



PAULO GABRIEL GONZALEZ

**Caracterização farmacológica de artéria
pulmonar isolada de *Callithrix jacchus*:
Importância do sistema nervoso
parassimpático?**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

PAULO GABRIEL GONZALEZ

**Caracterização farmacológica de artéria pulmonar
isolada de *Callithrix jacchus*: Importância do
sistema nervoso parassimpático?**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Fabiola Taufic Monica

Iglesias

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR PAULO GABRIEL GONZALEZ E ORIENTADA PELA PROF. DRA FABIOLA
TAUFIC MONICA IGLESIAS.

ASSINATURA DA ORIENTADORA

**CAMPINAS
2014**

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

G589c Gonzalez, Paulo Gabriel, 1981-
Caracterização farmacológica de artéria pulmonar de *Callithrix jacchus* : importância do sistema nervoso parassimpático? / Paulo Gabriel Gonzalez. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Fabíola Taufic Monica Iglesias.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Artéria pulmonar. 2. *Callithrix*. 3. Fibras colinérgicas. I. Iglesias, Fabíola Taufic Monica. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pharmacological characterization of pulmonary artery *Callithrix jacchus* : importance of the parasympathetic nervous system?

Palavras-chave em inglês:

Pulmonary artery

Callithrix

Cholinergic fibers

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Fabíola Taufic Monica Iglesias [Orientador]

Stephen Hyslop

Ana Paula Couto Danvel

Data de defesa: 14-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

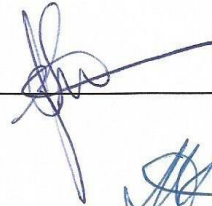
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

PAULO GABRIEL GONZALEZ

Orientador (a) PROF(A). DR(A). FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS



2. PROF(A). DR(A). STEPHEN HYSLOP



3. PROF(A). DR(A). ANA PAULA COUTO DAVEL



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

Data: 14 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, meus pais Liliana Franchi de Gonzalez e Pedro Patricio G. Gonzalez Zamora, (in memoriam), pela confiança, amor e sacrifício que tiveram por mim e meus irmãos, para termos a melhor educação e por sempre me apoiarem na realização de meus ideais.

Aos meus outros pais, meus sogros, Eduardo Sesso e Agda Sesso, pela ajuda incondicional, carinho motivação e incentivo dado em todo esse período.

Ao meu amor, minha esposa, Andrea Sesso, a quem sou muito grato pelo amor, carinho, companheirismo e muita paciência; essa vitória é tão minha quanto sua.

AGRADECIMENTOS

À minha grande amiga e orientadora, **Profa. Dra. Fabíola Monica**, sou muito grato pela sua disponibilidade e conselhos, os quais foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e foi quem com muita paciência ensinou-me a fazer ciência. Do mesmo modo sou muito grato pelas contribuições para minha formação profissional e pessoal, você é muito mais que uma orientadora e sim uma competente educadora.

A meu grande amigo, querido irmão, **Dr. Julio Alejandro Rojas Moscoso**, pelo ótimo ser humano, a quem devo minha admiração e respeito, sou grato, por toda sua dedicação, pelos conselhos, ensinamentos das técnicas, correções, pelo extremo profissionalismo e pelo ombro amigo em todos os momentos, sua dedicação à minha pessoa jamais será esquecida.

Ao

Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela amizade, oportunidade, incentivo, confiança e credibilidade sempre demonstrados em relação a minha pessoa, obrigado pelo apoio as etapas deste trabalho.

Ao

Prof. Dr. Edson Antunes, sou grato pela sua simpatia e ajuda, competência e excelência na formação do pós-graduando e a sua dedicação à pesquisa.

Agradeço também...

Ao Mestre Wagner Faria, meu grande amigo, companheiro que durante todo o período de meu mestrado, esteve comigo, apoiando-me, auxiliando-me, dividindo os momentos bons e difíceis, sempre com disposição e lealdade. Amigo carioca que terei para sempre.

Aos meus amigos da Cascata: Marcy Lancia Pereira, Renata Lopes Rodrigues, Lorenzo Pissinatti, Luiz Osório, Celso Saragossa, Samuel Barillas, Fabiano Calmasini, Fernanda Priviero Bruschi, Fabio Henrique da Silva, Eduardo Costa Alexandre, Fernando Ricardo Bau, Maria Andreia Delbin, Fernanda Del Grossi, Mario Ángel Claudino, Rafael Campos, Camila Estancial, Tuany Candido, Renan Donomae Iwamoto, Rodrigo Capel, agradeço a amizade, cuidados, conselhos e alegrias compartilhadas ao longo deste período.

Aos meus amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elen Cristina Landucci, Glaucia Mello, Lineu Baldissera Jr., Priscila Fukumura Monteiro, Rafael Prada, Camila Bitencourt Silvério, Dalize Squebola, Nadia Cardelli, Marina Calixto, Leticia Lintomen, Evandro Alexandre, Maria Eliza Lopes Pires, Lourdes Dias, Marco Antonio de Oliveira e Marcovan Porto.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elaine, Rosicler, Maisa, Sr. Miguel, Wanderlei, Agnaldo, Adílson, Toninho, Denize e Gildo pela agradável convivência e pelos serviços prestados.

A todo corpo docente do Departamento de farmacologia pelos ensinamentos transmitidos e pelo esforço em manter este curso de Pós graduação em alto nível.

A Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp sou grato pelo crescimento e amadurecimento profissional nestes últimos anos.

A todos os amigos que compartilharam comigo importantes momentos de resiliência, e hoje podemos celebrar mais essa vitória. Muito obrigado.

Certamente esqueci-me de citar alguns amigos, mas não por isso possuem a menos importância neste trabalho.

Ao Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE) e Parque Ecológico do Tietê (PET), pelo fornecimento dos animais.

Ao CNPq pela bolsa de estudos durante todo o período de pós-graduação e pela FAPESP (Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo).

E finalmente um agradecimento especial aos animais, por nos doarem a vida, sempre terão meu respeito e compaixão.

“Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar...”

Chico Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS	xvi
LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS	xviii
LISTA DE FIGURAS	xxi
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Sistema nervoso colinérgico.....	28
1.2 Controle do tnus vascular.....	30
1.3 Sistema nervoso colinérgico no controle do tnus vascular.....	31
JUSTIFICATIVA	33
2. OBJETIVO	35
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivo específico	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Animais.....	38
3.2 Preparaco dos anéis de artéria pulmonar.....	38
3.3 Protocolos experimentais	39
3.3.1 Protocolos em artéria pulmonar39
3.4 Microscopia de luz	40
3.5 Microscopia de fluorescência.....	40

3.6	Parâmetros Farmacológicos.....	41
3.7	Análise Estatística.....	42
4.	RESULTADOS	43
4.1	Relaxamento induzido pelo adenosina difosfato em artéria pulmonar de <i>callithrix jacchus</i>	44
4.2	Contração induzida pela acetilcolina ou fenilefrina em artéria pulmonar de <i>callithrix jacchus</i>	44
4.3	Avaliação da contração induzida pela ACh na presença e ausência dos antagonistas dos receptores muscarínicos, nicotínicos, alfa-adrenérgico e do bloqueador dos canais de sódio dependentes de voltagem em artéria pulmonar de <i>callithrix jacchus</i>	46
4.4	Contração induzida pela estimulação elétrica <i>callithrix jacchus</i>	48
4.5	Expressão da colina acetiltransferase (ChAT) em artéria pulmonar de <i>Callithix jacchus</i>	50
5.	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9.	APÊNDICE	67

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA**PROCEDÊNCIA**

4-DAMP	Sigma St. Louis, MO, EUA
Acetilcolina	Sigma St. Louis, MO, EUA
ADP	Sigma St. Louis, MO, EUA
AMP	Sigma St. Louis, MO, EUA
ATP	Sigma St. Louis, MO, EUA
BAY 41-2272	Bayer, Leverkusen, Alemanha
Bradicinina	Sigma St. Louis, MO, EUA
DMSO	Sigma St. Louis, MO, EUA
Fenilefrina	Sigma St. Louis, MO, EUA
Fentolamina	Sigma St. Louis, MO, EUA
Fisostigmina	Sigma St. Louis, MO, EUA
Hexametônio	Sigma St. Louis, MO, EUA
Indometacina	Sigma St. Louis, MO, EUA
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
L-NAME	Sigma St. Louis, MO, EUA
Metocramina	Sigma St. Louis, MO, EUA
ODQ	Sigma St. Louis, MO, EUA
Pirenzepina	Sigma St. Louis, MO, EUA
Tadalafil	Sigma St. Louis, MO, EUA
Tetrodotoxina	Sigma St. Louis, MO, EUA

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

α 7 nAChR: receptores nicotínicos do subtipo α -7

4-DAMP: iodeto de 1,1-Dimetil-4-diphenylacetoxypiperidinium

ACh: acetilcolina

ANOVA: análise de variância

ADP: adenosina 5'-difosfato

AMP: adenosina 5'-monofosfato

ATP: adenosina 5'-trifosfato

BAY41-2272: 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-i]-
pirimidin-4-lamina.

BK: bradicinina

ChAT: colina acetiltransferase

CO: monóxido de carbono

DMSO: dimetilsulfóxido

e.p.m: erro padrão da média

E_{max}: resposta máxima

eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial

GCs: guanilato ciclase solúvel

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GTP: guanosina trifosfato

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster

mN: milinewton

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

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

PDE: fosfodiesterase

PE: fenilefrina

PGI₂: prostaciclina

pEC₅₀: concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo

TXA₂: tromboxano A₂

VAcHT: proteína transportadora de acetilcolina vesicular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Síntese e degradação da acetilcolina e receptores ativados pela acetilcolina liberada de estruturas neurais.....	29
Figura 2.	Principais mediadores oriundos do endotélio.....	31
Figura 3.	Distribuição da inervação simpática (Sy), parassimpática (P) e sensorial (Se) na circulação pulmonar.....	32
Figura 4.	Efeito do ADP, ACh e PE na ausência e na presença de inibidores da NOS e da ciclooxygenase e após remoção da camada endotelial.....	45
Figura 5.	Contração induzida pela ACh na ausência e na presença dos antagonistas muscarínicos, tetrodotoxina, fentolamina e hexametônio.....	47
Figura 6.	Contração induzida pela estimulação elétrica na ausência e na presença dos antagonistas muscarínicos, fentolamina, fisostgmina e após remoção da camada endotelial.....	49
Figura 7.	Imunorreatividade da colina acetiltransferase em artéria pulmonar.....	50

RESUMO

É bem estabelecido que a acetilcolina (ACh) produz relaxamento da musculatura lisa vascular através da liberação endotelial do óxido nítrico (NO) e, portanto, é uma das ferramentas farmacológicas mais utilizadas para avaliar a integridade do endotélio. Experimentos preliminares feito pelo nosso grupo mostraram que a ACh não relaxou a aorta e nem artéria pulmonar de sagui (*Callithrix jacchus*), além de induzir contração neste último leito em vaso com endotélio íntegro. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar de maneira mais detalhada a resposta colinérgica em artéria pulmonar de sagui. Em artéria pulmonar, O ADP (0.01-100 μM) produziu relaxamento dependente da concentração, que foi reduzido a aproximadamente 42% na presença do L-NAME (100 μM) ou da indometacina (inibidor não seletivo da cicloxigenase, 10 μM). A ACh (0.00001-1 mM) induziu contração dependente da concentração com valores de potência ($p\text{EC}_{50}$) e resposta máxima (E_{max}) de 5.83 ± 0.08 and $90 \pm 5\%$, respectivamente. A E_{max} da ACh aumentou aproximadamente 28% e 22% na presença de L-NAME e após a remoção do endotélio, respectivamente. Os antagonistas muscarínicos mais seletivos para os subtipos M2 e M3, metoctramina e 4-DAMP, e a indometacina reduziram significativamente a contração induzida pela ACh. A estimulação elétrica (4-16 Hz, 80 V, 10 segundos de estimulação) induziu contração dependente da frequência que foi significativamente reduzida na presença de 4-DAMP (0.1 μM), metoctramina (0.1 μM) e fentolamina (10 μM) e aumentada pela fisostigmina (10 μM). Na presença de hexametônio (1 μM), fentolamina (10 μM) ou tetrodotoxina (1 μM) a contração mediada pela ACh não foi alterada. A análise de imunofluorescência revelou a presença da colina acetiltransferase (ChAt) na tunica media. Estes dados mostram a presença de uma inervação colinérgica excitatória em artéria pulmonar de *Callithrix jacchus*.

Palavras chave: Artéria pulmonar, *Callithrix jacchus*, inervação colinérgica.

ABSTRACT

It is well established that acetylcholine (ACh) produces relaxation of vascular smooth muscle by endothelial release of nitric oxide (NO) and thus is one of the most widely used pharmacological tools to assess the integrity of the endothelium. Preliminary experiments done by our group showed that ACh did not relax the aorta and pulmonary artery of marmoset (*Callithrix jacchus*), and induces contraction in the latter bed in vessel with intact endothelium. Thus, the present study aimed to characterize in more detail the cholinergic response in pulmonary artery marmoset. In pulmonary artery ADP (0.01-100 μ M) produced concentration-dependent relaxation which was reduced to approximately 42% in the presence of L-NAME (100 μ M) and indomethacin (nonselective cyclooxygenase inhibitor, 10 μ M). ACh (0.00001-1 mM) produced concentration-dependent contractions with potency values (pEC₅₀) and maximum response (E_{max}) of 5.83 ± 0.08 and $90 \pm 5\%$, respectively. The E_{max} of ACh increased by approximately 28% and 22% in the presence of L-NAME and after removal of the endothelium, respectively. The muscarinic antagonists more selective for subtypes M₂ and M₃, methoctramine and 4-DAMP, and indomethacin significantly reduced ACh-induced contraction. Electrical field stimulation (EFS 4-16 Hz, 80 V, 10 seconds of stimulation) induced frequency-dependent contraction, which was significantly reduced in the presence of 4-DAMP (0.1 μ M), methoctramine (0.1 μ M) and phentolamine (10 μ M) and augmented by physostigmine (10 μ M). In the presence of hexamethonium (1 μ M), phentolamine (10 μ M) or tetrodotoxin (1 μ M) contraction mediated by ACh was not altered. The immunofluorescence analysis revealed the expression of choline acetyltransferase (Chat) in Tunica Media. These data show the presence of an excitatory cholinergic innervation in the pulmonary artery *Callithrix jacchus*.

Keywords: Pulmonary artery, *Callithrix jacchus*, cholinergic innervation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema nervoso colinérgico

Os neurônios colinérgicos presentes no sistema nervoso central (SNC) e periférico liberam, principalmente, a acetilcolina (ACh), porém outros neurotransmissores, como glutamato (1), adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (2), são co-liberados. A síntese de ACh é iniciada pela captação do aminoácido colina através do transportador de colina de alta afinidade (CHT1, sigla em inglês). No citoplasma dos neurônios colinérgicos a biossíntese de ACh ocorre pela acetilação da colina com a acetil coenzima A (acetil-CoA) em uma reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT). A presença da ChAT é considerada um dos marcadores mais específicos para identificação de neurônios colinérgicos centrais e periféricos (3, 4).

A ACh sintetizada é armazenada nas vesículas pela ação das proteínas vesiculares de transporte da ACh (VAChT, sigla em inglês) para formar um quantum periférico (3, 4). A degradação da ACh se dá, principalmente, pela ação das colinesterases denominadas de butirilcolinesterase (BChE) ou acetilcolinesterase (AChE) (Figura 1).

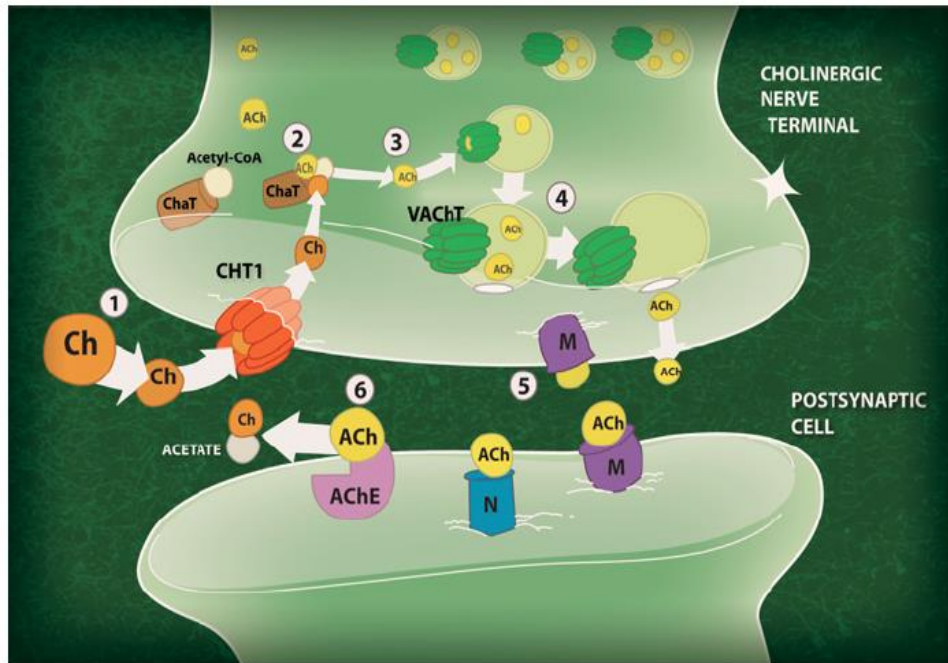


Figura 1. Esquema mostrando as proteínas envolvidas no processo de síntese a acetilcolina (ACh) em um terminal nervoso. Ch, colina; CHT1, transportador de alta afinidade da colina; ChAT, colina acetiltransferase; VACHT, proteína vesicular de transporte da ACh; M, receptor muscarínico; N, receptor nicotínico; AChE, acetilcolinesterase, (1) A absorção do precursor de Ch por CHT1. (2) A ACh sendo sintetizada pela enzima ChAT no citoplasma, (3) ACh sendo carregada pela VACHT, (4) liberação da ACh pela vesícula, difundindo-se pela membrana plasmática, podendo atingir na membrana pós sináptica no (5) receptor (N) e (M), (6) A ACh pode ser rapidamente degradada pela AChE, em acetato de colina (5).

Diversos estudos utilizando técnicas de imunohistoquímica, expressão gênica e atividade enzimática para ChAT, VChAT ou quantificação de ACh por HPLC mostraram que a ACh também pode ser sintetizada em estruturas não neurais, como no epitélio dos tratos respiratório (6, 7, 8), gastrointestinal (9) e urogenital (10), endotélio vascular (11), nos leucócitos, células dendríticas derivadas da medula e mastócitos (12, 13, 14, 15), mudando o paradigma de que a ACh atuaria somente como neurotransmissor. Em relação ao papel da ACh não-neural no sistema cardiovascular existem evidências que a mesma pode controlar a angiogênese através da ativação dos receptores nicotínicos do subtipo α -7 (α 7

nAChR). A adição de colina, agonista $\alpha 7$ nAChR, aumentou a expressão gênica e proteica do $\alpha 7$ nAChR e induziu proliferação e formação de tubos das células endoteliais. Em modelo de infarto em ratos, a colina aumentou a densidade dos capilares nos tecidos isquemiados e este efeito foi antagonizado na presença de mecamilamida e α -bungarotoxina (16). Em artéria pulmonar de humano, porco e rato foi visto a expressão da ChAT e VChAT principalmente na camada endotelial (17), porém nenhum estudo funcional foi realizado para avaliar se a ACh oriunda desta camada teria papel relevante no controle do tônus vascular.

1.2 Controle do tônus vascular

O tônus vascular é o resultado do equilíbrio entre a liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, as quais são oriundas de estruturas neurais, endoteliais e do metabolismo. Os principais agentes que levam à contração da musculatura lisa vascular são as catecolaminas, tromboxano A_2 (TXA_2), histamina, serotonina, endotelina-1, angiotensina II, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) e acetilcolina (ACh). Os agentes relaxantes incluem a bradicinina (BK), substância P, ACh, óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), prostaciclina (PGI_2), ATP, ADP, histamina (18, 19) e sulfeto de hidrogênio (H_2S) (20). O fato de um mesmo agente induzir contração e relaxamento dependerá do leito vascular, da espécie animal e do subtipo de receptor estimulado. Fisiologicamente o NO leva a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, da adesão/infiltração de leucócitos e da proliferação da musculatura lisa vascular (21). Agentes como ADP, ATP, ACh, histamina e força de cisalhamento são fatores que podem levar à liberação de NO (Figura 2).

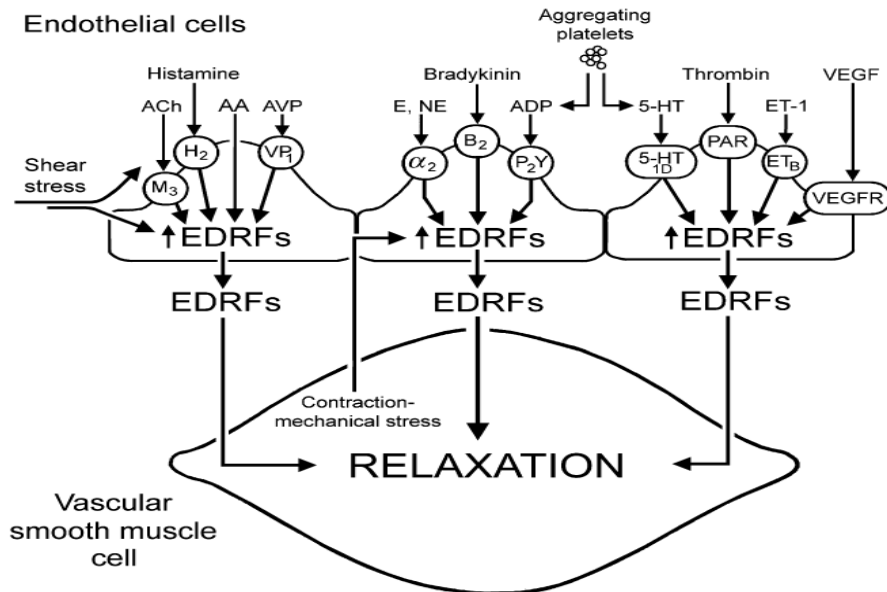


Figura 2. Principais mediadores que levam ao relaxamento da musculatura lisa vascular através da liberação de óxido nítrico (NO). ACh, acetilcolina; AA, ácido araquidônico; AVP, vasopressina; E, adrenalina; NE, noradrenalina; ADP, adenosina difosfato; 5-HT, serotonina; ET-1, endotelina; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; EDRF, fator relaxante derivado do endotélio. Vanhoutte (18).

1.3 Sistema nervoso colinérgico no controle do tônus vascular

Em relação ao papel do sistema nervoso colinérgico (SC) é sabido que o mesmo não tem uma participação importante no controle da resistência vascular periférica. Entretanto, na circulação cerebral (22) e peniana (23), de humanos a inervação colinérgica tem papel fisiológico importante e a resposta frente à ACh, se vasoconstrição ou vasodilatação dependerá, principalmente, do calibre do vaso e/ou da espécie animal.

A vasodilatação induzida pela ACh se dá pela estimulação dos receptores muscarínicos presentes no endotélio, levando à liberação de NO, como, por exemplo, na artéria cerebral de felino (24), circulação pulmonar de rato (25), artéria coronária bovino e equino (26, 27), dentre outros. Em determinados leitões,

como artéria coronária de cobaia (28) e nas artérias mesentéricas (29) e hepáticas de rato (30) e artérias subcutâneas torácicas, o relaxamento induzido pela ACh é sensível a inibição da sintase de óxido nítrico (NOS) e da ciclooxygenase (COX), mostrando a presença do fator relaxante derivado do endotélio (EDHF, sigla em inglês). Por outro lado, em artéria coronária isolada de boi a estimulação elétrica induziu contração dependente da frequência, na qual foi reduzida e aumentada, respectivamente, na presença de atropina e fisostigmina (31), sugerindo que a inervação parassimpática no respectivo leito, encontra-se fisiologicamente ativa.

Em relação à circulação pulmonar, a distribuição de nervos varia entre as espécies. Assim, em cobaia, porco, coelho, ovelha, gato, cachorro e humano (Figura 3A) há uma extensa inervação de nervos simpáticos, parassimpáticos e sensoriais nas artérias com calibre de 50-100 μm (32, 33, 34, 35) em contraste ao rato e camundongo (Figura 3B) (32, 33, 35).

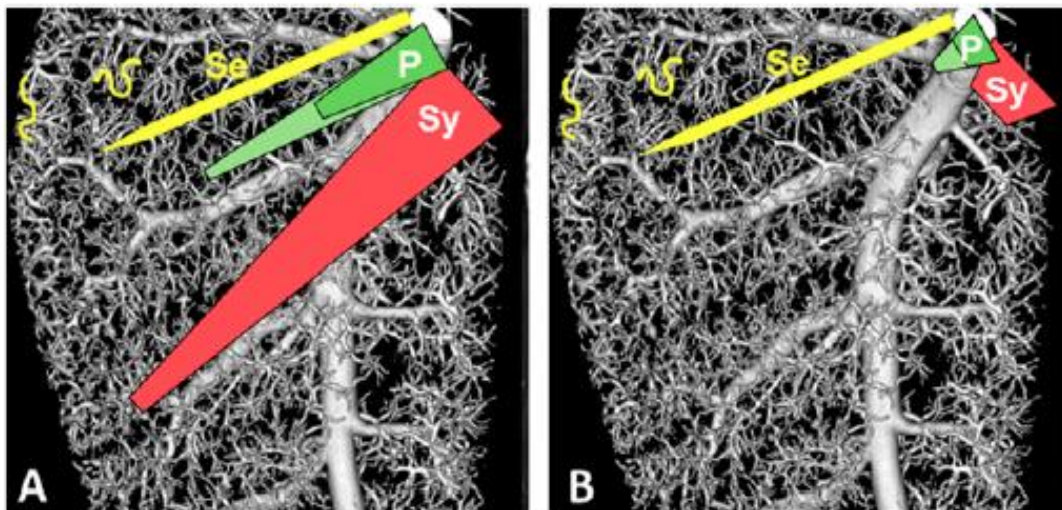


Figura 3. Distribuição da inervação simpática (Sy), parassimpática (P) e sensorial (Se) ao longo da circulação pulmonar através de imagem de tomografia obtida do pulmão de camundongo. Representação da densidade de nervos em cobaia, coelho, ovelha, gato, cachorro e humano (A) e em camundongo e rato (B). A densidade da inervação é representada pela espessura das barras (35).

Em artéria pulmonar principal de coelho a ACh induziu relaxamento que não houve alteração significativa, após remoção do endotélio, portanto esse efeito relaxante pela ACh é dependente do endotélio vascular. Entretanto, em artéria intrapulmonar de pequeno (200 μm) e médio (500 μm) calibre a ACh induziu contração em tecidos pré-contraídos com U-46619 ou ET-1 (36). Em outro trabalho, nas artérias extra (2 mm) e intrapulmonares (200 μm) de coelho a contração induzida pela estimulação elétrica foi sensível e resistente ao prazosina e atropina respectivamente. Entretanto, neste trabalho a atropina não interferiu na resposta contrátil de ambas as artérias (37). Em artéria pulmonar isolada de humano a ACh e o carbacol induziram contração em vasos sem endotélio e relaxamento em vasos com endotélio, enquanto que o inibidor da butirilcolinesterase, iso-OMPA potencializou a contração, mas não o relaxamento induzido pela ACh (38). Assim, podemos observar que existem diferenças regionais na resposta induzida pela ACh, entretanto a importância deste sistema no controle vasomotor ainda é controversa uma vez que a maioria dos trabalhos avaliaram seu papel através de experimentos de imunohistoquímica e/ou com artéria isolada, através da adição exógena e poucos trabalhos através da adição por via endógena de ACh, contudo mostrando a via colinérgica, fisiologicamente ativa.

JUSTIFICATIVA

O papel do sistema nervoso simpático no controle do tônus da circulação pulmonar já está bem estabelecido, uma vez que sua ativação leva à vasoconstrição independentemente da integridade do endotélio. Em relação à

inervação colinérgica nos vasos sua ativação pode levar a respostas opostas e/ou bifásicas pela ACh exógena, as quais dependem do calibre da artéria e/ou da espécie animal. No entanto não existem trabalhos que mostrem essa resposta bifásica no Sistema nervoso parassimpático ou pela ACh endógena. Nos últimos anos o papel da ACh vem ganhando maior destaque, uma vez que estudos mostram a expressão do ChAT, VChAT em estruturas não neurais, mudando a visão clássica de que a ACh seria liberada somente a partir de estruturas neurais. Em alguns leitos vasculares, como o cerebral e peniano o sistema nervoso colinérgico participa do controle vasomotor, seja liberando ACh ou outro neurotransmissor, como NO, ATP ou VIP. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório utilizando a espécie *Callithrix jacchus* mostraram que a ACh não relaxou aorta com endotélio íntegro, então fomos investigar, se em outros leitos vasculares, essa resposta era similar e observamos que na artéria pulmonar, com endotélio íntegro, além da ausência de relaxamento, a ACh induziu contração. A partir deste resultado surpreendente, pela diferença de resposta em relação aos outros mamíferos, procuramos caracterizar de maneira mais detalhada a contração mediada pela ACh em artéria pulmonar. Apesar dos nossos achados terem sido realizados somente *in vitro*, é plausível especular que nesta espécie o sistema nervoso colinérgico possa ser relevante para o controle do tônus vascular pulmonar. Estudos adicionais serão necessários para avaliar se o sistema nervoso colinérgico participa de situações patológicas, como por exemplo na hipertensão pulmonar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar farmacologicamente a reatividade vascular em artéria pulmonar isolada de *C. jacchus* frente a ação da acetilcolina.

2.2 Objetivo específico

Os objetivos específicos incluem:

- 1) Caracterizar a contração mediada pela acetilcolina exógena e endógena em artéria pulmonar isolada.
- 2) Avaliar a expressão da colina acetiltransferase em artéria pulmonar

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados sagüis (*Callithrix jacchus*), machos e fêmeas pesando entre 330 - 430 g fornecidos pelo Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE) e Parque Ecológico do Tietê (PET) os quais ficaram alojados em gaiolas. Os saguis receberam alimentação nos mesmos padrões dos lugares de procedência. Os protocolos empregados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA Protocolo nº 2022-1) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO Protocolo 16951-1).

3.2 Preparação dos anéis de artéria pulmonar

Os animais foram sacrificados com isoflurano, seguido de cetamina (70 mg/Kg). A artéria pulmonar foi isolada e segmentadas em dois anéis, com cerca de 3 mm de comprimento e, após a remoção de tecido adiposo e conectivo circundantes, cada anel foi montado entre dois ganchos, conectados a um transdutor isométrico sob tensão passiva de 10 mN em banho de órgão isolado preenchido com solução Krebs-Henseleit, continuamente aerada com mistura carbogênica (O₂/CO₂ - 95%/5%) e mantidas à temperatura de 37 °C e pH 7,4.

Os registros de tensão foram adquiridos utilizando o programa de aquisição de dados PowerLab 4/30 (versão software 7.3.4 ADInstruments, Australia). A solução nutritiva de Krebs-Henseleit foi trocada a cada 15 minutos durante o período de 1 hora e a tensão reajustada quando necessária. Uma solução de cloreto de potássio (KCl, 80 mM) foi adicionada ao término dos protocolos funcionais. Em alguns protocolos experimentais o endotélio foi removido através

do método de fricção na luz do vaso e sua remoção foi verificada pelo método de microscopia de luz.

3.3 Protocolos Experimentais

3.3.1 Protocolos em artéria pulmonar

- Foram realizadas curvas concentração resposta a adenosina difosfato, (ADP 0,00001-1 mM), na ausência e na presença do inibidor da sintase do óxido nítrico L-NAME (100 μ M) e do inibidor não seletivo da ciclooxigenase, indometacina (10 μ M).
- Foram realizadas curvas concentração resposta à acetilcolina (ACh, 0,00001-3 mM) na ausência e na presença do inibidor da sintase de óxido nítrico (L-NAME, 100 μ M), do inibidor não seletivo para a ciclooxigenase (indometacina, 10 μ M), dos antagonistas muscarínicos M1 (pirenzepina, 100nM), M2 e M4 (metoctramina, 100 nM) e M3 (4-DAMP, 100nM), do bloqueador nicotínico ganglionar (hexametônio, 1 μ M) e do antagonista adrenérgico (fentolamina, 10 μ M). Em alguns protocolos experimentais a contração à ACh foi realizada em vasos sem endotélio.
- Foram realizadas curva frequência-resposta de contração na ausência e na presença de 4-DAMP (100 nM) mais metoctramina (100 nM) associadas ou não associadas à fentolamina. Em alguns protocolos

experimentais a contração induzida pela estimulação elétrica foi realizada na presença de tetrodotoxina (TTX, 1 μ M).

- Foram realizadas curva frequência-resposta na ausência e na presença do inibidor da acetilcolinesterase (fisostigmina, 10 μ M).
- Foram realizadas curva frequência-resposta na ausência e na presença do endotélio vascular.

3.4 Microscopia de luz

Após a remoção da artéria pulmonar (n=5) alguns anéis foram seccionados e posteriormente houve a remoção mecânica da camada endotelial através de fricção da parede interna do vaso com uma pinça. Os anéis foram fixados em paraformaldeído 10% durante 24 horas, seguida de desidratações em séries de concentração crescente de etanol até 100%. Em seguida o material foi emblocado em Histotec (Merck, Darstadt, Alemanha). Secções com 4-5 μ m de espessura foram obtidas para confecção de lâminas, que foram coradas por hematoxilina e eosina.

3.5 Microscopia de fluorescência

Os ramos direito e esquerdo das artérias pulmonares (n=4) foram isoladas, cortadas em anéis e imediatamente fixadas em paraformaldeído (4%) diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 24 horas. Os fragmentos foram imersos em solução protetora e congelados a -20°C. Cortes de 8 μ m foram aderidos a lâminas de microscopia previamente tratadas com *bind-silane*. Após a adesão, os cortes foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,1 M para remoção da solução

protetora e seguidamente foram incubados com uma solução de fosfato de sódio contendo 50 mM de cloreto de amônio para bloqueio de carga por 30 minutos a temperatura ambiente, em seguida os cortes foram incubados com solução tampão acrescido de 5% de BSA por 1 hora para bloqueio de sítios de ligação inespecífica. O anticorpo primário para colina acetiltransferase (ChAT, 1:100, Abcam) foi diluído em tampão fosfato de sódio acrescido de 1% de BSA e incubados por 48 horas a 4°C. Em seguida os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio acrescido de 1% BSA por 30 minutos. Após a remoção do anticorpo primário não ligado, foi adicionado o anticorpo secundário marcado com fluorocromo por 24 horas a 4°C. Como tecido controle utilizou-se o cérebro dos saguis e os anticorpos e os tempos de incubação foram os mesmos utilizados para os vasos, enquanto que o controle negativo consistia na omissão do anticorpo primário, os resultados foram observados em microscópio da marca Leica DM5000 B.

3.6 Parâmetros farmacológicos

As respostas contráteis dos agonistas foram medidas em mN e corrigidas em relação a contração induzida pelo cloreto de potássio (KCl, 80 mM), que foi considerada como sendo 100%. O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abscissas e a porcentagem do efeito em ordenadas. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional “GraphPad Prism” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência e respostas máximas foram calculados pela seguinte equação $E = E_{max} / [1 + (10^c / 10^X)^N + \Phi]$, onde E é elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima

resposta que o agonista pode produzir, “c” é o logaritmo da EC_{50} , que é a concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x” é o logaritmo da concentração do agonista, o expoente, “N”, significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max} , $\log EC_{50}$ e o “n” foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

Os protocolos experimentais envolvendo a estimulação elétrica foram expressos em “mN”, enquanto que os relaxamentos provocados pelos agonistas que atuam na via NO/GCs/PDE5 foram calculados como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina.

3.7 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental n (animais). Utilizou-se o teste “t” de Student. Em algumas situações foi usado o teste de análise de variância (ANOVA-*one way*), seguido pelo teste de Tukey. O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para estas análises. $P < 0,05$ foi aceito como significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Relaxamento induzido pela adenosina difosfato em artéria pulmonar de *Callithrix jacchus*.

Em artéria pulmonar o ADP induziu relaxamento que foi dependente da concentração com valores de pEC_{50} e E_{max} de $6,38 \pm 0,17$ e $98 \pm 1\%$, respectivamente, frente redução de aproximadamente 42% na E_{max} na presença do L-NAME (n=5) ou Indometacina (n=6) (Figura 4A).

4.2 Contração induzida pela acetilcolina ou fenilefrina em artéria pulmonar de *Callithrix jacchus*.

Em vasos com endotélio íntegro e em tônus basal tanto a ACh (pEC_{50} $5,83 \pm 0,08$ e E_{max} : $103 \pm 9\%$, n=5, Figura 4B) como fenilefrina (PE, pEC_{50} $6,24 \pm 0,09$ e E_{max} $94 \pm 9\%$, n= 4, Figura 4C) induziram contração que foi dependente da concentração. Na presença do L-NAME ou após remoção do endotélio houve um aumento significativo na contração induzida pela ACh ou PE. É importante mencionarmos que mesmo em tecidos pré-contraídos com PE (5 μ M) a ACh (0,01, 0,1 e 1 μ M) induziu contração (dados não mostrados). A incubação prévia do inibidor da ciclooxigenase, indometacina (10 μ M, n=5) reduziu em, aproximadamente, 50 % ($P < 0,05$) a resposta contrátil mediada pela ACh (Figura 4B).

Como o L-NAME e a indometacina não aboliram o relaxamento induzido pelo ADP a remoção do endotélio foi confirmada pela microscopia de luz (Figura 4D)

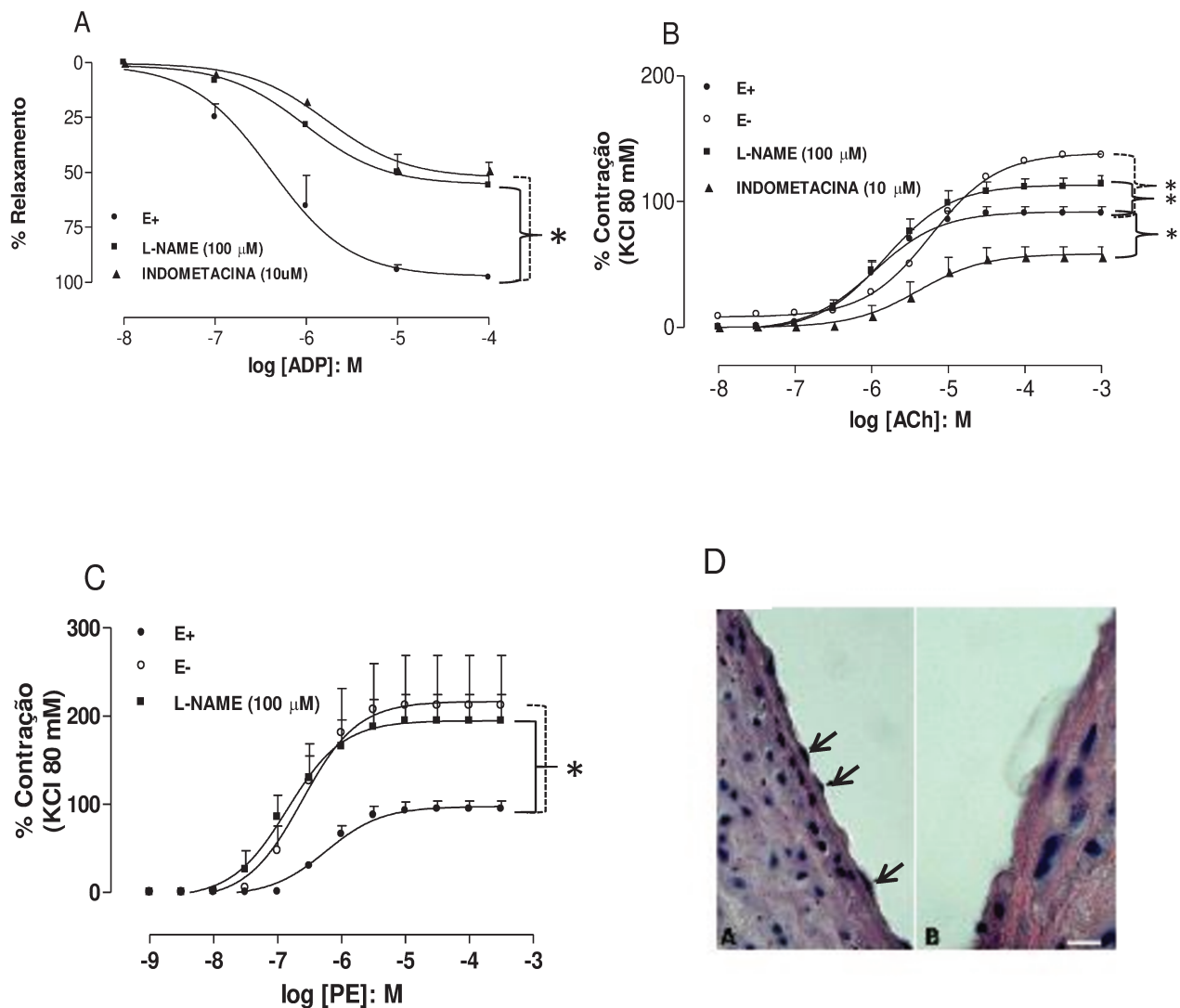


Figura 4. (A) Relaxamento induzido pela adenosina difostato (ADP 0,001 - 100 μ M) na ausência (E+) e na presença de L-NAME (100 μ M, n=5) ou indometacina (10 μ M, n=6). (B) Curva concentração resposta a acetilcolina (ACh, 0,01 - 300 μ M) na ausência e na presença do L-NAME (100 μ M, n=5), de indometacina (10 μ M, n=5) ou após remoção do endotélio (E-, n=5). (C) Curva concentração resposta à fenilefrina (PE, 0,001 - 300 μ M) na ausência e na presença do L-NAME (100 μ M, n=4) ou após remoção do endotélio (E-, n=4). As contrações foram calculadas em relação a contração induzida pelo KCl (80 mM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm e.p.m. D. Imagem representativa da artéria pulmonar (n=5 animais) com células endoteliais, indicadas por setas (A) e sem endotélio (B).

*P<0,05 em comparação aos respectivos grupos controle (teste "t" não pareado).

4.3 Avaliação da contração induzida pela ACh na presença e ausência dos antagonistas dos receptores muscarínicos, nicotínicos, α -adrenérgicos e do bloqueador do canal de sódio dependente de voltagem em artéria pulmonar de *Callithrix jacchus*.

Na presença dos antagonistas dos receptores muscarínicos seletivos para o receptor M3 (4-DAMP, 100 η M, n=4, P<0,05) ou M2 (Metoctramina, 100 η M, n=4, P<0,05) houve uma redução de aproximadamente 74% na contração induzida pela ACh. Por outro lado, o antagonista muscarínico mais seletivo para o receptor M1 (Pirenzepina, 100 nM, n=5, P>0,05) não interferiu nos parâmetros farmacológicos da ACh (Figura 5A).

Os bloqueadores do receptor nicotínico ganglionar (hexametônio, 1 μ M, Figura 5B, n=5, P>0,05), dos canais de sódio dependentes de voltagem (tetrodoxina 1 μ M, Figura 5C, n=4, P>0,05) ou antagonista não seletivo para os receptores α -adrenérgicos (fentolamina, 10 μ M, Figura 5D, n=4, P>0,05) não interferiram na resposta contrátil induzida pela ACh.

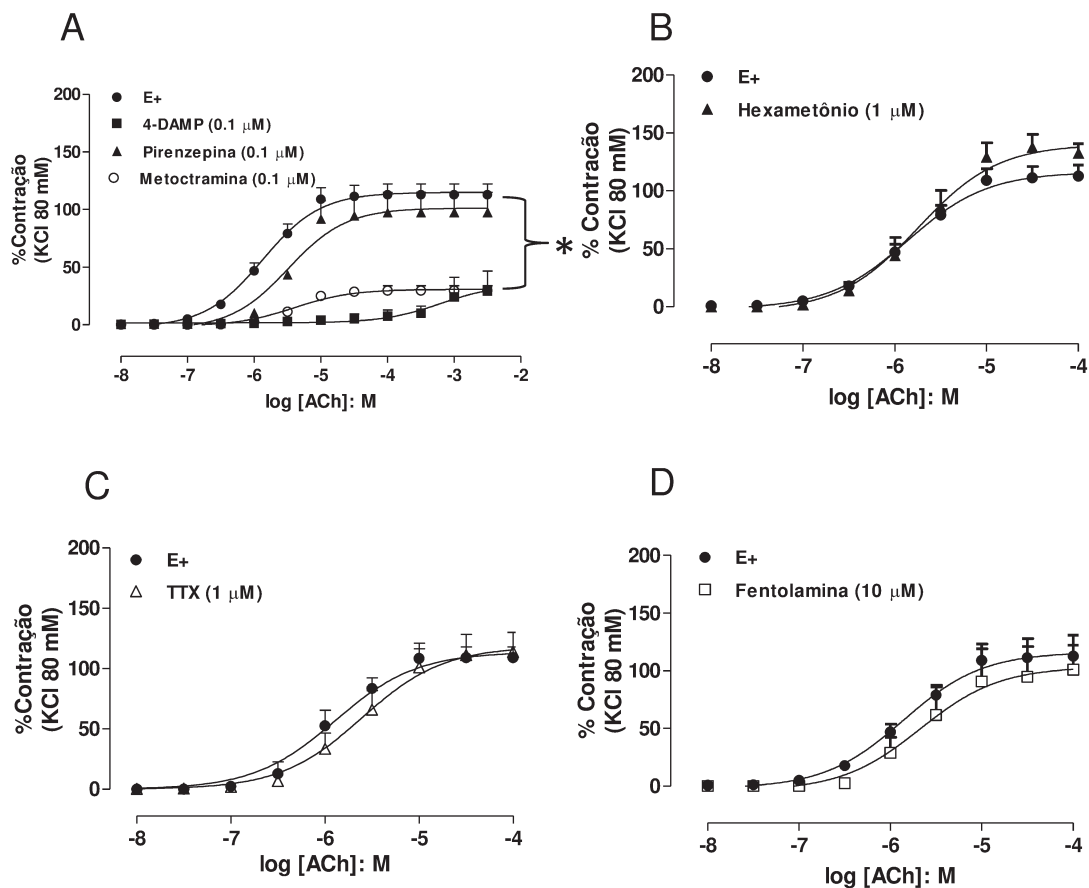


Figura 5. A. Curva concentração resposta à acetilcolina (ACh) na ausência e na presença dos antagonista seletivos para os receptores M3 (4-DAMP, 100 nM, A, n=4), M2 (metoctramina, 100 nM, A, n=4) ou M1 (pirenzepina, 100 nM, A, n=5). B. Curva concentração resposta à acetilcolina na ausência e na presença do hexametônio (1 μ M, B, n=5) tetrodoxina (1 μ M, C, n=4) ou fentolamina (10 μ M, D, n=4) em artéria pulmonar isolada de *Callithrix jacchus* com endotélio íntegro. As contrações foram calculadas em relação à contração induzida pelo KCl (80 mM), que foi tomada como 100%. Os dados representam a média \pm e.p.m. *P<0,05 em comparação aos respectivos grupos controle (teste “t” não pareado).

4.4 Contração induzida pela estimulação elétrica em artéria pulmonar isolada de *Callithrix jacchus*.

A estimulação elétrica induziu contração que foi dependente da frequência, sendo a resposta máxima atingida na frequência de 16 Hz. Na presença de TTX (1 μ M, n=3) a resposta contrátil foi abolida (dados não mostrados), mostrando assim uma resposta neurogênica. Na presença dos antagonistas 4-DAMP (100 nM) + metoctramina (100 nM, n=5) houve uma redução de aproximadamente 60 % ($P < 0,05$) da amplitude de contração induzida pela estimulação elétrica (Figura 6A), enquanto que a co-incubação dos antagonistas muscarínicos com fentolamina (10 μ M, n=5, $P < 0,05$) praticamente aboliu esta contração.

Por outro lado, a incubação de fisostigmina (10 μ M, n=5) produziu um aumento na amplitude de contração de, aproximadamente, 69 % (4 e 8 Hz, $P < 0,05$) e 107 % (16 Hz, $P < 0,05$) (Figura 6B). A remoção da camada endotelial não interferiu na amplitude de contração induzida pela estimulação elétrica (Figura 6C).

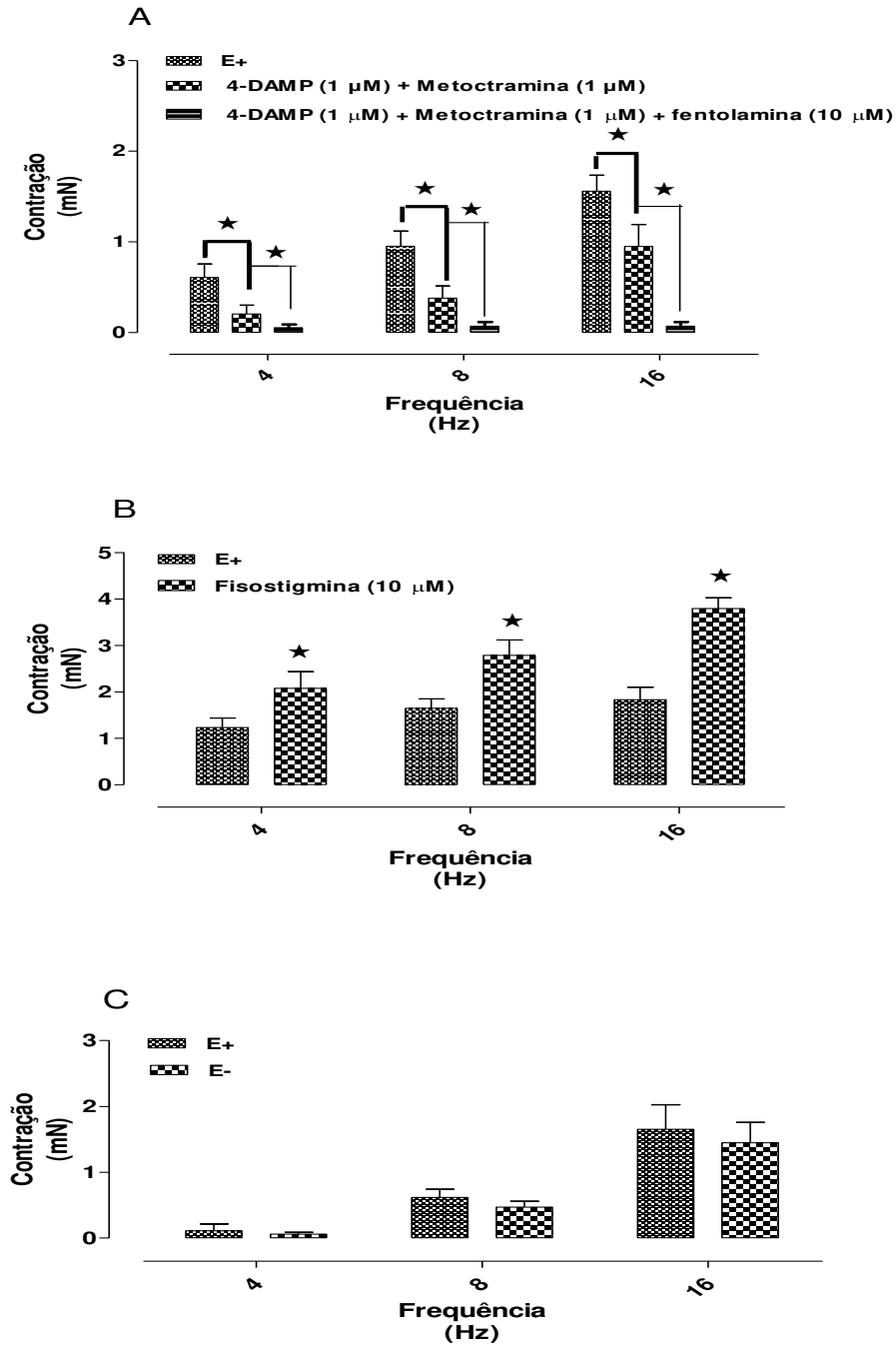


Figura 6. (A) Contração induzida pela estimulação elétrica (4, 8 e 16 Hz, 80 V, 10 segundos de estimulação) na ausência (E+) e na presença do 4-DAMP (1 μM, n=5) com metocitramina (1 μM, n=5) ou associados com fentolamina (10 μM, n=5) ou fisostigmina (10 μM, n=5, B) ou após remoção do endotélio (n=8, C) . As colunas representam as médias ± e.p.m. (C) *P<0,05 em comparação ao E+ (ANOVA “one way” [A] e teste “t” de student [B]).

4.5 Expressão da colina acetiltransferase (ChAT) em artéria pulmonar de *Callithrix jacchus*.

A enzima colina acetiltransferase está expressa na túnica media assim como nos neurônio do córtex cerebral (controle positivo). Não foi observada nenhuma reatividade quando o anticorpo primário foi omitido ("Controle", Figura 7).

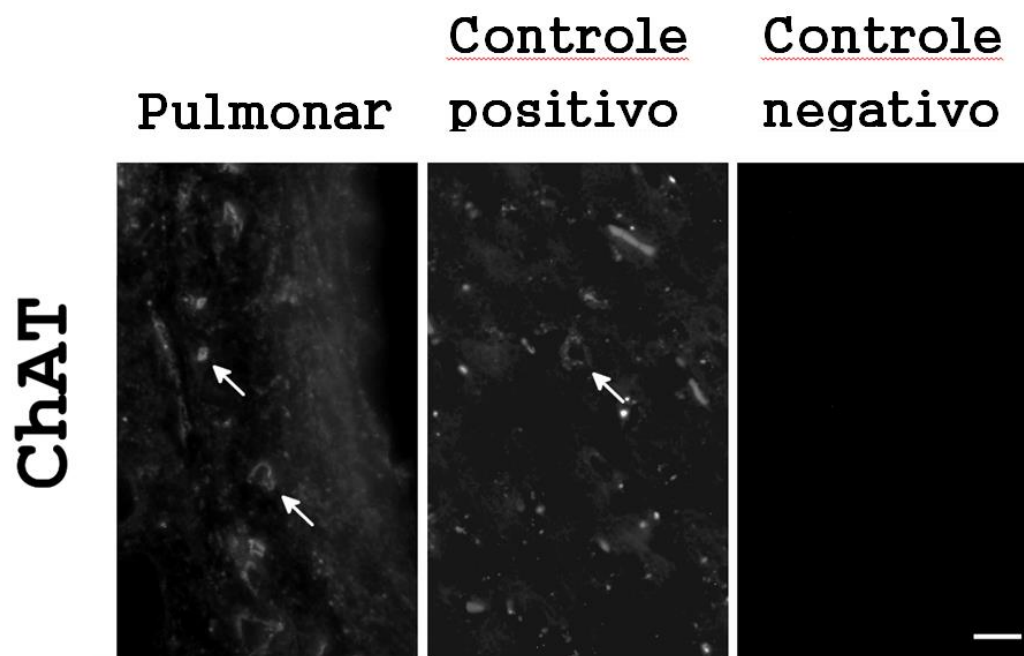


Figura 8. Imunorreatividade da colina acetiltransferase (ChAT, 100x original) em túnica media da artéria pulmonar de *Callithrix jacchus*. O córtex cerebral foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário. Imagens representativas, n=4 animais.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho observamos que, diferentemente da maioria dos vasos de mamíferos, em artéria pulmonar de *Callithrix jacchus* a ACh não induziu nenhum relaxamento em vaso pré-contraído e com endotélio íntegro. Além disso, a ACh exógena e endógena contraiu vasos com tônus basal e endotélio. A análise de imunohistoquímica revelou a expressão da ChAT na túnica média da artéria pulmonar.

A espécie *Callithrix jacchus* foi inicialmente utilizada em nosso laboratório para avaliação da reatividade da musculatura lisa cavernosa. Simultaneamente aos experimentos com corpo cavernoso isolamos a artéria pulmonar para avaliar se os mediadores que comumente controlam o tônus vascular em mamíferos também estavam presentes nesta espécie animal e observamos que além da ausência de relaxamento frente a ACh, a mesma contraiu vaso com endotélio íntegro e em tônus basal. A partir de então, duas perguntas foram levantadas: 1) Será via do NO estaria conservada nesta espécie? 2) Será que os receptores muscarínicos estariam expressos na camada endotelial? A primeira possibilidade foi descartada, em relação a segunda possibilidade ainda não conseguimos afirmar se a densidade de receptores muscarínicos é baixa ou até mesmo ausente na camada edotelial, uma vez que os anticorpos reativos para estas proteínas não funcionaram em tecidos controles de rato ou camundongo. A partir de então passamos a focar nossos protocolos experimentais na artéria pulmonar procurando caracterizar a contração induzida pela ACh.

O sistema nervoso colinérgico está envolvido em alguns processos fisiopatológicos, como na doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquite, asma (39) e (40) mal de Alzheimer e outras demências (41, 42). Entretanto, os dados da

literatura são escassos e controversos quanto a importância deste sistema no controle do tônus vascular. Assim, em mamíferos a resposta mediada pela ativação do sistema nervoso colinérgico, (relaxamento ou contração), dependerá da espécie animal e do vaso.

Na circulação cerebral de cachorro e macaco (43) foi observado expressão ChAT e a ACh foi co-liberada com NO, causando vasodilatação ou modulação da liberação de outros neurotransmissores (44, 45). Na circulação pulmonar existem várias controversas, uma vez que a ACh exógena produziu vasoconstrição em tônus basal nas artérias intrapulmonares e vasodilatação em tecidos pré-contraídos tanto nas artérias extra- e intrapulmonares de coelho (46), ovelha (36) e humano (47). É sabido que a ativação dos receptores muscarínicos presentes no endotélio é acompanhada de aumento da concentração de cálcio levando assim à liberação de substâncias contráteis, como tromboxano A₂, prostaglandina F_{2α} ou relaxantes, como NO e prostaciclina.

No presente trabalho a ACh não produziu nenhum relaxamento em artéria pulmonar com endotélio íntegro em todas as concentrações estudadas. Por outro lado, na artéria pulmonar a ACh produziu contração que foi significativamente reduzida na presença de metocramina, 4-DAMP e indometacina, sugerindo que parte da contração mediada pela ACh envolve a liberação de fatores contráteis oriundos da via da ciclooxigenase. Em pacientes hipertensos, mas não nos normotensos, a administração intra-arterial de indometacina melhorou a vasodilatação induzida pela ACh, mas não do nitroprussiato de sódio (48, 49). Em aorta isolada de ratos espontaneamente hipertensos ou do respectivo controle e tratada previamente com L-NAME, a ACh induziu contração em vaso com

endotélio, porém, este efeito não foi observado em vasos sem endotélio. Além disso, a ACh induziu a liberação de 6-ceto-PGF1 α , tromboxano B₂, PGE₂ e PGF₂ α em ambas as linhagens (50). Apesar da contração mediada pela ACh ter sido reduzida na presença da indometacina, é importante salientar que após remoção do endotélio a contração mediada pela ACh não foi reduzida, mas sim aumentada, sugerindo que os fatores relaxantes derivados do endotélio contrabalanceiam a contração mediada pela ACh.

O tipo de neurotransmissor responsável pela resposta contrátil também varia conforme a espécie e leito vascular. Em artéria uterina de macaco (43), em artéria mamária de porco (51) e em artéria pulmonar principal de rato e porco a resposta contrátil é mediada pela noradrenalina e ATP. Por outro lado, em artéria coronária de vaca (31) e artéria ciliar de macaco (52), a contração induzida pela estimulação elétrica se deu pela liberação de ACh, uma vez que esta resposta foi aumentada na presença de fisostigmina e abolida com a atropina. No presente trabalho a resposta contrátil neurogênica envolveu tanto a liberação de ACh como de catecolamina, pois na presença dos antagonistas muscarínicos e adrenérgico esta resposta foi significativamente reduzida, enquanto que na presença de fisostigmina pudemos observar aumento da resposta.

No sistema vascular tem sido relatada a presença de receptores nicotínicos nas células endoteliais que podem modular a sobrevivência, proliferação e migração destas células. (16, 53). Em aorta isolada de ratos controle e espontaneamente hipertensos a nicotina induziu relaxamento somente em vasos com endotélio íntegro, sendo esta resposta reduzida na presença dos bloqueadores α -bungarotoxina e α -conotoxina (54). Uma vez que receptores

nicotínicos também estão presentes em terminais nervosos simpáticos, decidimos avaliar se a contração induzida pela ACh poderia ser em parte devido a liberação de noradrenalina. Entretanto, nenhuma alteração foi observada frente a contração à ACh após incubação com fentolamina, hexametônio ou tetrodotoxina.

Atualmente existem diversas evidências da liberação de ACh extra-neuronal, uma vez que foi vista expressão ChAT e VChAT em linfócitos, células mononucleares, granulócitos e células epiteliais do trato respiratório, gastrointestinal e urogenital além das células endoteliais (55, 56). Outra evidência levantada é que a contração induzida pela estimulação elétrica poderia ser devido em parte a liberação de ACh do endotélio. Apesar de estudos prévios terem mostrado expressão ChAT em células endoteliais umbilicais (55), no presente trabalho a enzima ChAT estava expressa principalmente na túnica media. A ausência de endotélio não interferiu na contração mediada pela estimulação elétrica e a tetrodotoxina aboliu a resposta contrátil, confirmando assim que a terminais nervosos são a principal fonte de ACh na artéria pulmonar.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste estudo, concluímos que em artéria pulmonar principal de *Callithrix jacchus* o sistema nervoso colinérgico induziu vasoconstrição, sugerindo assim que nesta espécie o sistema nervoso colinérgico possa contribuir para a regulação da circulação pulmonar. Assim, como o mesmo neurotransmissor pode induzir respostas opostas em um mesmo leito vascular, é imprescindível o conhecimento da fisiologia e farmacologia comparada para a escolha da melhor espécie animal, principalmente em situações onde se pretende induzir uma patologia.

Limitações do estudo: seria importante a realização da hemodinâmica pulmonar após infusão de ACh para averiguarmos se os achados *in vivo* corroborariam os *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS

1. MESTIKAWY, S. E.; MACKENZIE, A.; FORTIN, G. M.; DESCARRIES, L.; TRUDEAU, L.E. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. **Nature Neurosci.** May, 19 (12): 204 – 216, 2011.
2. BURNSTOCK, G. Autonomic Neuroscience Centre. University College Medical School, Rowland, London. **Experimental Physiology.** (94.1): 20–24, 2008.
3. USDIN, T. B.; EIDEN, L. E.; BONNER, T .I.; ERICKSON J. D. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. **Trends Neurosci.** (18): 218–224, 1995.
4. ARVIDSSON, U.; RIEDL, M.; ELDE, R.; MEISTER, R.B. Vesicular acetylcholine transporter (vacht) protein: A novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. **The journal of comparative neurology.** (378): 454–467, 1997.
5. PRADO, F. V.; ROY, A.; KOLISNYK, B.; GROS, R.; PRADO, M. A. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. **Biochemical Journal.** (450); 265–274, 2013.
6. GRANDO S.A.; KIST D.A.; QI. M.; Dahl, M. V. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. **J InvestDermatol.** (101): 32-36, 1993.
7. REINHEIMER, T.; BERNEDO P.; KLAPPROTH, H.; OELERT, H.; ZEISKE, B.; RACKÉ, K.; WESSLER, I. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. **American Journal of Physiology.** May, (270) (5 Pt 1): 722-8, 1996.

8. KLAPPROTH, H.; REINHEIMER, T.; METZEN, J.; MÜNCH, M.; BITTINGER, F.; KIRKPATRICK, C.J.; HÖHLE, K.D.; SCHEMANN, M.; RACKÉ, K.; WESSLER, I. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. Department of pharmacology, University of Mainz, Germany. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** (4):515-23, 1997.
9. LESKO S, WESSLER I, GÄBEL G, PETTO C, PFANNKUCHE H. Cholinergic modulation of epithelial integrity in the proximal colon of pigs. **Cells Tissues Organs.** (5):411-20, 2013.
10. YOSHIDA M, MASUNAGA K, SATOJI Y, MAEDA Y, NAGATA T, INADOME A. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of non-neuronal acetylcholine in urothelium and its clinical significance. **J Pharmacol Sci.** 106(2):193-8. 2008.
11. LIPS, K.S. Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries. **J Histochem Cytochem.** (51): 1645-1654, (2003).
12. FUJII, T.; TSUCHIYA, T.; YAMADA, S.; FUJIMOTO, K.; SUZUKI, T.; KASAHARA, T.; KAWASHIMA, K. Localization and Synthesis of Acetylcholine in Human Leukemic T Cell Lines. **Journal of Neuroscience Research.** (44): 66-72, 1998.
13. WESSLER, I.; KILBINGER, H.; BITTINGER, F.; UNGER, R.; KIRKPATRICK, C. J. The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. **Life Sciences.** (72): 2055–2061, 2003.

14. PARAOANU, L. E; STEINERT, G; KOEHLER, A; WESSLER, I; LAYER, P, G. Expression and possible functions of the cholinergic system in a murine embryonic stem cell line. **Life Sciences**. (80): 2375–2379; 2007.
15. KAWASHIMA, K.; YOSHIKAWA, K.; YOSHIHITO X.; FUJII, T.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. **Life Sciences**, (80): 2314–2319, 2007.
16. LI, X.W.; WANG, H. Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization. **Life Sci**. (78): 1863-70, 2006.
17. HABERBERGER, R.V.; SCHEMANN, M.; SANN, H.; KUMMER, W. Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. **Journal Appl Physiology**. (82): 426–434, 1997.
18. VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E.H.C.; FELETOU, M. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiology**, (196): 193–222, 2009.
19. FÉLÉTOU, M.; HUANG, YU.; VANHOUTTE P, M,. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology** . (164): 894–912, 2011.
20. MANI, S.; LI, H.; UNTEREINER, A.; WU, L.; YANG, G.; AUSTIN, R.C.; DICKHOUT, J.G.; LHOTÁK, S.; MENG, Q.H.; WANG, R. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. **Circulation**. 127 (25): 2523-34, 2013.
21. DAVIGNON J, GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis, **Circulation**. 109(23):III27-32, 2004.

22. HAMMER MD, SCHWAMM L, STARKMAN S, SCHELLINGER PD, JOVIN T, NOGUEIRA R, BURGINS WS, SEN S, DIENER HC, WATSON T, MICHEL P, SHUAIB A, DILLON W, LIEBESKIND DS. Safety and feasibility of NeuroFlo use in eight- to 24-hour ischemic stroke patients. **Int J Stroke.**(8): 655-61, 2012.
23. HEDLUND H. [Sildenafil (Viagra) a new drug in the treatment of erectile dysfunction], *Tidsskr Nor Laegeforen.* 120 (22): 2674-5, 2000.
24. DAUPHIN, F.; HAMEL, E. Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation in feline middle cerebral artery exhibits M3 pharmacology. **European Journal of Pharmacology.** (178): 203-213, 1990.
25. MCCORMACK, D.G.; MAK, J.C.; MINETTE, F.; BARNES, P.J. Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation in the pulmonary artery. **European Journal of Pharmacology,** (158): 293-297, 1988.
26. BRUNNE, F.; KUHBERGER, E.; GROSCHNER, K.; POCH, G.; KUVOVETZ, W.R. Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium dependent relaxation of bovine coronary artery. **Eur J Pharmacol.** (200): 25-33, 1991.
27. OBI, T.; KABEYAMA, A.; NISHIO, A. Characterization of muscarinic receptor subtype mediating contraction and relaxation in equine coronary artery in vitro. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy,** (17): 226-231, 1994.
28. HAMMARSTROM, A. K.M.; PARKINGTON, H.C.; COLEMAN, H. A. Release of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) by M3 receptor stimulation in guinea-pig coronary artery. **British Journal of Pharmacology.** (115): 717- 722, 1995.

29. KAMATA, K.; UMEDA, F.; KASUYA, Y. Possible existence of novel endothelium-derived relaxing factor in the endothelium of rat mesenteric arterial bed. **Journal Cardiovascular Pharmacology**. (4): 601-6, 1996.
30. ZYGMUNT, P. M.; EDWARDS, GILLIAN.; WESTON, A. H.; LARSSON, B.; EDWARD HOEGESTAETT, D. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. **British Journal of Pharmacology**, (121): 141-149, 1997.
31. KALSNER, S.; QUILLAN, M. Cholinergic Contraction to Field Stimulation in Coronary Arteries of Cattle, **The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 249 (3): 785-789, 1989.
32. FISHER, A. W.F. The intrinsic innervation of the pulmonary vessels. **Acta Anatomy (Basel)**. (60): 481–496. 1965.
33. CECH, S. Adrenergic innervation of blood vessels in the lung of some mammals. **Acta Anatomy (Basel)**. (74): 169 – 182, 1969.
34. HABERBERGER, R.V.; SCHEMANN, M.; SANN, H.; KUMMER, W. Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. **Journal Appl Physiology**. (82): 426–434, 1997.
35. KUMMER, W. Pulmonary Vascular Innervation and Its Role in Responses to Hypoxia Size Matters!, **Proceedings of the American Thoracic Society** (8): 471–476, 2011.
36. KEMP, B.K.; SMOLICH, J.J.; COCKS, T.M. Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and veins. **Br J Pharmacol**, 121: 441-450,

1997.

37. JACKSON, V. M.; Trout, S. J.; Cunnane, T.C. Regional variation in electrically-evoked contractions of rabbit isolated pulmonary artery, **British Journal of Pharmacology**. (137): 488-496, (2002).
38. WALCH, C. L; GASCARD, T. J. P; NASHASHIBI, J. N ; BRINK, P. C; NOREL, X. Cholinesterase activity in human pulmonary arteries and veins. **British Journal of Pharmacology**. (121): 986-990, 1997.
39. WARD, J.K.; BELVISI, M.G.; FOX, A.J.; MIURA, M.; TADJKARIMI, S.; YACOUB, M.H.; BARNES, P.J. Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. **J Clin Invest**. (92): 736–742, 1993.
40. TADIE, J. M.; HENNO, P.; LEROY, I.; DANIEL, C.; NALINE, E.; FAISY, C.; RIQUET, M.; LEVY, M; ISRAEˆL-BIET, D; DELCLAUX, C; Role of nitric oxide synthase/arginase balance in bronchial reactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. (294): 489–497, 2007.
41. RIDLEY, R.M.; MURRAY, T.K.; JOHNSON, J.A.; BAKER, H.F. Learning Impairment Following Lesion of the Basal Nucleus of Meynert in the Marmoset: Modification by Cholinergic Drugs. **Brain Research**, (376): 108-116, 1985.
42. BARTUS, R. T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Experimental Neurology**. (163): 495–529, 2000.

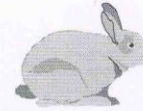
- 43.OKAMURA, T.; AYAJIKI, K.; FUJIOKA, H.; SHINOZAKI, K.; TODA, N. Neurogenic cerebral vasodilation mediated by nitric oxide .*Jpn J Pharmacol*, (88): 32-8, 2002.
- 44.LEE, T.J. Nitric oxide and the cerebral vascular function. *J BiomedSci*. 16-26, 2000.
- 45.LEE, T.J.; LIU, J.; EVANS, M.S. Cholinergic-nitroergic transmitter mechanisms in the cerebral circulation. **Microsc Res Tech**. (53): 119-128, 2001.
- 46.ALTIERE, R. J.; KIRITSY-ROY, J.A.; CATRAVAS, J.D. Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: role of thromboxane A₂. *Journal Pharmacology Experimental Therapy*. (236): 535-541, 2011.
- 47.NOEL, X.; WALCH, L.; COSTANTINO, M.; LABAT, C.; GORENNE, I.; DULMET, E.; ROSSI, F.; BRINK, C. M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. **Br J Pharmacol**, (119): 149-157, 1996.
- 48.TADDEI, S.; VIRDIS, A.; MATTEI, P.; SALVETTI, A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. **Hypertension**. (21): 929–933, 1993.
- 49.VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. **Eur J Physiol**, (459): 1015–1023, 2010.
- 50.GLUAIS, P.; LONCHAMPT, M.; MORROW, J. D.; VANHOUTTE, P. M.;

- FELETOU, M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **British Journal of Pharmacology**, (146): 834–845, 2005.
51. DUGGAN, D.J.; BIEGER, D.; TABRIZCHI, R. Neurogenic responses in rat and porcine large pulmonary arteries. **Pulmonary Circulation**. (1): 419-424, 2011.
52. TODA N, TODA M, AYAJIKI K, OKAMURA T. Cholinergic nerve function in monkey ciliary arteries innervated by nitrooxidergic nerve. **Am J Physiol**. (5 Pt 2):1582-9, 1998.
53. COOKE, J.P.; GHEBREMARIAM, Y. Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis. **Trends Cardiovascular Medicine**. (18): 247–253, 2008.
54. ZOU, Q.; LEUNG, S.W.; VANHOUTTE, P.M. Activation of nicotinic receptors can contribute to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in the rat aorta. **Journal Pharmacol Exp Ther**, (341): 756-63, 2012.
55. KIRKPATRICK, C.J.; BITTINGER, F.; NOZADZE, K.; WESSLER, I. Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. **Life Sci**. 72(18-19): 2111-6, 2003.
56. WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C.J.; RACKE, K. The cholinergic pitfall: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems including humans. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, (3): 198-205, 1999.

9. APÊNDICE



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2022-1, sobre "Caracterização *in vitro* e *in vivo* dos efeitos do dimetil sulfoxido e seus metabólitos, dimetil sulfona e dimetil sulfide, em musculatura vascular e não vascular isolada de macaco: possível envolvimento das vias de formação de sulfeto de hidrogênio e dióxido de enxofre", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto De Nucci / Fabíola Zakia Taufic Mónica, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 09 de novembro de 2009.

CERTIFICATE

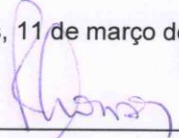
We certify that the protocol nº 2022-1, entitled "*In vitro* and *in vivo* characterization of dymethyl sulfoxide effects and its metabolites, dymethyl sulfone and dymethyl sulfide, in vascular and non vascular preparations from monkey: possible role of H2S and SO2 pathways", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 9, 2009.

Campinas, 11 de março de 2014.

2ª. VIA



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>