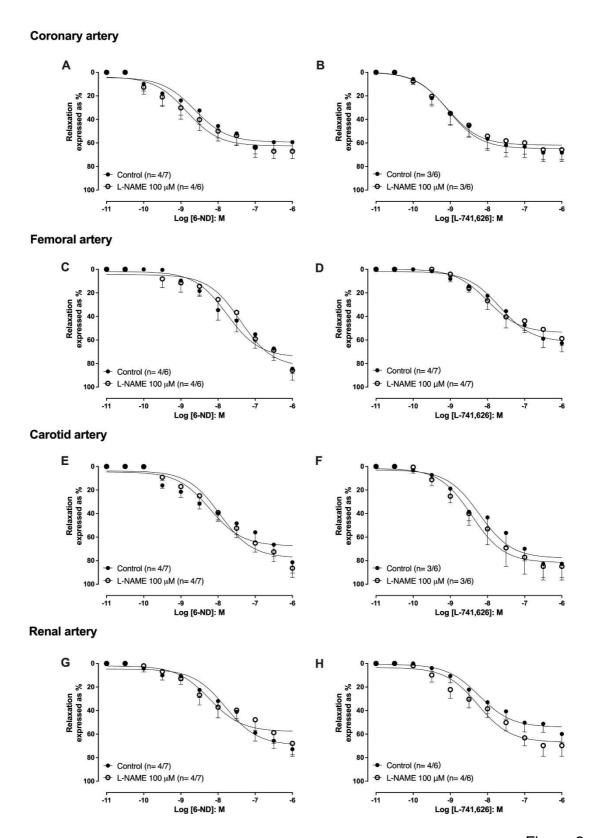


Figura 2

.

Drug/Vessel	pEC ₅₀ (log [M]	E _{max} [%]	N
6-Nitrodopamine			
Coronary artery	8.57 ± 0.36	59.28 ± 7.54	4/7
Coronary artery + L-NAME 100 μM	8.84 ± 0.35	67.02 ± 6.29	4/6
Femoral artery	7.60 ± 0.33	84.39 ± 4.17	4/6
Femoral artery + L-NAME 100 μM	7.63 ± 0.43	85.78 ± 8.46	4/6
Carotid artery	8.11 ± 0.30	81.41 ± 9.17	4/7
Carotid artery + L-NAME 100 μM	7.77 ± 0.27	86.37 ± 8.02	4/7
Renal artery	7.87 ± 0.20	72.78 ± 6.36	4/7
Renal artery + L-NAME 100 μM	7.95 ± 0.22	67.87 ± 9.68	4/7
L-741,626			
Coronary artery	8.87 ± 0.24	68.22 ± 7.61	3/6
Coronary artery + L-NAME 100 μM	8.89 ± 0.20	65.78 ± 8.53	3/6
Femoral artery	7.64 ± 0.18	62.76 ± 7.33	4/7
Femoral artery + L-NAME 100 μM	7.92 ± 0.30	58.82 ± 6.05	4/7
Carotid artery	8.21 ± 0.31	82.68 ± 11.71	3/6
Carotid artery + L-NAME 100 μM	8.33 ± 0.33	84.86. ± 11.60	3/6
Renal artery	8.59 ± 0.33	59.87 ± 7.48	4/6
Renal artery + L-NAME 100 μM	8.19 ± 0.25	69.72 ± 9.12	4/6

Tabela S2. A potência (pEC50) e a resposta máxima (Emax) das curvas de concentração-resposta a 6-Nitrodopamina e L-741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) em artérias suínas na ausência e presença de um inibidor da NO sintase (L-NAME ;100 μM).

*pEC50 é definido como o logaritmo negativo de EC50; Emax é o efeito máximo na droga alta; n significa o número de anéis de vasos. * P < 0,05 em comparação com os respectivos valores de controle

Os relaxamentos induzidos por 6-ND (Fig. 2A; Tabela S2) e L-741.626 (Fig. 2B; Tabela S2) não foram afetados pelo pré-tratamento dos anéis da artéria coronária descendente esquerda com L-NAME (100 mM). Resultados semelhantes foram observados nos anéis da artéria femoral (Figs. 2C e 2D; Tabela S2), anéis da artéria carótida (Figs. 2E e 2F; Tabela S2) e nos anéis da artéria renal (Figs. 2G e 2H; Tabela S2).

7.4 Efeito de 6-ND e L-741.626 em anéis arteriais pré-tratados com ODQ

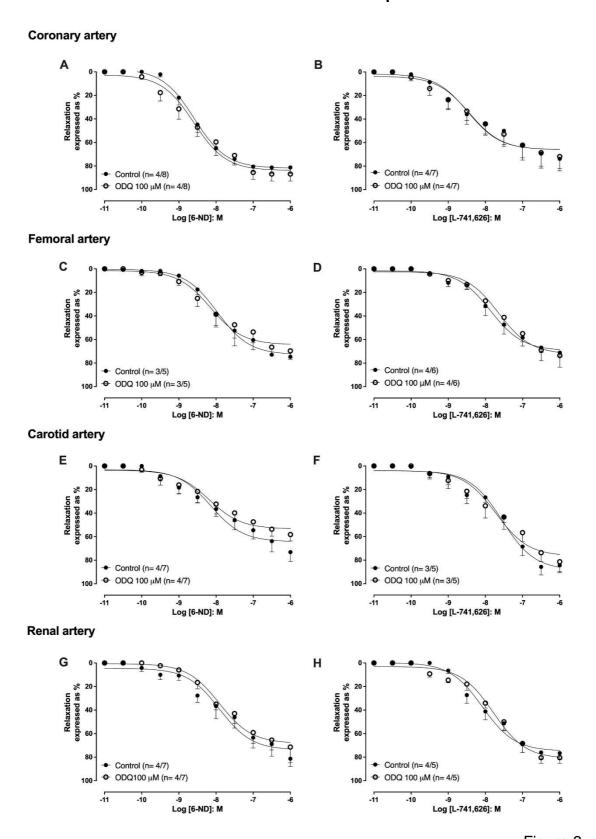


Figura 3

Drug/Vessel	pEC ₅₀ (log [M])	E _{max} [%]	n
6-Nitrodopamine			
Coronary artery	8.56 ± 0.12	73.80 ± 8.15	4/8
Coronary artery + ODQ 100 μM	8.57 ± 0.22	71.89 ± 12.10	4/8
Femoral artery	7.75 ± 0.28	74.65 ± 2.36	3/5
Femoral artery + ODQ 100 μM	7.99 ± 0.30	69.67 ± 6.12	3/5
Carotid artery	8.13 ± 0.25	73.10 ± 7.80	4/7
Carotid artery + ODQ 100 μM	8.29 ± 0.36	58.20 ± 5.50	4/
Renal artery	8.00 ± 0.17	81.31 ± 6.72	4/7
Renal artery + ODQ 100 μM	7.72 ± 0.18	71.42 ± 13.36	4/7
L-741,626			
Coronary artery	7.72 ± 0.70	73.80 ± 8.15	4/7
Coronary artery + ODQ 100 μM	8.24 ± 0.43	71.89 ± 12.10	4/7
Femoral artery	8.23 ± 0.52	71.11 ± 3.04	4/6
Femoral artery +	7.45 ± 0.20	75.53 ± 9.96	4/6
ODQ 100 μM			
Carotid artery	7.63 ± 0.30	84.39 ± 6.33	3/5
Carotid artery + ODQ 100 μM	7.71 ± 0.60	81.36 ± 8.60	3/5
Renal artery	7.99 ± 0.18	76.58 ± 4.90	4/5
Renal artery + ODQ 100 μM	7.56 ± 0.26	80.40 ± 4.83	4/5

Tabela S3. A potência (pEC₅₀) e a resposta máxima (Emax) das curvas de concentraçãoresposta para 6-Nitrodopamina e L-741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) em artérias suínas na ausência e presença de um inibidor heme-sítio da proteína solúvel guanilil ciclase (ODQ; 100 μM)

Os relaxamentos induzidos por 6-ND (Fig. 3A; Tabela S3) e L-741.626 (Fig. 3B; Tabela S3) não foram afetados pelo pré-tratamento dos anéis da artéria coronária com ODQ (100 mM). Resultados semelhantes foram observados nos anéis da artéria femoral (Figs. 3C e 3D; Tabela S3), anéis da artéria carótida (Figs. 3E e 3F; Tabela S3) e nos anéis da artéria renal (Figs. 3G e 3H; Tabela S3).

^{*}pEC50 é definido como o logaritmo negativo de EC50; Emax é o efeito máximo na droga alta; n significa o número de anéis de vasos. * P < 0,05 em comparação com os respectivos valores de controle.

7.5 Efeito de L-NAME e ODQ nas contrações induzidas por EFS

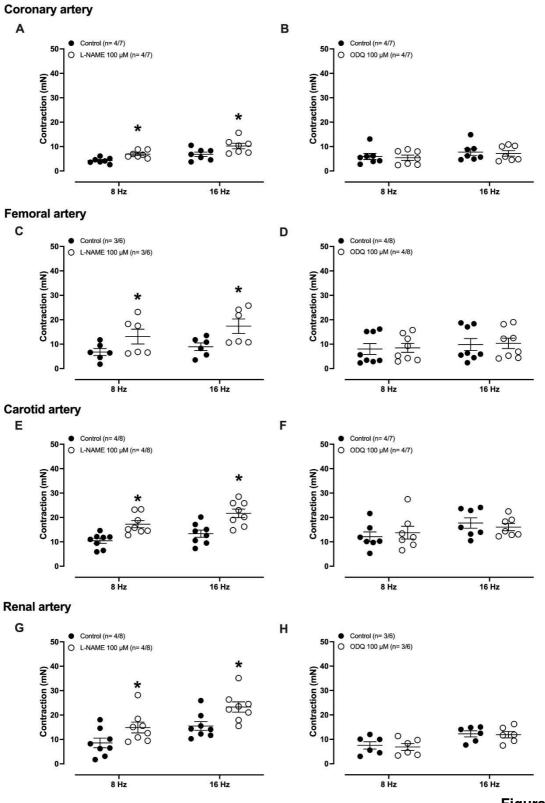


Figura 4

Drug/Vessel	اللما حال ٥	16 Hz [mN]	
Drug/Vessel	8 Hz [mN]	16 Hz [mN]	n
Coronary artery	4.25 ± 0.42	6.81 ± 0.90	4/7
Coronary artery + L-NAME 100 μM	6.89 ± 0.54*	10.21 ± 1.40*	4/7
Femoral artery	6.76 ± 1.43	8.91 ± 1.56	3/6
Femoral artery + L-NAME 100 μM	13.08 ± 3.03*	17.36 ± 2.96*	3/6
Carotid artery	10.42 ± 1.05	13.34 ± 1.49	4/8
Carotid artery + L-NAME 100 μM	17.23 ± 1.44*	21.67 ± 1.74*	4/8
Renal artery	8.57 ± 1.96	15.48 ± 1.80	4/8
Renal artery + L-NAME 100 μM	14.89 ± 2.21*	23.28 ± 2.09*	4/8
Coronary artery	5.94 ± 1.28	7.74 ± 1.36	4/7
Coronary artery + ODQ 100 μM	5.43 ± 1.07	7.19 ± 1.14	4/7
Femoral artery	8.00 ± 2.22	9.84 ± 2.44	4/8
Femoral artery + ODQ 100 μM	8.46 ± 1.83	10.33 ± 2.13	4/8
Carotid artery	12.09 ± 1.97	17.72 ± 2.13	4/7
Carotid artery + ODQ 100 μM	13.76 ± 2.62	16.04 ± 1.47	4/7
Renal artery	7.51 ± 1.48	12.24 ± 1.25	3/6
Renal artery + ODQ 100 μM	6.85 ± 1.38	11.81 ± 1.32	3/6

Tabela S4. Efeito de um inibidor da NO sintase (L-NAME;100 μ M) e um inibidor heme-sítio da guanilil ciclase solúvel (ODQ;100 μ M) na contração induzida por Estimulação de Campo Elétrico em artérias suínas isoladas.

A estimulação do campo elétrico causou contrações dependentes da frequência (8 e 16 Hz) dos anéis da artéria coronária (Figs. 4A e 4B; Tabela S4), que foram significativamente potencializadas pelo pré-tratamento com L-NAME (30 min; Fig. 4A; Tabela S4), mas não afetado pelo pré-tratamento (30 min) com ODQ (100 mM; Fig. 4B; Tabela S4). Resultados semelhantes foram observados nos anéis da artéria femoral (Figs. 4C e 4D; Tabela S4), anéis da artéria carótida (Figs. 4E e 4F; Tabela S4) e nos anéis da artéria renal (Figs. 4G e 4H; Tabela S4).

^{*} P < 0,05 em comparação com os respectivos valores de controle.

7.4 Efeito da remoção do endotélio e TTX nas contrações induzidas por EFS

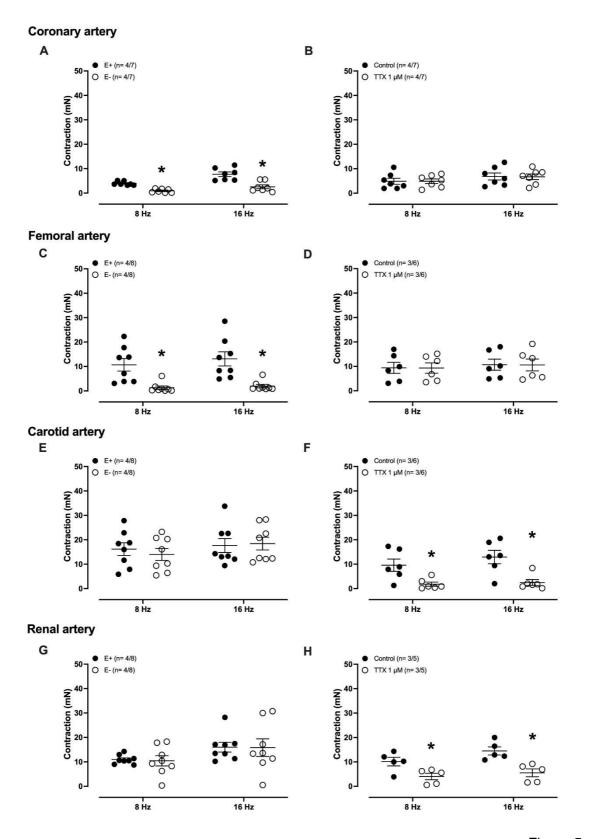


Figura 5

Drug/Vessel	8 Hz [mN]	16 Hz [mN]	n
Coronary artery E+	7.72 ± 0.95	2.56 ± 0.80	4/7
Coronary artery E-	$3.94 \pm 0.30^*$	0.91 ± 0.29*	4/7
Femoral artery E+	10.67 ± 2.56	13.12 ± 2.88	4/8
Femoral artery E-	1.29 ± 0.71*	1.95 ± 0.70*	4/8
Carotid artery E+	16.16 ± 2.63	17.63 ± 2.86	4/8
Carotid artery E-	13.99 ± 2.46	18.42 ± 2.61	4/8
Renal artery E+	10.97 ± 0.66	16.01 ± 1.99	4/8
Renal artery E-	10.43 ± 2.10	15.80 ± 3.60	4/8
Coronary artery E+	4.86 ± 1.19	6.82 ± 1.42	4/7
Coronary artery + TTx 1 μM	4.88 ± 0.93	6.70 ± 1.14	4/7
Femoral artery E+	9.40 ± 2.26	10.69 ± 2.27	3/6
Femoral artery+ TTx 1 μM	9.31 ± 2.09	10.57 ± 2.42	3/6
Carotid artery E+	9.58 ± 2.51	12. 93 ± 2.74	3/6
Carotid artery + TTx 1 μM	1.82 ± 0.85*	2.48 ± 1.22*	3/6
Renal artery E+	10.11 ± 1.73	14.49 ± 1.65	3/5
Renal artery + TTx 1 μM	4.04 ± 1.32*	5.52 ± 1.60*	3/5

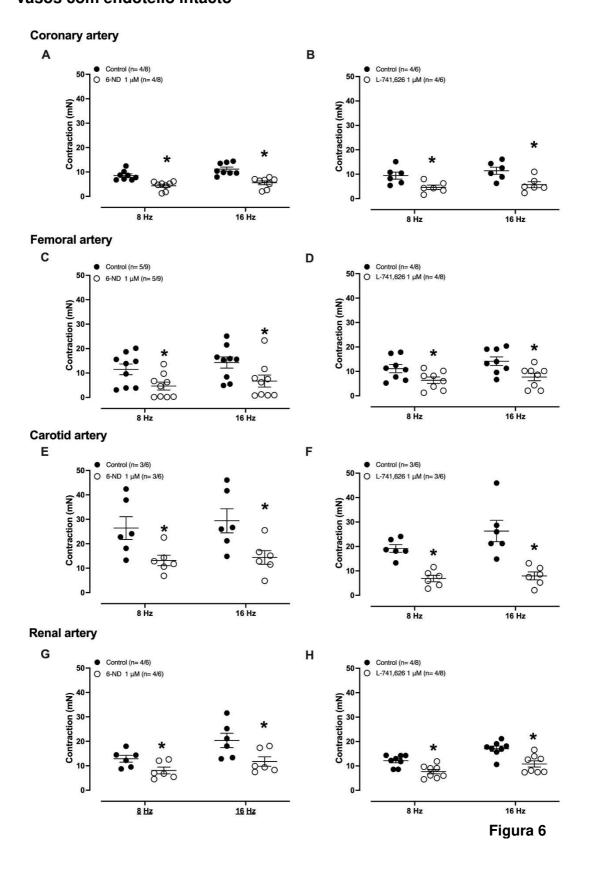
Tabela S5. Estimulação de campo elétrico induziu contração em artérias suínas isoladas na ausência e presença de endotélio (E) ou tetrodotoxina (TTx; 1 μ M) * P < 0,05 em comparação com os respectivos valores de controle

A remoção do endotélio causou reduções significativas nas contrações induzidas por EFS dos anéis da artéria coronária (Fig. 5A; Tabela S5). Em contraste, a pré-incubação com TTX (1 mM; 30 min) não afetou as contrações induzidas por EFS dos anéis da artéria coronária (Fig. 5B; Tabela S5). Resultados semelhantes foram observados nos anéis da artéria femoral

As contrações induzidas por EFS dos anéis da artéria carótida não foram afetadas pela remoção do endotélio (Fig. 5E; Tabela S5), mas foram significativamente reduzidas pelo pré-tratamento (30 min) com TTX (1 mM; Fig. 5F; Tabela S5). Resultados semelhantes foram observados nos anéis da artéria renal (Figs. 5G e 5H; Tabela S5).

(Figs. 5C e 5D; Tabela S5).

7.5 Efeito de 6-ND e L-741.626 nas contrações induzidas por EFS em vasos com endotélio intacto



Drug/Vessel	8 Hz [mN]	16 Hz [mN]	n
Coronary artery	8.55 ± 0.69	11.16 ± 0.86	4/8
Coronary artery 6 ND 1µM	4.36 ± 0.64 *	5.58 ± 0.76 *	4/8
Femoral artery	11.48 ± 2.20	14.28 ± 2.29	5/9
Femoral artery + 6 ND 1μM	4.64 ± 1.62*	6.71 ± 2.45*	5/9
Carotid artery	26.42 ± 4.64	29.39 ± 4.92	3/6
Carotid artery 6 ND 1µM	13.14 ± 2.14*	14.40 ± 2.77*	3/6
Renal artery	12.87 ± 1.40	20.35 ± 2.94	4/6
Renal artery + 6 ND 1µM	8.06 ± 1.39*	11.72 ± 1.92*	4/6
Coronary artery	9.41 ± 1.43	11.42 ± 1.48	4/6
Coronary artery + L741,626 1µM	4.63 ± 0.91*	5.74 ± 1.22*	4/6
Femoral artery	11.12 ± 1.66	14.16 ± 1.76	4/8
Femoral artery + L741,626 1µM	6.37 ± 1.32*	7.68 ± 1.53*	4/8
Carotid artery	19.17 ± 1.57	22.73 ± 4.38	3/6
Carotid artery + L741,626 1µM	6.88 ± 1.31*	7.93 ± 1.62*	3/6
Renal artery	12.12 ± 0.84	17.05 ± 1.08	4/8
Renal artery + L741,626 1µM	7.66 ± 0.91*	10.80 ± 1.27*	4/8

Tabela S6. Efeito de 6-nitrodopamina (6-ND) e L741.626 (um antagonista do receptor D2 da dopamina) na contração induzida por estimulação de campo elétrico em artérias suínas isoladas. * P < 0,05 em comparação com os respectivos valores de controle

Em vasos com endotélio intacto, a pré-incubação (30 min) de 6-ND (1 mM; Fig. 6A; Tabela S6) ou L-741.626 (1 mM; Fig. 6B; Tabela S6) reduziu acentuadamente as contrações induzidas por EFS do descendente esquerdo anéis de artéria coronária. Resultados semelhantes foram observados nos anéis da artéria femoral (Figs. 6C e 6D; Tabela S6), anéis da artéria carótida (Figs. 6E e 6F; Tabela S6) e nos anéis da artéria renal (Figs. 6G e 6H; Tabela S6).

7.6 Detecção imuno-histoquímica para calretinina em artérias suínas

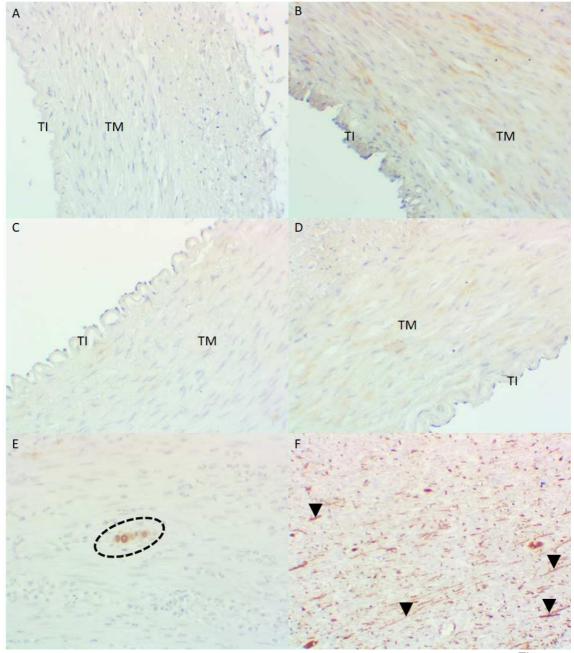


Figura 7

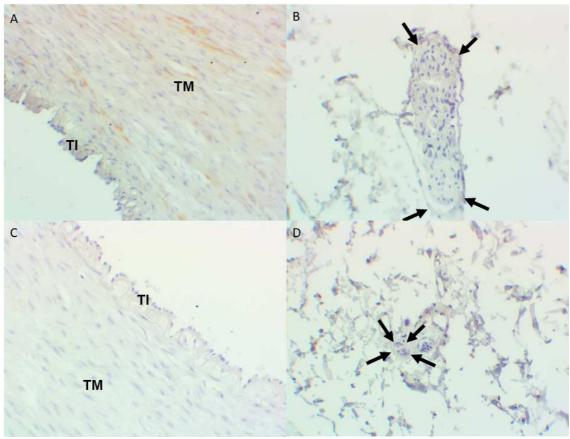


Figura 8

A calretinina (um marcador de células neurais) foi consistentemente negativa em todos os compartimentos histológicos (túnicas íntima, média e externa) de todas as artérias suínas testadas (Fig. 7A-D). Forte positividade para este marcador foi observada em ambos os controles positivos, ou seja, plexo mioentérico humano normal (Fig. 7E) e cérebro suíno (Fig. 7F). Na artéria renal suína, a imunorreatividade da calretinina estava ausente nas túnicas íntima, média (Fig. 8A) e externa (Fig. 8B), nervos morfologicamente identificáveis estavam presentes na túnica externa (Fig. 8B).

7.7 Detecção imuno-histoquímica para o anticorpo anti-tirosina hidroxilase em artérias coronária, carótida, femoral e renal.

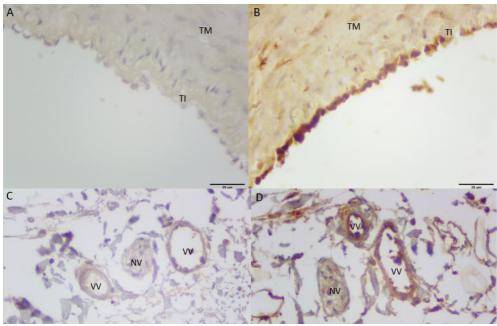


Figura 9: Artéria coronária: A. Controle negativo – túnica íntima (TI) e túnica média (TM); B. Controle positivo - túnica íntima e túnica média; C. Controle negativo - vaso e nervo; D. Controle positivo - vaso e nervo.

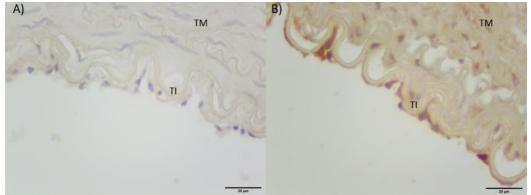


Figura 10: Artéria carótida: A. Controle negativo – túnica íntima (TI) e túnica média (TM) B. Controle positivo– túnica íntima e túnica média

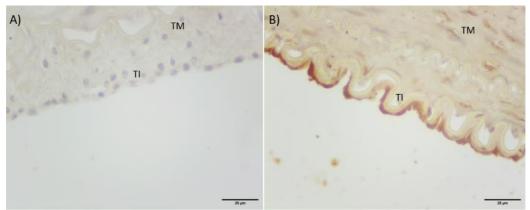


Figura 11: Artéria femoral: A. Controle negativo - túnica média (TM) e túnica intima (TI); B. controle positivo.

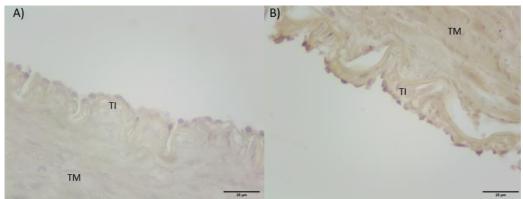


Figura 12: Artéria renal: A. Controle negativo - túnica média (TM) e túnica intima (TI); B. controle positivo.

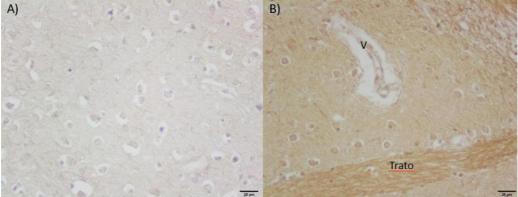


Figura 13: O marcador do anti-corpo anti-tirosina hidroxilase em gânglios da base humano. A. Controle negativo; B. controle positivo.

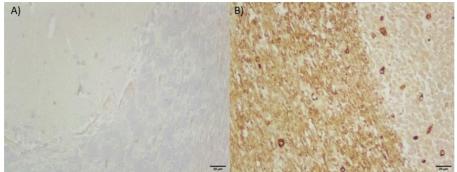


Figura 14: O marcador do anti-corpo anti-tirosina hidroxilase em cerebelo de suíno. A. Controle negativo; B. Controle positivo.

A tirosina hidroxilase, enzima responsável pela síntense das catecolaminas, foi fortemente evidenciada na túnica íntima, na qual há presença de células endoteliais de todas as artérias testadas, e negativo na túnica média (Fig 9B; Fig 10B; Fig 11B; Fig 12B). Na túnica adventícia houve positividade do anticorpo no endotélio dos capilares menores, vasa vasorum e nervi-vasorum (Fig 9D). Nos cortes histológicos dos gânglios da base observou-se imunorreatividade no endotélio vascular e mais intenso em feixes axonais (Fig.13B), e em cerebelo suíno apresentou positividade para o anticorpo tirosina-hidroxilase em endotélio de pequenas artérias e, principalmente, em região da substância branca.

8. DISCUSSÃO

Os resultados ampliam as observações anteriores de que a 6nitrodopamina é liberada dos tecidos vasculares e tem uma potente ação vasorrelaxante em vasos pré-contraídos, e com endotélio intacto.

A constatação de que apenas o inibidor de óxido nítrico L-NAME causou potencialização das contrações induzidas por EFS, enquanto o inibidor do sítio heme da guanilato ciclase solúvel, ODQ, (43) não o fez, suporta o novo conceito de que 6-ND é o principal mecanismo de ação do NO (35-36). Embora a estimulação da via guanilato ciclase solúvel tenha sido proposta como o mecanismo de vasodilatação induzida por NO (44), a descoberta de que a administração de ODQ a ratos não afetou a pressão arterial média ou a frequência cardíaca, embora a inibição *ex vivo* da guanilato ciclase solúvel tenha sido alcançada (45) gerou um paradoxo, agora facilmente resolvido com este novo conceito. Se a biossíntese de 6-ND é o resultado da nitrosação direta da dopamina após a síntese de NO ou uma via indireta após a oxidação do ânion nitrito (NO₂-) gerado pelo decaimento de NO para o radical dióxido de nitrogênio (NO₂-), como demonstrado com heme peroxidases de mamíferos (46) e mieloperoxidase (47), ainda precisam ser estabelecidas.

As contrações induzidas por EFS foram abolidas quando o endotélio das artérias coronárias e femorais foram removidos. A remoção mecânica do endotélio aboliu as contrações induzidas por EFS de anéis aórticos obtidos de *Chelonoidis carbonaria* (23), *Pantherophis guttatus* (48), *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* (49) e anéis de artérias e veias umbilicais humanas (24) e as contrações induzidas por EFS nesses tecidos foram insensíveis à tetrodotoxina. Essas observações indicam que o endotélio é um tecido excitável; de fato, a corrente de sódio dependente de voltagem (INa) foi identificada em células endoteliais cultivadas derivadas de artéria interlobar de rato e veia umbilical humana (50). Além disso, embora a tetrodotoxina reduza o INa de maneira dependente da concentração, a baixa sensibilidade indica que esses canais de sódio dependentes de voltagem pertencem ao tipo resistente a TTX (51). Esta baixa sensibilidade poderia explicar a falta de efeito da tetrodotoxina nas contrações induzidas por EFS dos anéis da artéria coronária e femoral suína. Em contraste com as artérias coronárias e femorais, as contrações induzidas por

EFS das artérias carótida e renal não foram afetadas pela remoção mecânica do endotélio, mas foram abolidas quando os tecidos foram pré-tratados com tetrodotoxina. Esses resultados indicam que, muito provavelmente, as contrações induzidas por EFS nessas artérias podem ser secundárias à estimulação nervosa. No entanto, a imuno-histoquímica da calretinina usada como marcador neuronal foi negativa para vasos suínos, mas positiva em cérebro suíno. A calretinina é um membro da família EF-hand de proteínas de ligação ao cálcio (52) e é encontrada em subpopulações neuronais específicas em roedores (53), cérebro de primatas (54) e terminais nervosos da hipófise (55). A imunorreatividade para a calretinina também estava presente nos terminais nervosos do sistema nervoso simpático de ratos (56). Uma vez que os terminais nervosos foram morfologicamente identificados em ambas as fatias da artéria carótida e renal, a conclusão é que a calretinina não pode ser considerada um marcador confiável para estruturas nervosas em suínos.

A caracterização dos terminais nervosos foi realizada por imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (57), uma enzima envolvida na síntese de dopamina, responsável pela conversão da tirosina em L-DOPA (L-di-hidroxifenilalanina) que é também expressa no endotélio vascular de artéria e veia do cordão umbilical humano (21,23). Células endoteliais cultivadas de artéria mesentérica e aorta de rato (58) e de aorta bovina (59) também expressam as enzimas envolvidas na síntese da catecolamina. Desta maneira, o endotélio desempenha um papel obrigatório na liberação de dopamina. Em ratos neonatos da linhagem Wistar foi demonstrado a origem não neuronal da dopamina, no qual a simpatectomia química com 6-hidroxidopamina causou uma redução significativa nos níveis de noradrenalina e adrenalina extraídos das aortas, enquanto os níveis de dopamina permaneceram inalterados (59).

A ação da dopamina na vasculatura é bastante heterogênea, dependendo da espécie, dos vasos e das doses. Por exemplo, nas artérias coronárias epicárdicas de humanos e macacos, a dopamina induz contrações, enquanto na artéria coronária canina induz vasorrelaxamento (60). Mesmo dentro da mesma espécie, o mecanismo tem sido considerado complexo, uma vez que a dopamina em um cão intacto pode produzir aumento ou diminuição da circulação coronária (61). Essa heterogeneidade tem sido associada com suas ações nos receptores α-adrenérgicos e dopaminérgicos, responsáveis pela

vasoconstrição e vasodilatação, respectivamente (62). De fato, nas artérias cerebrais caninas, a dopamina causa contração, mas quando pré-tratada com αbloqueador não seletivo fenoxibenzamina (63), causa relaxamento (64). Entretanto, a expressão dos receptores de dopamina na vasculatura é complexa; cinco genes que codificam receptores de dopamina foram caracterizados e esses receptores foram classificados em duas subfamílias: os subtipos de receptores tipo D₁ (D1R e D5R), cuja ativação estimula a adenilato ciclase, e a subfamília de receptores tipo D2 (D2R, D3R e D4R), ligado ao Gi, que inibe a adenil ciclase (65). Todos os cinco receptores de dopamina foram identificados em leitos vasculares in vitro, por ligação radioligante-receptor, técnicas autorradiográficas e imuno-histoquímica (66,67,68). O efeito vasorelaxante de 6-ND em vasos do cordão umbilical humano (33), anéis aórticos de Chelonoidis carbonaria (69), Pantherophis guttatus (35) e Callithrix spp (36) foi devido à inibição seletiva de D₂ e/ou dos receptores D_{2-like}. Os resultados aqui obtidos com artérias suínas apontam para o mesmo mecanismo, uma vez que o efeito vasorelaxante do 6-ND é muito semelhante ao causado pelo antagonista seletivo do receptor D₂ da dopamina, o L741,626 (42). Tanto nas artérias coronárias quanto nas femorais, o EFS deveria estar induzindo a liberação de dopamina do endotélio, enquanto nas artérias carótidas e renais, a liberação de dopamina aparentemente se origina nos terminais nervosos, uma vez que não é afetada pela remoção mecânica do endotélio e é bloqueado pela tetrodotoxina. É importante mencionar que, ao contrário do L741,626, o 6-ND não interage com os receptores adrenérgicos (33,37). De fato, as diferenças de potência (ki) para haloperidol (1,4 e 4,7 nM, para D₂ e α₁-adrenoceptor, respectivamente) e risperidona (2,2 e 1,4 nM, para D₂ e α₁-adrenoceptor, respectivamente) são discretas (70,71). O L-741.626 ki para os receptores α₁ e α₂-adrenérgicos no córtex frontal do rato foi de 6,6 e 5,9 nM, respectivamente, enquanto o L-741.626 ki para o receptor humano D₂ expresso em células de ovário chinesas (CHO) foi de 8,4 nM (72).

A potência do 6-ND em causar relaxamento nas artérias suínas está na seguinte ordem: carótida=coronária≥renal>>femoral. Na artéria coronária e carótida com endotélio intacto, o pEC₅₀ para 6-ND foi de aproximadamente 3 nM, sendo assim mais potente na artéria coronária do que a noradrenalina (100 nM) (73), bradicinina (10 nM) (74) e isoprenalina (7,9 nM) (75). Ao contrário da

bradicinina, que libera NO e prostaciclina via ativação dos receptores β_2 de bradicinina (76), o relaxamento induzido por 6-ND não é afetado pela préincubação dos vasos com L-NAME (33-35-37). A descoberta de que o 6-ND aparentemente é o vasodilatador endógeno mais potente das artérias coronárias, juntamente com a observação de que é o agente cronotrópico positivo endógeno mais potente (37) reforça seu potencial terapêutico no tratamento da insuficiência cardíaca aguda e crônica.

9. CONCLUSÃO

O estudo complementa observações anteriores de que a 6nitrodopamina é liberada dos tecidos vasculares e tem uma potente ação vasodilatadora em vasos pré-contraídos.

As contrações induzidas por EFS foram abolidas quando o endotélio das artérias coronárias e femorais foram removidos, enquanto que nas artérias carótidas e renais não foram afetadas pela remoção mecânica do endotélio e, foram abolidas quando os tecidos foram pré-tratados com tetrodotoxina, indicando que as contrações podem ser secundárias à estimulação nervosa.

No estudo imuno-histoquímico a calretinina usada como marcador neuronal foi negativa para vasos suínos, mas positiva em cérebro suíno, não sendo considerada um marcador confiável para estruturas nervosas em suínos. Porém a caracterização dos terminais nervosos para a enzima tirosina hidroxilase, foi positiva em todos os endotélios das artérias testadas, inclusive em endotélio de capilares menores da artéria coronariana.

Os vasos suínos apresentam liberação basal de 6-ND, e a vasodilatação induzida por 6-ND é devido ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos $D_2/D_{2\text{-like}}$.

Declaração de interesse concorrente

Os autores declaram não ter interesses concorrentes ou financeiros.

10. REFERÊNCIAS

- 1. Junqueira, L. C.; Carneiro, J. Histologia básica. In: (Ed.). Histologia básica, 1985. p.512-512).
- Galley HF, Webster NR. 2004 Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. Br J Anaesth. 2004 Jul;93(1):105-13. doi: 10.1093/bja/aeh163. Epub 2004 Apr 30. PMID: 15121728.
- 3. Vane, J R et al., 1990) Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. N Engl J Med. 1990 Jul 5;323(1):27-36. doi: 10.1056/NEJM199007053230106. PMID: 2113184.
- Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium: maestro of the blood circulation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1994;343(1304):225-246. doi:10.1098/rstb.1994.0023.
- 5. Snyder SH, Bredt DS. Biological role of nitric oxide. Science Am 1992, 266: 68-77.
- Flora Filho, R., & Zilberstein, B.. (2000). Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Revista Da Associação Médica Brasileira, 46(3), 265–271. https://doi.org/10.1590/S0104-42302000000300012.
- Tenopoulou M; Doulias PT. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism [version 1; peer review: 3 approved].
 F1000 Research 2020, 9(Faculty Rev):1190. https://doi.org/10.12688/f1000research.19998.
- 8. Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. Annu Rev Biochem.1971;40:465-500. doi: 10.1146/annurev.bi.40.070171.002341. PMID: 4399447.

- Smeets WJ, González A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. Brain Res Brain Res Rev. 2000 Sep;33(2-3):308-79. doi: 10.1016/s0165-0173(00)00034-5. PMID: 11011071.
- 10. Kågedal B, Goldstein DS. Catecholamines and their metabolites. J Chromatogr. 1988 Jul 29;429:177-233. doi: 10.1016/s0378-4347(00)83871-2. PMID: 3062018.
- 11. Rang, H.P; Dale, M.M. Farmacologia, Editora Elsevier, 7°edição, 2012.p.28,464.
- 12. Costa KM, Schoenbaum G. Dopamine. Curr Biol. 2022 Aug 8;32(15):R817-R824. doi: 10.1016/j.cub.2022.06.060. PMID: 35944478.
- 13. Hornykiewicz O. Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. Mov Disord. 2002 May;17(3):501-8. doi: 10.1002/mds.10115. PMID: 12112197.
- 14. Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. Physiol Genomics. 2004 Nov 17;19(3):233-46.
- 15. Neumann J, Hofmann B, Dhein S, Gergs U. Role of Dopamine in the Heart in Health and Disease. Int J Mol Sci. 2023 Mar 6;24(5):5042. doi: 10.3390/ijms24055042. PMID: 36902474; PMCID: PMC10003060.
- 16. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. Am J Physiol. 1948 Jun;153(3):586-600. doi: 10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586.
- 17. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol Rev. 2011 Mar;63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303898.

- 18. De Souza, B. R. A modulação da via cAMP/PKA pelo sensor neural de cálcio-1 independe de receptores de dopamina. 2007.
- 19. Kadowitz PJ, Knight DS, Hibbs RG, Ellison JP, Joiner PD, Brody MJ, Hyman AL. Influence of 5- and 6-hydroxydopamine on adrenergic transmission and nerve terminal morphology in the canine pulmonary vascular bed. Circ Res. 1976 Aug;39(2):191-9. doi:10.1161/01.res.39.2.191.
- 20. Matsuyama T, Shiosaka S, Wanaka A, Yoneda S, Kimura K, Hayakawa T, Emson PC, Tohyama M. Fine structure of peptidergic and catecholaminergic nerve fibers in the anterior cerebral artery and their interrelationship: an immunoelectron microscopic study. J Comp Neurol. 1985 May 8;235(2):268-76. doi: 10.1002/cne.902350209.
- 21.J. Britto-Júnior, D.H.A. Pinheiro, A.F.O. Justo, G.M. Figueiredo Murari, R. Campos, F. V Mariano, V.B. de Souza, A.A. Schenka, F.Z. Mónica, E. Antunes, G. De Nucci, Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels., Pharmacol. Res. Perspect. 8 (2020) e00612. https://doi.org/10.1002/prp2.612.
- 22. Britto-Júnior J, Fernandes Jacintho F, Campos R, Pinheiro DHA, Figueiredo Murari GM, de Souza VB, Schenka AA, Mónica FZ, Moreno RA, Antunes E, De Nucci G. The basal release of endothelium-derived catecholamines regulates the contractions of Chelonoidis carbonaria aorta caused by electrical-field stimulation. Biol Open. 2021 Jan 20;10(1):bio057042. doi: 10.1242/bio.057042. PMID: 33277238; PMCID: PMC7847266.
- 23. R. Campos, F. Fernandes, J. Britto-júnior, F.Z. Mónica, A. Fernando, O. Justo, A. Sampaio, R. Agnaldo, V. Barbosa, D. Souza, A. Almeida, E. Antunes, G. De Nucci, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Endothelium modulates electrical field stimulation-induced contractions of

- Chelonoidis carbonaria aortic rings, Comp. Biochem. Physiol. Part C. 233 (2020) 108763. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108763.
- 24. J. Britto-júnior, F. Fernandes, G. Machado, D.F. Murari, R. Campos, R. Agnaldo, E. Antunes, F.Z. Mónica, G. De Nucci, Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels, Life Sci. 243 (2020) 117257. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117257.
- 25. d'Ischia M, Costantini C. Nitric oxide-induced nitration of catecholamine neurotransmitters: a key to neuronal degeneration? Bioorg Med Chem. 1995 Jul;3(7):923-7. doi: 10.1016/0968-0896(95)00083-s. PMID: 7582969.
- 26. Palumbo, A et al., 2001 Palumbo A, Astarita G, d'Ischia M. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 6-nitrocatecholamines, putative reaction products of nitric oxide with catecholamines under oxidative stress conditions. Biochem J. 2001 May 15;356(Pt 1):105-10.
- 27. F. Shintani, T. Kinoshita, S. Kanba, T. Ishikawa, E. Suzuki, N. Sasakawa, R. Kato, M. Asai, T. Nakaki, Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain, J. Biol. Chem. 271 (1996) 13561–13565. https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13561.
- 28.M. Tsunoda, E. Uchino, K. Imai, K. Hayakawa, T. Funatsu, Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection., J. Chromatogr. A. 1164 (2007) 162–166. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.005.
- 29. A. Chiari, X.H. Li, Z. Xu, H.L. Pan, J.C. Eisenach, Formation of 6-nitronorepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and

- its role in spinal analgesia., Neuroscience. 101 (2000) 189–196. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00328-6.
- 30. Bevan JA. Some characteristics of the isolated sympathetic nervepulmonary artery preparation of the rabbit. J Pharmacol Exp Ther. 1962 Aug;137:213-8. PMID: 13868728.
- 31. Panterson, G. (1965). The response to transmural stimulation of isolated arterial strips and its modification by drugs. J. Pharm. Pharmacol. 17, 341-349. doi:10. 1111/j.2042-7158.1965.tb07680.x
- 32. Van Riper DA, Bevan JA. Electrical field stimulation-mediated relaxation of rabbit middle cerebral artery. Evidence of a cholinergic endothelium-dependent component. Circ Res. 1992 Jun;70(6):1104-12.
- 33. J. Britto-Júnior, W.C. Coelho-Silva, G.F. Murari, C.E. Serpellone Nash, F.Z. Mónica, E. Antunes, G. De Nucci, 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity., Life Sci. 276 (2021) 119425. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119425.
- 34. R. Campos, D.H.A. Pinheiro, J. Britto-Júnior, H.A. de Castro, G.D. Mendes, M.O. Moraes, M.E.A. Moraes, R.Á.B. Lopes-Martins, N.J. Antunes, G. De Nucci, Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from Chelonoidis carbonaria aortae in vitro., J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1173 (2021) 122668. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122668.
- 35. A.T. Lima, E.X. Dos Santos, J. Britto-Júnior, V.B. de Souza, A.A. Schenka, R. Campos, M.O. Moraes, M.E.A. Moraes, E. Antunes, G. De Nucci, Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of Pantherophis guttatus aortic rings., Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 262 (2022) 109471. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109471.

- 36. J. Britto-Júnior, A. Lima, J. Santos-Xavier, P. Gonzalez, F. Monica, R. Campos, V. Souza, A. Schenka, E. Antunes, G. De Nucci, Relaxation of marmoset (Callithrix spp.) thoracic aorta and pulmonary artery rings by endothelium-derived 6-nitrodopamine, Brazilian J. Med. Biol. Res. (2023).
- 37. J. Britto-Júnior, M.G. de Oliveira, C. Dos Reis Gati, R. Campos, M.O. Moraes, M.E.A. Moraes, F.Z. Mónica, E. Antunes, G. De Nucci, 6-NitroDopamine is an endogenous modulator of rat heart chronotropism., Life Sci. 307 (2022) 120879. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120879.
- 38. D.K.C. Cooper, B. Gollackner, D.H. Sachs, Will the pig solve the transplantation backlog?, Annu. Rev. Med. 53 (2002) 133–147. https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103900.
- 39. D.H. Sachs, The pig as a potential xenograft donor., Vet. Immunol. Immunopathol. 43 (1994) 185–191. https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)9035-x.

- 40. W. Wang, W. He, Y. Ruan, Q. Geng, First pig-to-human heart transplantation., Innov. (Cambridge. 3 (2022) 100223. https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100223.
- 41.N. Percie, V. Hurst, A. Ahluwalia, S. Alam, M.T. Avey, M. Baker, W.J. Browne, A. Clark, I.C. Cuthill, U. Dirnagl, M. Emerson, P. Garner, S.T. Holgate, D.W. Howells, N.A. Karp, S.E. Lazic, K. Lidster, C.J. Maccallum, M. Macleod, E.J. Pearl, O.H. Petersen, F. Rawle, P. Reynolds, K. Rooney, The ARRIVE guidelines 2 . 0 : Updated guidelines for reporting animal research, Br. J. Pharmacol. 177 (2020) 3617–3624. https://doi.org/10.1111/bph.15193.
- 42. B.J. Bowery, Z. Razzaque, F. Emms, S. Patel, S. Freedman, L. Bristow, J. Kulagowski, G.R. Seabrook, Antagonism of the effects of (+)-PD 128907 on midbrain dopamine neurones in rat brain slices by a selective D2 receptor antagonist L-741,626, Br. J. Pharmacol. 119 (1996) 1491–1497. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb16063.x.
- 43.J. Garthwaite, E. Southam, C.L. BOULTON, E.B. Nielsen, K. Schimidt, Bernd Mayer, Potent and Selective Inhibition of Nitric Oxide -Sensitive Guanylyl Cyclase by 1H- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one, Mol. Pharmacol. 48 (1995) 184–188.
- 44.W.P. Arnold, C.K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 (1977) 3203–3207. https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3203
- 45. S. Cechova, T.N. Pajewski, The soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, dose-dependently reduces the threshold for isoflurane anesthesia in rats., Anesth. Analg. 99 (2004) 752–757. https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000132695.77191.F3.

- 46. J. Arnhold, E. Monzani, P.G. Furtmüller, M. Zederbauer, L. Casella, C. Obinger, Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian heme peroxidases, Eur. J. Inorg. Chem. (2006) 3801–3811. https://doi.org/10.1002/ejic.200600436.
- 47. U. Burner, P.G. Furtmüller, A.J. Kettle, W.H. Koppenol, C. Obinger, Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite, J. Biol. Chem. 275 (2000) 20597–20601. https://doi.org/10.1074/jbc.M000181200.
- 48. R. Campos, F.Z. Mónica, A.F.O. Justo, J.C. Cogo, E. de T. Oliveira, R.A. Moreno, E. Antunes, G. De Nucci, Electrical field stimulation-induced contractions on Pantherophis guttatus corpora cavernosa and aortae., PLoS One. 13 (2018) e0196123. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196123.
- 49.R. Campos, A.F.O. Justo, F.Z. Monica, J.C. Cogo, R.A. Moreno, V.B. de Souza, A.A. Schenka, G. De Nucci, Electrical field-induced contractions on Crotalus durissus terrificus and Bothrops jararaca aortae are caused by endothelium-derived catecholamine., PLoS One. 13 (2018) e0203573. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.
- D. V Gordienko, H. Tsukahara, Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na+ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar arter and human umbilical vein., Pflugers Arch. 428 (1994) 91–93. https://doi.org/10.1007/BF00374756.
- 51.M. Gosling, S.L. Harley, R.J. Turner, N. Carey, J.T. Powell, Human Saphenous Vein Endothelial Cells Express a Tetrodotoxin-resistant, Voltage-gated Sodium Current *, J. Biol. Chem. 273 (1998) 21084–21090. https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21084.

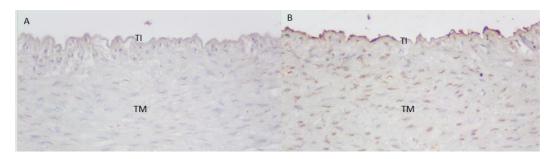
- 52. M. Fortin, A. Parent, Calretinin as a marker of specific neuronal subsets in primate substantia nigra and subthalamic nucleus., Brain Res. 708 (1996) 201–204. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01374-1.
- 53.[38] R. Arai, L. Winsky, M. Arai, D.M. Jacobowitz, Immunohistochemical localization of calretinin in the rat hindbrain., J. Comp. Neurol. 310 (1991) 21–44. https://doi.org/10.1002/cne.903100105.
- 54.P. V Belichenko, D.M. Vogt Weisenhorn, J. Myklóssy, M.R. Celio, Calretinin-positive Cajal-Retzius cells persist in the adult human neocortex., Neuroreport. 6 (1995) 1869–1874. https://doi.org/10.1097/00001756-199510020-00012.
- 55. S.M. Mcmahon, C. Chang, M.B. Jackson, Multiple cytosolic calcium buffers in posterior pituitary nerve terminals, J. Gen. Physiol. (2016) 243–254. https://doi.org/10.1085/jgp.201511525.
- 56. C.R. Anderson, Identification of cardiovascular pathways in the sympathetic nervous system., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25 (1998) 449–452. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.tb02232.x.
- 57. A. Tellez, S. Rousselle, T. Palmieri, W.R. 4th Rate, J. Wicks, A. Degrange, C.M. Hyon, C.A. Gongora, R. Hart, W. Grundy, G.L. Kaluza, J.F. Granada, Renal artery nerve distribution and density in the porcine model: biologic implications for the development of radiofrequency ablation therapies., Transl. Res. 162 (2013) 381–389. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.07.002.
- 58. U. Pfeil, J. Kuncova, D. Brüggmann, et al. Intrinsic vascular dopamine a key modulator of hypoxia-induced vasodilatation in splanchnic vessels. J Physiol. 2014; 592:1745-1756.

- 59. D. Sorriento, G. Santulli, C. Del Giudice, et al. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. Hypertens. 2012; 60:129-136.
- 60. N. Toda, M. Enokibori, T. Matsumoto, T. Okamura, Responsiveness to dopamine of isolated epicardial coronary arteries from humans, monkeys, and dogs., Anesth. Analg. 77 (1993) 526–532. https://doi.org/10.1213/00000539-199309000-00017.
- 61.N. Toda, L.I. Goldberg, Effects of dopamine on isolated canine coronary arteries., Cardiovasc. Res. 9 (1975) 384–389. https://doi.org/10.1093/cvr/9.3.384.
- 62. L.I. Goldberg, Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications., Pharmacol. Rev. 24 (1972) 1–29.
- 63. F.J. Kleeman, Phenoxybenzamine., J. Urol. 117 (1977) 814. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)58643-7.
- 64.N. Toda, Influence of Dopamine and Noradrenaline on isolated cerebral arteries of the dog, Br. J. Pharmacol. 58 (1976) 121–126.
- 65. C. Missale, S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, M.G. Caron, Dopamine receptors: from structure to function., Physiol. Rev. 78 (1998) 189–225. https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189.
- 66. F. Amenta, W.L. Collier, A. Ricci, Autoradiographic localization of vascular dopamine receptors., Am. J. Hypertens. 3 (1990) 34S-36S. https://doi.org/10.1093/ajh/3.6.34s.

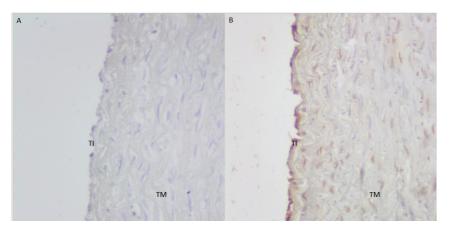
- 67.F. Amenta, Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes., Clin. Exp. Hypertens. 19 (1997) 27–41. https://doi.org/10.3109/10641969709080802.
- 68. F. Amenta, P. Barili, E. Bronzetti, L. Felici, F. Mignini, A. Ricci, Localization of dopamine receptor subtypes in systemic arteries., Clin. Exp. Hypertens. 22 (2000) 277–288. https://doi.org/10.1081/ceh-100100077.
- 69. J. Britto-Júnior, R. Campos, M. Peixoto, A.T. Lima, F.F. Jacintho, F.Z. Mónica, R.A. Moreno, E. Antunes, G. De Nucci, 6-Nitrodopamine is an endogenous selective dopamine receptor antagonist in Chelonoidis carbonaria aorta., Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 260 (2022) 109403. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109403.
- 70. G. Campiani, S. Butini, S. Gemma, V. Nacci, C. Fattorusso, B. Catalanotti, G. Giorgi, A. Cagnotto, M. Goegan, T. Mennini, P. Minetti, M.A. Di Cesare, D. Mastroianni, N. Scafetta, B. Galletti, M.A. Stasi, M. Castorina, L. Pacifici, O. Ghirardi, O. Tinti, P. Carminati, Pyrrolo[1,3]benzothiazepine-based atypical antipsychotic agents. Synthesis, structure-activity relationship, molecular modeling, and biological studies., J. Med. Chem. 45 (2002) 344–359. https://doi.org/10.1021/jm010982y.
- 71. A.W. Schmidt, L.A. Lebel, H.R.J. Howard, S.H. Zorn, Ziprasidone: a novel antipsychotic agent with a unique human receptor binding profile., Eur. J. Pharmacol. 425 (2001) 197–201. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01188-8.
- 72. M.J. Millan, A. Gobert, A. Newman-Tancredi, F. Lejeune, D. Cussac, J.M. Rivet, V. Audinot, T. Dubuffet, G. Lavielle, S33084, a novel, potent, selective, and competitive antagonist at dopamine D(3)-receptors: I. Receptorial, electrophysiological and neurochemical profile compared

- with GR218,231 and L741,626., J. Pharmacol. Exp. Ther. 293 (2000) 1048–1062.
- 73. S. Yamada, T. Kashiwabara, T. Yamazawa, Y. Harada, K. Nakayama, Demonstration of β1-adrenoceptor mediating relaxation of porcine coronary artery by radioligand binding and pharmacological methods, Life Sci. 43 (1988) 1999–2006. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90573-5.
- 74. N.L. Weintraub, S.N. Joshi, C.A. Branch, A.H. Stephenson, R.S. Sprague, A.J. Lonigro, Relaxation of porcine coronary artery to bradykinin. Role of arachidonic acid., Hypertens. (Dallas, Tex. 1979). 23 (1994) 976–981. https://doi.org/10.1161/01.hyp.23.6.976.
- 75.C.O. Uhiara, S.P.H. Alexander, R.E. Roberts, Effect of inhibition of extracellular signal-regulated kinase on relaxations to b -adrenoceptor agonists in porcine isolated blood vessels, Br. J. Pharmacol. 158 (2009) 1713–1719. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00435.x.
- 76. P.D. Orleans-juste, G. De Nucci, J.R. Vane, Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells, (1989) 920–926.

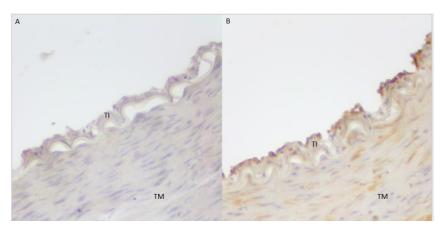
11. APÊNDICE – FOTOMICROGRAFIAS DA DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA O ANTICORPO ANTI-TIROSINA HIDROXILASE



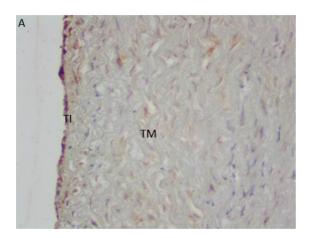
Artéria coronária de suíno. A) controle negativo; B) Imunoexpressão de tirosina hidroxilase no endotélio.



Artéria carótida de suíno. A) controle negativo; B) Imunoexpressão de tirosina hidroxilase no endotélio.



Artéria femoral de suíno. A) controle negativo; B) Imunoexpressão de tirosina hidroxilase no endotélio.



Artéria renal de suíno. A) Imunoexpressão de tirosina hidroxilase no endotélio.