



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ALBERTO FERNANDO OLIVEIRA JUSTO

PAPEL DO ENDOTÉLIO NA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR
CAMPO ELÉTRICO EM AORTA DE *CROTALUS DURISSUS*
TERRIFICUS (CASCAVEL) E *BOTHROPS JARARACA*
(JARARACA) E EVIDÊNCIA DA SÍNTESE DE CATECOLAMINA
NO ENDOTÉLIO HUMANO

CAMPINAS
2020

ALBERTO FERNANDO OLIVEIRA JUSTO

PAPEL DO ENDOTÉLIO NA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR CAMPO ELÉTRICO EM AORTA DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* (CASCAVEL) E *BOTHROPS JARARACA* (JARARACA) E EVIDÊNCIA DA SÍNTESE DE CATECOLAMINA NO ENDOTÉLIO HUMANO

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

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE SERÁ DEFENDIDA PELO ALUNO ALBERTO FERNANDO OLIVEIRA JUSTO, ORIENTADO PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.

CAMPINAS
2020

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

J985p Justo, Alberto Fernando Oliveira, 1994-
Papel do endotélio na contração induzida por campo elétrico em aorta de *Crotalus durissus terrificus* (cascável) e *Bothrops jararaca* (jararaca) e evidência da síntese de catecolamina no endotélio humano / Alberto Fernando Oliveira Justo. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Gilberto de Nucci.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Catecolaminas. 2. Óxido nítrico. 3. Aorta. 4. Répteis. 5. Endotélio. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of endothelium in contraction induced by electrical field stimulation in aortae of *Crotalus durissus terrificus* (rattlesnake) and *Bothrops jararaca* (jararaca) and evidence of catecholamine synthesis in the human endothelium

Palavras-chave em inglês:

Catecholamines

Nitric oxide

Aorta

Reptiles

Endothelium

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]

Maria Andreia Delbin

Fernando Silva Carneiro

Jamaira Aparecida Victorio

André Sampaio Pupo

Data de defesa: 29-05-2020

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

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

- ORCID do autor: <http://orcid.org/0000-0001-5531-0485>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3185637286353066>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ALBERTO FERNANDO OLIVEIRA JUSTO

ORIENTADOR: GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI**
- 2. PROF. DRA. MARIA ANDRÉIA DELBIN**
- 3. PROF. DR. FERNANDO SILVA CARNEIRO**
- 4. PROF. DRA. JAMAIRA APARECIDA VICTORIO**
- 5. PROF. DR. ANDRÉ SAMPAIO PUPO**

Programa de Pós-Graduação

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

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

Data de Defesa: 29/05/2020

DEDICATÓRIA

A minha mãe **Raquel** e meu pai **Alberto Salvador** (*in memoriam*), que não pôde compartilhar esse momento fisicamente, dedico este trabalho com todo meu amor a vocês. Sem eles nenhuma conquista seria possível.

A minha irmã, **Fernanda**, minha conselheira, que desde criança sempre veio me guiando a fazer as melhores escolhas pessoais e profissionais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus mentores, Prof. Dr. Gilberto de Nucci e Dr. Ronilson Moreno agradeço pela oportunidade, confiança e pela sua contribuição em minha formação acadêmica; Prof Dr. Ingrid Fleming e Dr. Mauro Siragusa, agradeço o a oportunidade por ter feito parte do grupo na Universidade de Goethe, Frankfurt, Alemanha, pelas reuniões quase diárias, puxões de orelha e toda sabedoria compartilhada. Foi um privilégio ter sido orientado por todos vocês. Ao Prof. Dr. Edson Antunes, Profa. Dr. Fabíola Monica, Dra. Iris Sofia Bibli e Dr. Jiong Hu por todo suporte e conhecimento dado durante o doutorado.

A família, principalmente tias, Elisângela, Meire, Eliana e tios, Marcelo, Afonso, João Justo e Delvair, que sempre me trataram como filho, ajudaram em todas necessidades, me incentivaram e apoiaram em todas as escolhas.

Aos meus primos, Diego, Deyvid e Giovanna (bb), que são como irmãos, por todas as brigas e parceria de sempre e para sempre. Ao Johnatha, Gabriel, Ryan, Thaynara, Carlinhos, Victor, Vinícius, tia Elenaria, tia Sylvania, tio Edgar, tio Victor por toda paciência e pelos bons momentos e amizade.

A Ritinha, que sempre com bom humor e positividade excessiva e constante fez todo esse processo mais fácil, que sempre foi uma grande amiga e colega de trabalho, sempre me incentivou a ser uma pessoa e profissional melhor, obrigado também pelas várias risadas na Europa.

Aos meus queridos amigos Karol, por ser essa pessoa maravilhosa quase sempre (menos na parte da manhã, muito mal humorada) que sempre compartilhou e me ouvir nas melhores e piores horas durante o doutorado, Camila, que sempre esteve presente em todos os dramas e alegrias, Felipe, pela paciência, todos nossos duetos no lab e parceria dentro e fora do lab, Sandra, por todo carinho, cafés colombianos feito pela colombiana, amor e confissões e ao HD, por todas as besteiras, risadas, viagens e conselhos.

Ao Arnaldo Rodrigues, por ter sido tão doce todo esse tempo, Guilherme Ramos, que foi sempre muito companheiro, a amizade e dividir a casa com vocês, foi umas das melhores coisas que Campinas me trouxe.

A minha amiga que acolheu cientificamente, Mariana Gonçalves, que desde a minha entrada no lab me ensinou e incentivou a evoluir pessoalmente e cientificamente. Luiz Kiguti, que sempre teve toda paciência do mundo de ensinar e também discutir todos os resultados.

Ao casal amigo do laboratório, Matheus e Akila, que amo muito, por serem tão amigos e bondosos, sempre preocupados com todos. Ao Rafael, pelo apoio no laboratório em tantas madrugadas e pela parceria. A Edith, Gabis, Carois pela amizade e brincadeiras, os dias eram mais leves com vocês. Glau, Elen por serem tão mães para todos nós no lab, sempre preocupadas pelo nosso bem estar, já estou com saudades.

A Jerrayne Neves aos tantos anos de muita risada, parceria e cansaço, e após tanto tempo nunca ter mudado a relação. A Bruna Monique, por ser tão amiga e sempre solícita. Samuel Guilherme, pela amizade, conversas sobre as bads da pós, reclamações, por tudo. Ao Gustavo Henrique, um amigo tão bem humorado e que sinto bastante saudade.

Ao Pedro Afonso, que tive a felicidade de conhecer, infelizmente na parte final do doutorado, mas que fez toda diferença, melhorando meus dias, obrigado por tudo.

A todas pessoas que foram muito importantes e marcaram minha vida nessa fase da minha vida, André Palma, Julio Alejandro, Fabiano, Du, Eliezer, Tiago Novaes, Matheus e Marcelo Matsumoto, vocês fizeram todo esse processo diretamente ou indiretamente mais leve e gratificante.

Todos amigos que fizeram do trabalho bem mais prazeroso, Bia, Rapha, Gustavo Teramatsu, Dailson, Junia, Vanessinha, Aline, Mari Pioli, Mari Mora e Britto toda gratidão pela amizade e suporte durante esse tempo.

Aos amigos da graduação, Laís, Gabi, Luana, João, Jordana, Breno e Carlos por todas as risadas, nunca ter mudado nada após tanto tempo.

Aos amigos que fiz durante o BEPE, a Laila Romagueira, que é uma grande amiga e durante o estágio fez tudo ficar ainda melhor dentro e fora do laboratório, que além de dividir os dias no lab, também dividimos problemas, alegrias e comidas. Andrea Kapasakalidi, que compartilhamos casa e vários momentos de alegria e tristeza. Ao Sam Hedrick, por todos bons momentos, ajuda no inglês, conselhos furados para aprender alemão e explicar o porquê amar Frankfurt, ser sempre fofo e um ótimo amigo. Janina Wittig e Sebastian Kempf, que foram sempre muito bondosos, prestativos e pessoas que sinto bastante saudade de ter por perto. Xiaoming, Zumer e Giorgia que sempre compartilhamos risadas e dramas.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado no país e da bolsa de estágio de pesquisa no exterior (2015/15583-7; 2016/09539-8 e 2018/10414-0).

EPÍGRAFE

Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.

Josué 1:9

Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor.

Paulo Freire

RESUMO

Trabalhos de fisiologia comparada são fundamentais para o entendimento das relações evolutivas entre grupos, como os processos fisiológicos e funcionais e as diferentes adaptações de diversas espécies, ou seja, ganhos e perdas evolutivas. Estudos anteriores realizados por nosso grupo envolvendo espécies evolutivamente antigas como *Chelonoidis carbonaria* (jabuti-piranga) e *Pantherophis guttatus* (cobra-do-milharal) demonstraram que a contração induzida por estímulo elétrico de campo (EFS) das aortas isoladas desses animais é mediada por catecolaminas liberadas pelo endotélio, sem a influência de nervos adrenérgicos; tal mecanismo difere do mecanismo clássico de liberação de catecolaminas no sistema vascular de mamíferos, onde a inibição dos nervos adrenérgicos leva a diminuição ou abolição da resposta contrátil. Este trabalho por sua vez, teve como objetivo i) investigar o mecanismo envolvido na contração induzida por EFS de aortas isoladas de espécies evolutivamente mais recentes, cobras peçonhentas *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) e *Bothrops jararaca* (jararaca), ii) comparar tais resultados com os obtidos anteriormente em jabuti-piranga e cobra-do-milharal, e iii) investigar o papel do endotélio diante desse estímulo. Adicionalmente, uma vez que nosso grupo também vem realizando ensaios envolvendo alguns mamíferos, este trabalho buscou por evidências acerca da produção de catecolaminas em endotélio humano em tecido de paraganglioma humano. Os anéis isolados de aorta de cascavéis e jararacas foram contraídos por meio de EFS utilizando diferentes frequências de estímulo (4, 8 e 16 Hz) na presença e ausência de agentes simpatolíticos (fentolamina e guanetidina) e o bloqueador de canais de sódio voltagem dependente tetrodotoxina (TTX), assim como em anéis aórticos com endotélio intacto ou removido. Foram também realizadas análises de imuno-histoquímica na aorta dessas espécies e no endotélio humano a fim de investigar a expressão da tirosina hidroxilase (TH), uma enzima essencial na síntese de catecolaminas, e da proteína S100, um marcador neural. A contração induzida por EFS dos anéis de aorta isolados de cascavel ou jararaca foi dependente da frequência e da presença de endotélio, uma vez que em anéis ausentes de endotélio a contração se demonstrou reduzida. Na presença de guanetidina e fentolamina essa contração induzida por EFS foi reduzida ou abolida, porém, na presença de TTX, não houve diferença significativa nas contrações em todas as frequências. Análises de imuno-histoquímica revelaram a expressão de TH exclusivamente no endotélio dessas

aortas, porém não foi observada a expressão de proteína S100. De forma semelhante, endotélio no tecido de paraganglioma humano revelou TH enquanto as células neoplásicas apresentavam a expressão de ambos TH e S100. Nossos resultados sugerem que, a contração estimulada em anéis de aorta de cascavel e jararaca, apresenta a liberação de catecolamina é mediada pelo endotélio sem envolvimento de nervos simpáticos. Demonstramos também a expressão de TH no endotélio humano, sugerindo uma função de síntese de catecolaminas nesse tecido.

Palavras-chave: Catecolaminas, óxido nítrico, aorta, répteis, endotélio.

ABSTRACT

Comparative physiology studies are fundamental for understanding evolutionary relationships between species, such as physiological processes and functions of different species, adaptations, evolutionary gains and losses. Previously, our group have showed that, in isolated ring from aorta of evolutionarily the ancient species *Chelonoidis carbonaria* (jabuti-piranga) and *Pantherophis guttatus* (corn snake), the aortae contraction induced by electrical field stimulation (EFS) is mediated by catecholamines released by the endothelium without the influence of adrenergic nerves, unlike the classical mechanism seen in the vascular system of mammals, in which, when adrenergic nerves are inhibited, there is a reduction or a abolishment of the vessel contractile response. This study aimed to i) explore the mechanism involved in EFS evoked contraction of aortae isolated from the venomous snakes *Crotalus durissus terrificus* (rattlesnake) and *Bothrops jararaca* (*jararaca*); ii) compare these results with those obtained in more ancient reptile species as jabuti-piranga and corn snake, and iii) investigate the role of endothelium in EFS-induced aortae contraction. Additionally, as our group has been also studying the endothelium-derived catecholamine release in some mammals, we evaluated of endothelial catecholamine production in human endothelium of a paraganglioma biopsy. Aortic rings isolated by rattlesnakes and jararacas were contracted by the EFS in a frequency-dependent manner (4, 8 and 16 Hz), in the presence and absence of sympatholytic agents (phentolamine and guanethidine) and the voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX), as well as in aortae with intact or removed endothelium. Immunohistochemistry analysis were performed in the aorta of these species and in the human endothelium in order to investigate the expression of tyrosine hydroxylase (TH), an enzyme essential in the detection of catecholamines, and protein S100, a neural marker. The EFS-evoked contractions of rattlesnake and jararaca aortae were frequency-but also endothelium-dependent once the rings contractions were reduced in the absence of endothelium. When incubated with guanethidine and phentolamine, the contractions were reduced or abolished, however, in the presence of TTX, there was no significant difference in aortae contraction. Immunohistochemistry analyses has revealed that the expression of TH was exclusive to the endothelium of the snake's aorta and the S100 protein expression was not observed. Likewise, the endothelium of human paraganglioma tissue only expressed TH, while neoplastic cells expressed both TH and S100 in neoplastic

cells. Our results suggest that, the contraction stimulated by EFS in aortic rings from rattlesnake and jararaca, is mediated by release of catecholamine from the without involvement of sympathetic nerves. We also demonstrate the expression of TH in the human endothelium, suggesting a catecholamine synthesis function in this tissue.

Keywords: Catecholamines, nitric oxide, aorta, reptiles, endothelium.

LISTA DE REAGENTES E FORNECEDORES

Acetilcolina, Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)

Guanetidina, Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)

Fentolamina, Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)

Nitroprussiato de sódio, Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)

Tetrodotoxina, Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)

Novo link kit, Novocastra/Leica Biosystems (Newcastle, Inglaterra, Reino Unido)

Anticorpo coelho anti-TH, Abcam (Cambridge, MA, EUA)

Anticorpo galinha anti-TH, Abcam (Cambridge, MA, EUA)

Anticorpo cabra anti-galinha IgG, Abcam (Cambridge, MA, EUA)

Anticorpo coelho anti-cabra IgG, Abcam (Cambridge, MA, EUA)

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Biossíntese de catecolaminas por neurônios pré-ganglionares na vasculatura.	20
Figura 02. Ação da noradrenalina no sistema vascular.....	21
Figura 03. Principais fatores de contração derivadas do endotélio e seus respectivos receptores.	24
Figura 04. Classificação dos amniotas conforme as fenestrações temporais cranianas.	27
Figura 05. Linha do tempo e filogenia dos amniotos.....	28
Figura 06. Linha do tempo e filogenia das serpentes.	30
Figura 07. Filograma das relações filogenética dos mamíferos.	31
Figura 08. Linha do tempo e filogenia dos primatas.	33
Figura 09. Ilustração da leitura com uso do kit Novolink™.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC, adenil ciclase
AMPc, monofosfato cíclico de adenosina
Ang I, angiotensina I
Ang II, angiotensina II
ATP, adenosina trifosfato
BH4, tetraidrobiopterina
Cl⁻, cloreto
COMT, catecol o-metiltransferase
DAC, diacilglicerol
DBH, dopamina β-hidroxilase
DDC, dopa descarboxilase
Dopa, dihidroxifenilalanina
ECA, enzima conversora de angiotensina
eNOS, óxido nítrico sintase endotelial
ET-1, endotelina-1
FAD, dinucleótido de flavina e adenina
FNMT, feniletanolamina n-metiltransferase
GMPc, monofosfato cíclico de guanosina
Hz, hertz
M.a., milhões de anos
MAO, Monoamina oxidase
Na⁺, sódio
NET, transportador de noradrenalina
NO, óxido nítrico
NOR, noradrenalina
O₂⁻, ânion superóxido
ONOO⁻, peroxinitrito
PDG2, prostaglandina D2
PGE2, prostaglandina E2
PGF2, prostaglandina F2

PGI₂, prostaciclina

PLA C, fosfolipase C

IP₃, inositol trifosfato

SNP, nitroprussiato de sódio

Tir, Tirosina

TH, Tirosina Hidroxilase

TP, receptores prostanoides e tromboxano

TXA₂, tromboxano A₂

VMAT, transportador de monoamina vesicular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Aspectos gerais das catecolaminas.....	19
1.1.1 Biossíntese de Catecolaminas.....	19
1.1.2 Armazenamento e metabolismo das catecolaminas.....	20
1.1.3 Vias alternativas de síntese de catecolaminas	22
1.2 Endotélio.....	23
1.3 A importância dos estudos comparativos.....	25
1.4 Dos répteis aos humanos	26
1.4.1 Evolução dos répteis.....	28
1.4.2 Evolução dos mamíferos	30
1.5 Sistema vascular em diferentes espécies.....	34
1.6 Justificativa e Relevância.....	37
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Animais de experimentação.....	40
3.2 Tecido de paraganglioma humano.....	40
3.3 Preparação das aortas de cobras	40
3.3.1 Análise funcional.....	41
3.4 Imuno-histoquímica.....	42
3.5 Análise de dados	44

4. RESULTADO.....	45
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das catecolaminas

Catecolaminas possuem funções de neurotransmissores e/ou hormônios presentes tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico. Elas possuem uma gama de atividades, podendo exercer diferentes funções dependendo do órgão-alvo e dos receptores disponíveis [1].

Originalmente propostas como responsáveis pelos mecanismos de “fuga e luta”, elas podem ativar processos fisiológicos e comportamentais a fim de facilitar a superação ao estresse [2], entretanto, também regulam a atividade de determinados tecidos em situações não emergenciais dissertadas a seguir.

Tal classe de mensageiros é composta pela dopamina (DA), noradrenalina (NOR, também conhecida como norepinefrina) e adrenalina (ADR, também chamada de epinefrina).

1.1.1 *Biossíntese de Catecolaminas*

Dopamina, noradrenalina e adrenalina são estruturas moleculares ativas que agem como neurotransmissores e hormônios, sendo essencial para a homeostase do sistema nervoso autônomo. Também conhecidas como catecolaminas, essas moléculas são quimicamente compostas pela junção de um Catecol (anel benzênico e duas hidroxilas) e uma amina (NH₂) [3,4].

Na via clássica o processo de biossíntese de catecolaminas é regulado através de níveis plasmáticos do aminoácido tirosina (Tir), é hidroxilada pela tirosina hidroxilase (TH) com o co-fator tetrahidrobiopterina (BH₄) em dihidroxifenilalanina (dopa). Após esse processo, a dopa descarboxilase (DDC), na presença de vitamina B6, age na dopa formando assim dopamina. A dopamina por sua vez pode ser liberada para corrente sanguínea ou estocadas nas vesículas sinápticas; ainda, nas vesículas sinápticas, podem ser

hidroxiladas em noradrenalina (NOR) pela dopamina β -hidroxilase (DBH) juntamente com a vitamina C como co-fator [1,5] (Figura 1).

Todo o processo de biossíntese de catecolaminas ocorre classicamente em nervos adrenérgicos e na medula adrenal, entretanto na medula adrenal, a NOR pode ainda ser metilada pela feniletanolamina n-metiltransferase (FNMT), usando como co-fator S-adenosilmetionina, e armazenadas nas vesículas de cromafim [5].

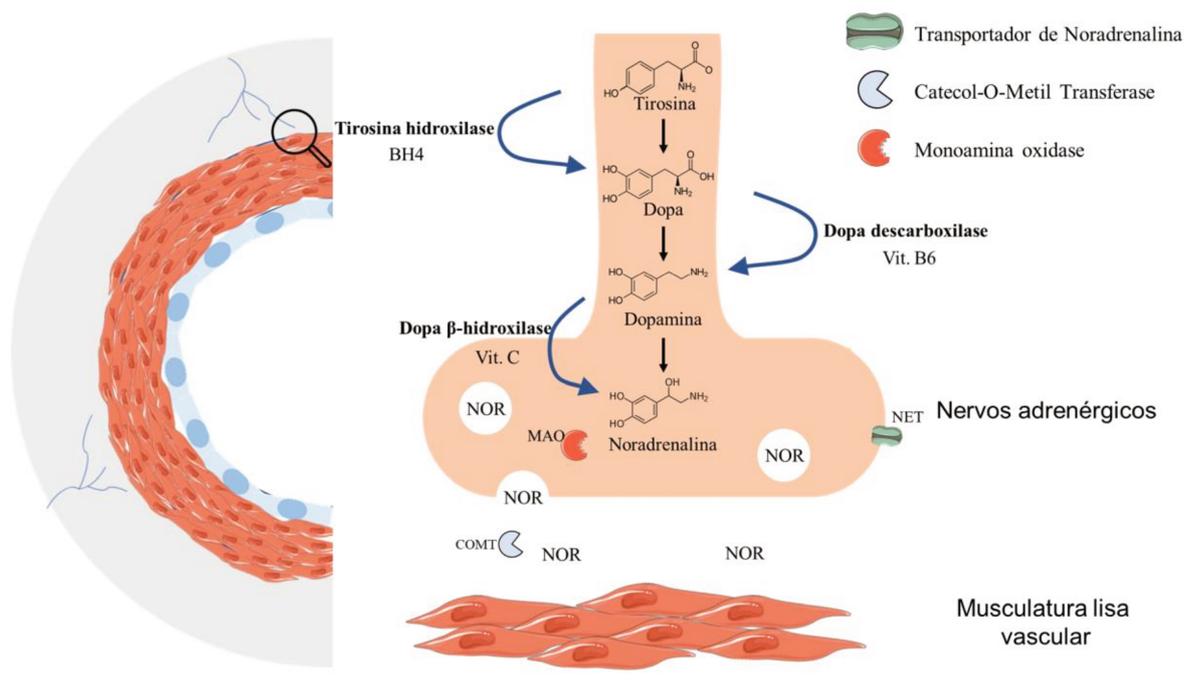


Figura 01. Biossíntese de catecolaminas por neurônios pós-ganglionares na vasculatura. Tir = tirosina; DA= dopamina; NOR= noradrenalina; COMT= Catecol O-Metiltransferase; MAO= monoamino oxidases. **Créditos ao autor.**

1.1.2 Armazenamento e metabolismo das catecolaminas

A neurotransmissão mediada por NOR ocorre pela despolarização do neurônio simpático pós-ganglionar. Esse processo se inicia pela abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem neuronais resultando em potenciais de ação nervosos que são conduzidos ao longo do axônio [4]. Quando tal

despolarização atinge o terminal nervoso, ocorre a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e, conseqüentemente, o influxo de cálcio para o citosol culminando na fusão das vesículas com a membrana plasmática pré-sináptica (exocitose) e liberação de NOR, estocadas nas vesículas sinápticas, para fenda sináptica[4]. Na fenda sináptica a NOR pode se ligar aos seus respectivos receptores dependendo do órgão efector, na musculatura lisa do vaso ilustrado na Figura 2. A NOR pode ainda ser metabolizada pela enzima Catecol O-metiltransferase (COMT), que age catalisando a transferência do grupo metil da s-adenosilmetionina para hidroxila do grupamento catecol [3].

Na membrana pré-sináptica do neurônio noradrenérgicos há ainda a presença do transportador de noradrenalina (NET), que regula os níveis de noradrenalina na fenda sináptica. O NET atua como um transportador dependente de Na^+/Cl^- que permite a entrada dos neurotransmissores direcionada pela energia eletroquímica do gradiente intracelular de Na^+ . Já no citosol do neurônio, as catecolaminas podem também ser desaminadas e oxidadas pela Monoamina oxidase (MAO), utilizando como co-fator dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) [3].

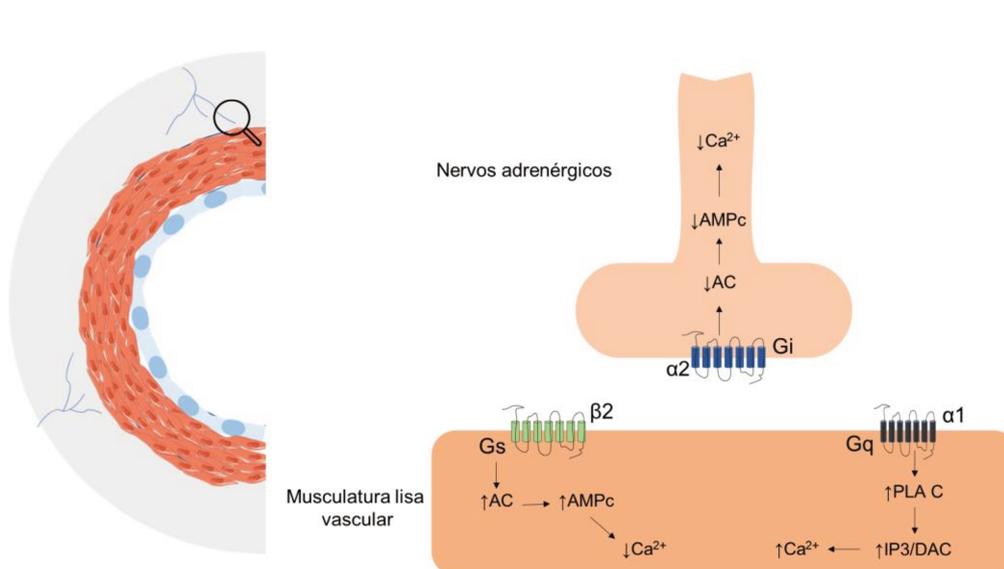


Figura 02. Ação da noradrenalina no sistema vascular. Os receptores adrenérgicos $\alpha 2$ (alfa 2) – são acoplados à proteína G_i que sua ativação está relacionada pela inibição da adenil ciclase (AC), conseqüentemente, diminuindo os níveis de AMPc e cálcio intra-neural, resultando na inibição de liberação de NOR pelas vesículas neurais. A ativação dos receptores $\alpha 1$ (alfa 1) está relacionado com ativação da fosfolipase C (PLA C), produzindo, inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAC), aumentando níveis de cálcio no citosol da musculatura lisa, resultando na vasoconstrição. Já os receptores $\beta 2$ (beta 2), são acoplados à proteína G_s , que sua ativação da adenilato ciclase, causando aumento de AMPc (3´-5´ monofosfato de

adenosina), conseqüentemente diminuindo os níveis de cálcio e causando relaxamento vascular. **Créditos ao autor.**

O estoque de catecolaminas pelas vesículas é influenciado principalmente pela concentração desses neurotransmissores no citosol e força eletroquímica do meio externo para interno da vesícula [6]. A translocação de catecolaminas do citosol para vesícula se dá pelos transportadores vesiculares de monoamina (VMAT), sendo o tipo 2 (VMAT2) predominante no nervo simpático; esse transporte tem a característica de ser dependente de Na⁺ e usar como gradiente de força H⁺ e ATP [3].

1.1.3 Vias alternativas de síntese de catecolaminas

Além da via clássica neuronal anteriormente descrita, a síntese e liberação de catecolaminas foram também reportadas em outros tecidos.

Diversos trabalhos mostraram a expressão de TH, DBH e FNMT no coração durante embriogênese, anteriormente da formação de nervos no interior e em torno do coração, sendo um estágio essencial no desenvolvimento cardíaco [7–10]. Em um estudo onde os ratos foram desnervados quimicamente, foi reportado que em ventrículo de rato há síntese de adrenalina e noradrenalina basalmente, entretanto, após indução de estresse por imobilização dos animais, os níveis de adrenalina dobraram, como também a enzima responsável pela síntese de adrenalina, FNMT [11].

Em adipócitos de artéria mesentérica de rato foi descrita a produção basal de noradrenalina e adrenalina [12] e em situação de estresse, como, exposição ao frio agudo (3 hrs) apresentou aumento na síntese e liberação de adrenalina e ao frio crônico (7 e 28 dias) de noradrenalina [13]. Em outra situação de estresse, a imobilização, foi observado aumento de ambas catecolaminas e na expressão de TH e FNMT estimulada pela imobilização do animal [13,14].

No sistema imune, catecolaminas são descritas como importantes substâncias que desempenham funções essenciais na modulação de citocinas e produção de anticorpos [15]. Em relação a produção de catecolaminas no sistema imune, foi descrito que há a síntese basal de catecolamina em

linfócitos, porém, depende do tipo celular, em células T há maior produção de dopamina enquanto nas células B há maior síntese e liberação de noradrenalina e adrenalina [6].

1.2 Endotélio

O endotélio foi descrito por anos apenas como uma barreira entre a corrente sanguínea e a musculatura lisa vascular [16,17]. No início dos anos 80, experimentos funcionais de aorta de coelhos demonstraram pela primeira vez o efeito relaxante do endotélio, foi demonstrado que o relaxamento da musculatura lisa vascular induzido por acetilcolina depende do endotélio e que, a produção de uma substância até então desconhecida e assim nomeada como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), possui uma importante função na relação endotélio-relaxamento [18]. Após a publicação deste trabalho, as células endoteliais se tornaram o maior alvo de estudos vasculares. Alguns anos depois, o EDRF foi identificado como óxido nítrico [19] e então, endotélio e óxido nítrico se tornaram objetos de estudo de diversos grupos, que os abordavam aspectos fisiológicos e patológicos, como agregação plaquetária [20,21], inflamação [22], sepsis [23,24] e outros.

Ainda no início dos anos 80, De Mey e Vanhoutte [25,26] mostraram pela primeira vez que, além de papel no relaxamento, o endotélio tinha uma função papel importante na contração vascular. Com esses estudos, o papel do endotélio na resposta contrátil vascular foi intensamente estudado e fatores de contração derivadas do endotélio como os peptídeos vasoconstrictores (angiotensina II, endothelina-1) e ânion superóxido, e liberação de metabólitos contráteis do ácido araquidônico (Figura 3) [27–29].

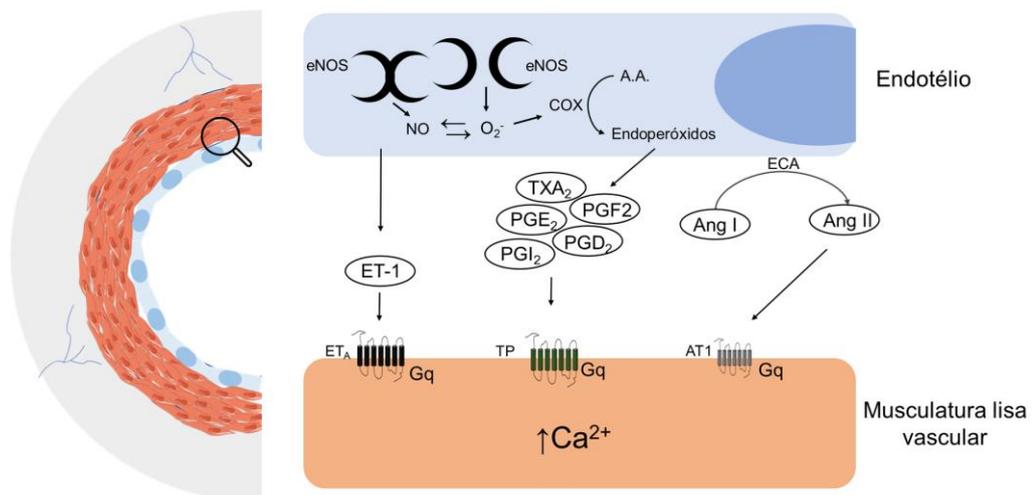


Figura 03. Principais fatores de contração derivadas do endotélio e seus respectivos receptores. A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em sua forma acoplada sintetiza óxido nítrico (NO), porém, principalmente em estados patológicos, ocorre seu desacoplamento e a geração de ânion superóxido (O_2^-) que ao reagir com o NO, gerar outra espécie reativa (peroxinitrito; $ONOO^-$) e consequentemente diminui a disponibilidade de NO, assim diminui o relaxamento basal. O aumento de O_2^- também estimula a produção de COX (produto da formação de endoperóxidos) que, por sua vez, sofre ação de enzimas (isomerase ou sintase) formando o tromboxano A2 (TXA₂) e as prostaglandinas E2 (PGE₂), D2 (PGD₂), F2 (PGF₂) e I2 (PGI₂); esses ativam os receptores de tromboxano (TP) e os prostanoídeos, são receptores acoplados à proteína Gq e consequentemente leva à contração vascular mediada pelo aumento de cálcio no citosol. Na membrana endotelial também há expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela conversão da angiotensina 1 (Ang 1) em angiotensina 2 (Ang 2) que, por sua vez, ativa receptores AT1 na musculatura lisa. A endotelina-1 (ET-1), potente substância vasoconstrictora sintetizada pelo endotélio, causa contração vascular ao ativar receptores ET_A (receptor acoplado à proteína Gq) na musculatura lisa. **Créditos ao autor.**

Além da função de contração, as catecolaminas desempenham papel importante no relaxamento de forma endotélio dependente por ativação de receptores β_2 adrenérgicos pela estimulação de eNOS [30]. Já na regulação de angiogênese no endotélio, as catecolaminas tem efeitos distintos, sendo ativação de receptores β_2 adrenérgicos tendo efeito de angiogênese, principalmente pela ativação de PKA, estimulando assim, o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFr2) [31], enquanto, a ativação de receptor D2, tem ação antiangiogênica, por inibição da PKA, induzindo a endocitose do VEGFr2 [32].

1.3 A importância dos estudos comparativos

Desde Charles Darwin, estudos comparativos de espécies e populações tem sido os mais comuns e produtivos meios de elucidar os processos evolutivos [33,34]. Dentre os métodos comparativos, a fisiologia comparada fornece conhecimentos fundamentais sobre os processos fisiológicos e funcionais dos diversos grupos de animais, assim como a análise das adaptações que levaram esses sistemas orgânicos a sobreviverem e prosperarem em ambientes tão heterogêneos. Em outras palavras, a fisiologia comparada buscando descobrir relações fundamentais entre os organismos com cunho evolutivo e adaptativo [34].

Em conjunto com outras áreas das ciências (como a biologia molecular, bioquímica e farmacologia) e adotando inúmeras estratégias, tais estudos permitem rastrear a evolução dos organismos e suas estruturas únicas gerando informações sobre a forma com que grupos de organismos resolveram seus problemas adaptativos e sobre como uma determinada estrutura em diferentes organismos resolvem o mesmo problema de homeostase. Portanto, a fisiologia comparada tem como essência nos lembrar continuamente que todas as funções fisiológicas são produtos da evolução, logo, esses caracteres não são estáveis ao longo do tempo e estão continuamente suscetíveis a modificações [35].

Nas ciências básicas, é comum se compartilhar do conceito do “Princípio de Krogh”, que afirma que para cada processo biológico existe uma espécie animal adequada para seu estudo; esse conceito levou a ampliação dos estudos em diferentes espécies afim de se elucidar as funções fisiológicas conservadas e divergentes ao longo da evolução [36].

Nas ciências médicas, é emergente o campo da medicina evolucionária (também conhecida como medicina Darwiniana), que aplica os conhecimentos de evolução para investigar a fisiologia e patologia humana de uma forma mais ampla; tal campo pretende não apenas estudar a etiologia das doenças, mas também a origem biológica inicial dessas condições patológicas [37], uma vez que os processos fisiológicos foram modelados a partir de seleções naturais e

sexuais, consanguinidade, mutações, fluxo gênico, entre outros fatores evolutivos [38].

De modo geral, as espécies envolvidas em estudos comparativos são selecionadas a partir de um número de motivos que incluem conveniência (disponibilidade da espécie ou a existência de uma literatura a ser utilizada como base), a posse de um traço biológico de interesse, a adaptação a um ambiente extremo ou características que o façam interessantes para o estudo de um determinado processo biológico [39,40].

1.4 Dos répteis aos humanos

Os amniotas se classificam como todos os animais vertebrados tetrápodes cujos embriões são envoltos por uma membrana amniótica formando uma cavidade preenchida por fluidos. Incluem-se nesse grupo os mamíferos, répteis e as aves atuais que hoje correspondem a mais de 23 mil espécies “não extintas” descritas [41]. Embora os resultados filogenéticos ainda são conflitantes e as datações variáveis (especialmente após revelações que ocorreram com o advento dos estudos moleculares), é virtualmente aceito que a partir do amniota inicial surgiram i) os sinápsidas (atuais mamíferos) e ii) os saurópsidas, que incluem os diápsidos (atuais tuatara, lagartos, cobras, crocodilos, incluindo aves) e anápsidos (atuais tartarugas, cágados e jabutis), diferenciados conforme o número de aberturas no crânio [41] (Figura 04).

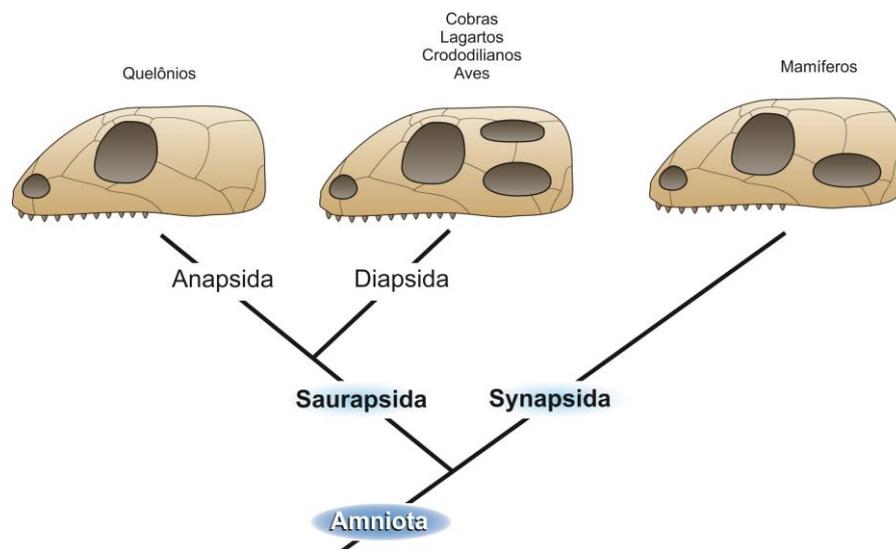


Figura 04. Classificação dos amniotas conforme as fenestrações temporais cranianas. Note que as cavidades nasais e orbitais são comuns a todos os grupos, entretanto, anápsidos não possuem fenestra temporal. Por outro lado, sinápsidos possuem uma fenestra temporal enquanto diápsidos possuem duas fenestras. Ilustração baseada em Martin (2002) [42]. **Créditos a Collaço, R.C.**

O ancestral comum amniota data o período carbonífero a 350 a 300 M.a. (representado pelo número 1, Figura 05). Seu surgimento é precedido por sua dicotomia em sinápsidas (mamíferos) e o ancestral comum dos saurópsidas (representado pelo número 2, Figura 05) entre o final do período Carbonífero e o Permiano médio (330 - 275 M.a.) [41,43].

Os saurópsidas por sua vez se divergiram inicialmente no ancestral comum dos Lepidossauros (tuatara, lagartos e cobras) e no ancestral dos archossauros (crocodilos e aves) e testudines (tartarugas). Por um lado, o ancestral dos Lepidossauros (representado pelo número 3, Figura 05) se divergiu em Squamatos (lagartos e cobras) e Nodontideos (tuatara) a 300 - 256 M.a., ainda no período permiano. Por outro lado ocorreu a origem das tartarugas no início do Triássico a 265 - 231 M.a. (representado pelo número 4, Figura 05), assim como a divergência da divisão ave-crocodilos aos 245 - 219 M.a. no final do triássico (representado pelo número 5, Figura 05) [41,43].

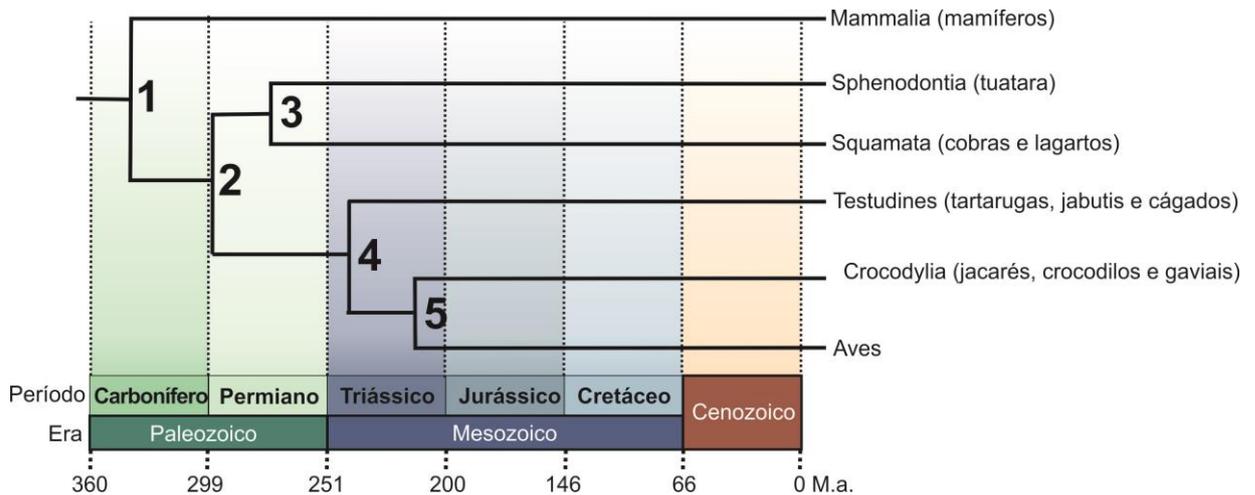


Figura 05. Linha do tempo e filogenia dos amniotos. Amniotos iniciais (número 1) foram divergidos em: um grupo que chegaram aos mamíferos atuais com o passar dos milhões de anos de evolução, e um segundo grupo (número 2) que deu origem aos répteis e aves atuais. Esse segundo grupo por sua vez se divergiu entre i) o ancestral comum das tuataras, cobras e lagartos atuais (número 3) e ii) do ancestral comum (número 4) de quelônios atuais (Testudines) e do número 5, ancestral comum de aves e crocodilianos atuais (Crocodylia). M.a.: Milhões de anos atrás. **Créditos a Collaço, R.C.**

1.4.1 Evolução dos répteis

A cerca de 330 a 275 M.a. houve o registro do ancestral comum entre mamíferos e Saurópsidas. Esse último grupo se divergiu entre os Lepidosauros (tuatara e os membros da ordem Squamata a compreender lagartos e cobras) a aproximadamente 269 M.a., e o grupo que originaria os Archosauros (crocodilos e aves) e Testudines (tartarugas) [41,43,44]; embora a posição filogenética das tartarugas dentre os amniotos e a datação dos seus ancestrais permanecem em constante discussão, estima-se que os ancestrais das maiores linhagens de tartarugas existentes, ou seja, as subordens Pleurodira (cuja retração do pescoço para dentro do casco é lateral) e Cryptodira (cuja retração da cabeça acompanha a linha da coluna vertebral e permite que o pescoço se abrigue no interior do casco), datam de 207 a 104 M.a.[43].

Répteis escamados (ordem Squamata) se separaram dos Nodontideos (atual tuatara) em algum momento entre o Permiano e o Triássico [41,43,44], sendo que o seu fóssil mais antigo encontrado data 257 M.a. [44]. Essa longa história evolutiva os tornaram o grupo mais diversificado dentre os répteis

modernos: inclui mais de 10 mil espécies descritas [45] distribuídas entre as subordens Ophidia (cobras) e Lacertilia (lagartos e anfisbenas).

Acredita-se que os ofídios surgiram a pelo menos 120 M.a. durante o período Cretáceo [46] e, dentre os grupos mais antigos, encontram-se diversas famílias das popularmente conhecidas como “cobras-cegas” como Leptotyphlopidae, Gerrhopilidae e Typhlopidae, cujos ancestrais datam 120 a 107 M.a. Porém, crê-se que o maior desenvolvimento evolutivo das cobras foi no período Cenozóico, após a última extinção em massa conhecida como a extinção do Cretáceo-Paleogeno (K-Pg), que ocorreu entre 66 e 65 M.a.

Grandes cobras constritoras se divergiram dos demais grupos (como cobras peçonhentas e colubrídeos) a 87 a 86 M.a., entretanto, Pítons (família Pythonidae) datam apenas entre 36 e 33 M.a. enquanto as Boas (famílias Boinae e Erycinae) datam entre 54 - 40 M.a. [46,47]. Paralelamente às grandes cobras constritoras não venenosas, a história evolutiva dos demais grupos prosseguiu, de forma originar as cobras peçonhentas, as cobras venenosas e demais colubrídeos hoje conhecidos.

De forma condensada, viperídeos se divergiram dos demais grupos entre 62 - 56 M.a., entretanto, o aparecimento dos crotalíneos (família Crotalinae) como *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* data 38 - 37 M.a. Em paralelo, anos de evolução e diversas divergências seguiram e outros importantes grupos de serpentes emergiam como é o caso dos i) elapídeos (família Elapidae) como as *Naja* sp. e as *Micrurus* sp. (últimas sendo popularmente conhecidas como cobras-corais) que datam 45 - 38 M.a; e dos ii) colubríneos (Família Colubrinae) como a *Spilotes* sp., (caninana), e a *Pantherophis* sp. (cobras do milharal) que datam 44 - 41 M.a. [46–48] (Figura 06).

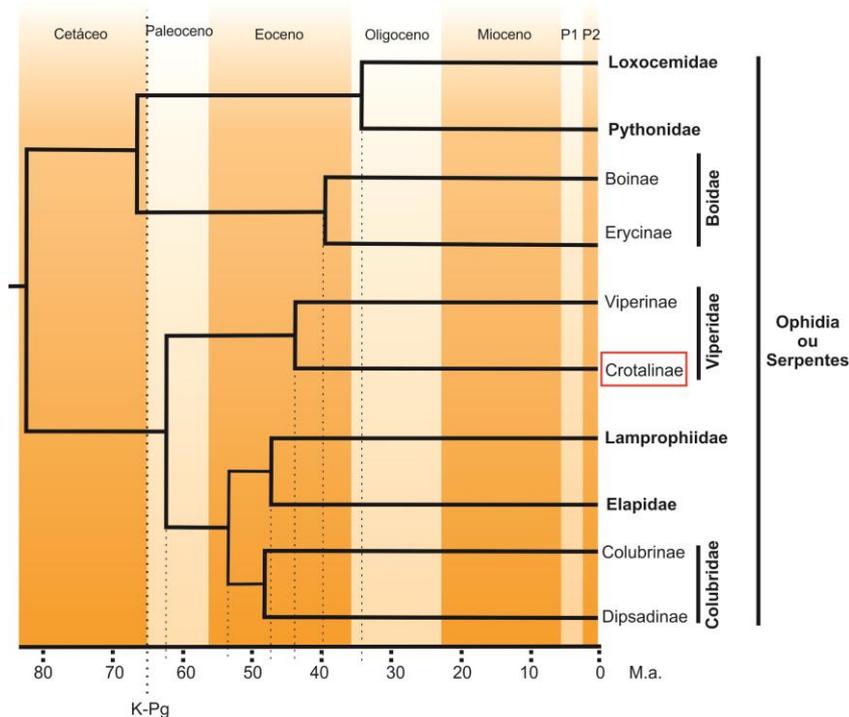


Figura 06. Linha do tempo e filogenia das serpentes. Embora o ancestral fóssil mais antigo encontrado data 120 milhões de anos atrás (M.a.), o maior desenvolvimento evolutivo desse grupo foi após extinção Cretáceo-Paleogeno (K-Pg). Estima-se que a família das pítons (Phytonidae) surgiu a ~33 M.a., enquanto das boas (Boidae) a ~45 M.a., divergindo em boas verdadeiras (Boinae) e boas de ambientes arenosos do mundo velho (Erycinae) a ~40 M.a.; por outro lado, acredita-se que viperídeos (família Viperidae) surgiram a ~42 M.a. enquanto os crotalíneos (Crotalinae, destacada em vermelho, de onde pertencem as espécies utilizadas neste trabalho) surgiram a 37 M.a.; já as famílias Lamprophiidae, Elapidae e Colubridae datam ~48, ~44 e ~49 M.a., respectivamente. Ilustração baseada em Zheng e Wiens (2016)[47], Harrington e Reeder (2017)[46] e Uetz (2020b)[48]. P1: Pleistoceno; P2: Plioceno. **Créditos a Collaço, R.C.**

1.4.2 Evolução dos mamíferos

Mamíferos ocupam uma diversidade de nichos ecológicos e apresentam uma imensa diversidade fenotípica e adaptações ecológicas. Atualmente, as aproximadamente 6400 espécies de mamíferos “não extintos” descritas estão divididas em 2 subclasses: i) Prototheria, que abrange ornitorrincos e equidnias (mamíferos que botam ovos) e abriga apenas a ordem Monotremata; e ii) Theria, que inclui as infraclasses Marsupialia (marsupiais) e Placentalia (mamíferos placentários) [49].

Muitas outras questões acerca da história evolutiva dos mamíferos permanecem rodeadas de constante debates [50], especialmente quando se refere às divergências nas datas para o surgimento dos grupos, ou ainda se a

evolução dos mamíferos teve início antes ou apenas após a extinção do Cretáceo-Paleogeno (K-Pg) [51]. Entretanto, existe um nível de concordância maior em questões relacionadas as relações filogenéticas entre as famílias (Figura 07).

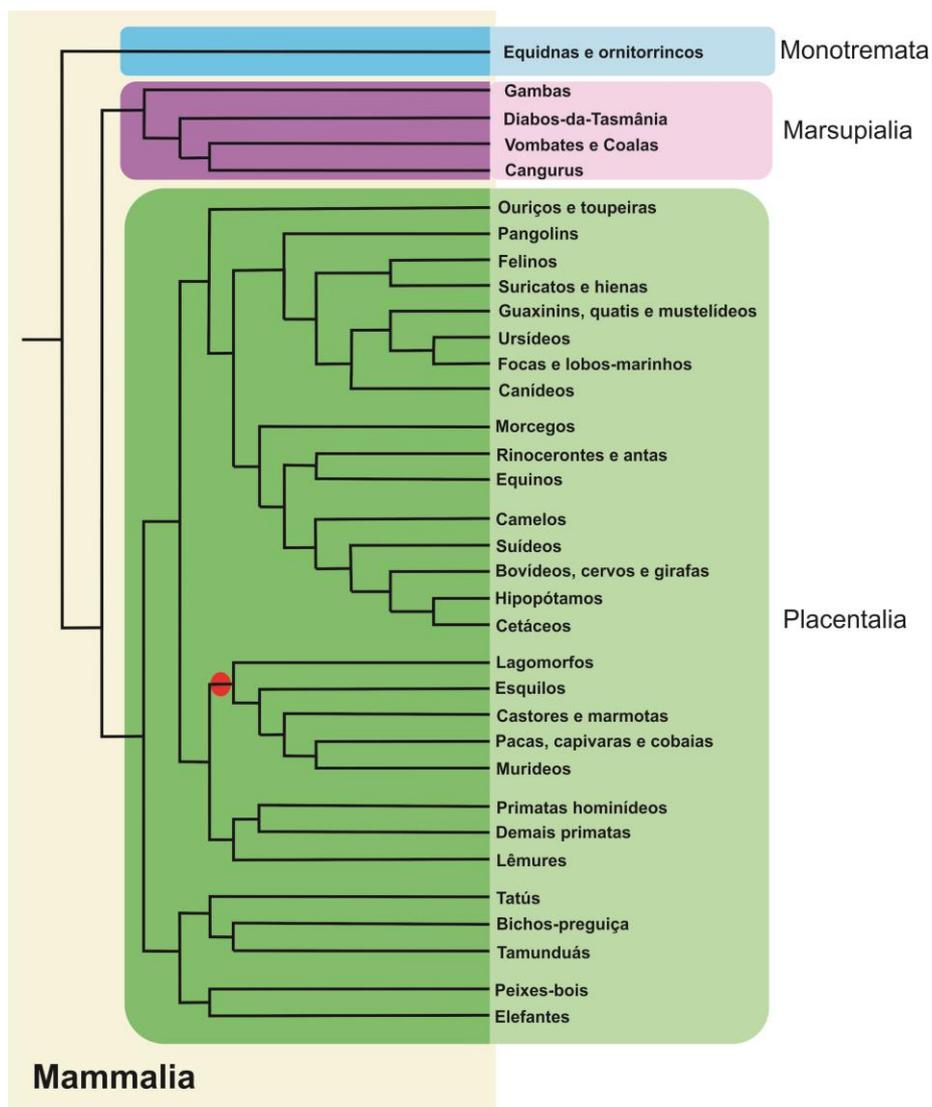


Figura 07. Filograma das relações filogenéticas dos mamíferos. A classe Mammalia se divide nas subclasses Prototheria (cuja única ordem viva é a Monotremata), e Theria, que inclui as infraclasses Marsupialia e Placentalia. Esta imagem foi baseada Meredith et al. (2011)[52] e O’Leary et al. (2013)[53] e as posições filogenéticas estão em concordância nos dois trabalhos, exceto pelo clado Glires (indicado com círculo vermelho ●) que neste caso, foi adotada a relação mais recente reportada. Note: esta árvore não se encontra em escala de tempo. **Créditos a Collaço, R.C.**

Mamíferos sempre foram alvo de grande interesse tanto por sua ampla diversidade biológica e sucesso evolutivo, mas também por fazermos parte de tal grupo. A taxonomia dos primatas já foi fruto de diversas revisões, entretanto, estudos sugerem que gêneros de primatas “não extintos” se originaram de um ancestral comum que data aproximadamente entre 93 -70 M.a. [54,55].

Acredita-se que expansão dos primatas ocorreu durante o Eoceno (segunda época da era Cenozóica) resultando nas principais linhagens existentes a compreender i) subordem Strepsirrhini, que inclui as infra-ordens Lorisiformes (dos galagos e loris), Chiromyiformes (o aie-aies) e os Lemuriformes (lêmures), ii) os Tarsiiformes (inclui os tásios) e iii) os Simiiformes, composto pelas infra-ordens Platyrrhini (que inclui os primatas do “Novo mundo” como saguis, micos, bugios e macacos-aranha), e Catarrhini que corresponde as famílias Cercopithecoidea (primatas do “Velho mundo” como babuínos e mandris) e Hominoidea (gibões, orangotangos, gorilas, chimpanzés, bonobos e humanos) [55].

Em relação aos primatas simiiformes, estudos apontam que Platyrrhini e Catarrhini se divergiram a aproximadamente 46-42 M.a. Já dentro da Catarrhini, os primatas do “velho” mundo se divergiram dos hominoides a 32-31 M.a. Hominídeos por sua vez, se separaram de orangotangos entre 18e 15 M.a. e posteriormente divergiram em i) gorilas (~9-8 M.a.) e ii) humanos e chimpanzés (~7-6 M.a.) [54–56] (Figura 08).

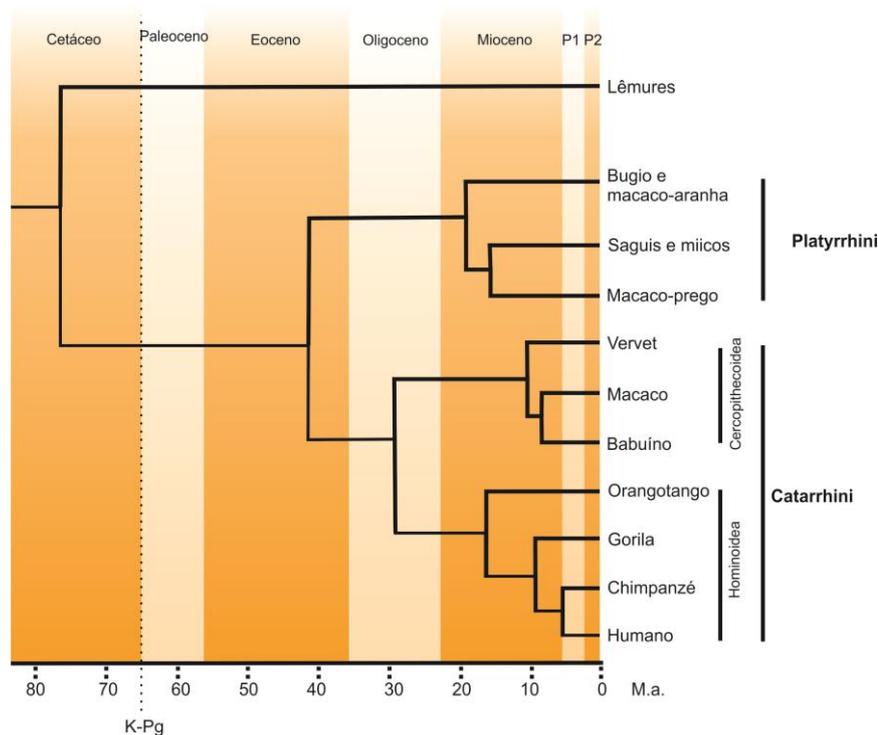


Figura 08. Linha do tempo e filogenia dos primatas. Alguns estudos sugerem que o primeiro ancestral comum dos primatas surgiu antes da extinção Cretáceo-Paleogeno (K-Pg), e este se divergiu inicialmente em na subordem Strepsirrhini (Lêmures) e posteriormente nos Tarsiiformes (não mostrado na ilustração). Na sequência houve o aparecimento dos Simiiformes, com a divergência de Platyrrhini e Catarrhini a ~44 Milhões de anos atrás (M.a.). É importante notar que o ancestral comum da tribo Hominini, que inclui humanos (*Homo* sp.), chimpanzês e bonobos (*Pan* sp.). Ilustração baseada em Steiper e Young (2006)[54] e Finstermeier et al. (2013)[56]. P1: Pleistoceno; P2: Plioceno. **Créditos a Collaço, R.C.**

Quanto ao surgimento e disseminação global dos *Homo sapiens* em si, uma das espécies utilizadas nesse estudo, a maioria dos especialistas concordam que os *Homo sapiens* (*H. Sapiens*) evoluíram exclusivamente na África e se espalharam ao longo da Eurasia [57]. Porém, o local e época exata para essa emergência permanece discordante: não se sabe ao certo se a morfologia atual dos *H. sapiens* evoluiu rapidamente ao longo dos últimos 200 mil anos a partir dos primeiros espécimes de humanos modernos, ou se evoluiu gradativamente nos últimos 400 mil anos [58–60].

1.5 Sistema vascular em diferentes espécies

Diversas características cardiovasculares foram avaliadas em diferentes espécies com intuito de comparar os mecanismos fisiológicos e entender as adaptações ocorridas ao longo da história evolutiva que compreende em milhões de anos. Embora répteis e mamíferos tenham divergido de ancestrais comuns (como ilustrado na Fig 5), anos de evolução permitiram que grande parte dos mamíferos se tornassem endotérmicos e, devido ao aumento na demanda do consumo de oxigênio, desenvolvessem sistemas cardiorrespiratório complexos [61].

Como citado acima (ver subitem 1.2) o óxido nítrico (NO) foi descrito pela primeira vez no início dos anos 80 após estudos em aorta de coelho [18]. Porém, embora tenha sido extensamente estudado em mamíferos, alguns trabalhos mostraram a presença da enzima que sintetiza NO (óxido nítrico sintase, NOS) em animais mais antigos, como lagartos [62], tartarugas [63,64], cobras peçonhentas [65,66] e peixe [67]. Interessantemente, um estudo realizado utilizando a aorta do peixe *Anguilla australis* (Enguia austral) revelou, por análise de imuno-histoquímica, a expressão de óxido nítrico sintase neural (nNOS) entre a musculatura lisa e camada adventícia, entretanto, não há a expressão de eNOS no endotélio, sugerindo que o NO que contribui para manutenção do tônus vascular tem origem neural [68]. Esses dados sugerem que o NO é um mediador presente em animais mais antigos, porém, podem ter ocorridos ganhos e perdas evolutivas em sua via de síntese e/ou mecanismo de ação.

Diferentes respostas estudadas em diversas espécies parecem ser mediadas por agentes contráteis. Em anéis isolados de aorta de *Rana catesbeiana* (anfíbio popularmente conhecido como rã-touro-americana) e *Salmo gairdneri* (peixe conhecido como truta-arco-íris), a histamina não apresentou nenhum efeito contrátil enquanto, ao estimulado com NOR, apenas anéis aórticos de truta não exibiram efeito de contração [69]. Tais resultados diferem dos mamíferos, uma vez que esses agonistas causam considerável contração da musculatura lisa vascular [70].

De forma interessante, foi visto que, em *Pseudemys scripta* (cágado-da-orelha-vermelha), o aumento do tônus parassimpático promove o aumento da resistência pulmonar vascular [71], ao invés de sua diminuição como é visto classicamente em mamíferos [72].

Nosso grupo mostrou anteriormente, em espécie mais recente evolutivamente como a *Crotalus durissus terrificus* (cobra peçonhenta popularmente conhecida como cascavel), a contração do corpo cavernoso induzida por estímulo elétrico de campo é mediada por catecolaminas de origem não-neural e parece ter envolvimento de canais de sódio dependentes de voltagem resistentes à tetrodotoxina (TTX; um bloqueador de certos tipos de canais de sódio dependente de voltagem); essa característica não é vista em mamíferos pois a TTX abole a contração do corpo cavernoso induzida por estímulo elétrico de campo [75].

Já em espécies mais antigas evolutivamente como *Chelonoidis carbonaria* (tartaruga conhecida popularmente como jabuti-piranga), a contração induzida por estímulo elétrico de campo de aorta é dependente de fator adrenérgico, porém, tais catecolaminas não são de origem neural e sim originadas do endotélio vascular [73]. Similar resultados foram obtidos em aorta de *Pantherophis guttatus* (colubrídeo constritor conhecido como cobra-do-milharal): a fonte de catecolaminas responsáveis pela contração vascular induzida por estímulo elétrico de campo é exclusivamente endotelial [74]. Esses resultados mostram que, em espécies mais antigas, o endotélio tem capacidade de liberar catecolaminas e tem papel fundamental no tônus vascular.

Cobras peçonhentas são poucos milhões anos mais recentes evolutivamente que os colubrídeos (como a cobra-do-milharal) e boas brasileiras (como a *Boa constrictor*, popularmente conhecida como jibóia), ambos de hábitos constritores [75], porém, todos esses grupos evoluíram de forma paralela e independente, uma vez que dividiram o mesmo ancestral comum a muitos milhões de anos atrás.

Levando em consideração i) os dados acerca da produção endotelial de catecolaminas em espécies mais antigas evolutivamente, ii) a inexistência de trabalhos demonstrando o mecanismo contrátil induzido por estímulo de campo elétrico e função endotelial na produção de catecolaminas em leitos vasculares

de animais mais recentes evolutivamente, e iii) a importância de estudos comparativos em animais com história evolutiva distinta, esse trabalho foi realizado envolvendo duas cobras peçonhentas brasileiras a compreender *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) e *Bothrops jararaca* (jararaca) como modelo experimental. Além disso, iniciou-se aqui a abertura um novo capítulo no estudo da origem endotelial das catecolaminas: utilizando tecido de paraganglioma humano e técnicas de imunohistoquímica, verificou-se a existência de evidências que possam sugerir a produção de catecolaminas pelo endotélio de humanos.

1.6 Justificativa e Relevância

Na intenção de se estudar os processos fisiológicos, buscar novos mecanismos, encontrar traços em comum e se abrir um leque para novas terapêuticas, nosso grupo é voltado à investigação da fisiologia e farmacologia cardiovascular e geniturinária por meio de estudos comparativos utilizando diversos grupos de mamíferos e répteis, estando este trabalho incluído neste meio. Embora haja um grande empenho para o estudo da fisiologia vascular em mamíferos, tendo em vista a proximidade aos primatas humanos, trabalhos de fisiologia comparada envolvendo animais não mamíferos são de fundamental importância para elucidar as relações evolutivas entre as espécies, como ganhos e perdas evolutivas.

Acreditamos que a compreensão da fisiologia vascular e papel do endotélio em répteis mais recentes (como é o caso das cobras peçonhentas *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*) ajudará a entender o mecanismo de produção de catecolamina na regulação contrátil. Esse estudo também permitirá a comparação desse mecanismo e de sua funcionalidade entre essas espécies e outras, milhões de anos mais antigas evolutivamente e já estudadas pelo nosso grupo. Além disso, iniciamos um novo capítulo na investigação da produção endotelial de catecolaminas ao expandirmos o estudo para humanos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a contração induzida por estímulo elétrico de campo em anéis de aorta isolados de *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. terrificus*; popularmente conhecida como cascavel) e *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*; conhecida como jararaca). Também buscamos entender o potencial papel do endotélio na produção de catecolamina nas espécies acima citadas e em tecido humano.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a contração induzida por estímulo elétrico de campo, por meio de curva frequência-resposta, de anéis de aorta isolados de *C. d. terrificus* e *B. jararaca*;
- Entender a importância adrenérgica na contração induzida por estímulo elétrico de campo de anéis de aorta isolados das duas espécies estudadas por meio do uso de drogas simpatolíticas;
- Avaliar se há a influência neural na contração induzida por estímulo elétrico de campo através do uso de bloqueador de canais de sódio dependentes de voltagem neuronais e por ensaios de imunohistoquímica (utilizando o marcador neural da proteína S100), nas duas espécies estudadas.
- Investigar o papel do endotélio na contração induzida por estímulo elétrico de campo em anéis de aorta isolados de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*;

- Avaliar a presença da enzima Tirosina Hidroxilase no endotélio das cobras peçonhentas estudadas e no endotélio de tecido humano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizadas *Crotalus durissus terrificus* (cascavéis, pesando entre 400 a 750g) provenientes do serpentário da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP, São José dos Campos, SP) e *Bothrops jararaca* (jararacas, pesando entre 300 a 450g), provenientes do Instituto Butantã (São Paulo, SP). Este trabalho é autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio: 18020–1 e 20988–5) e todos experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA/UNICAMP: 1655-1 e 4722-1).

3.2 Tecido de paraganglioma humano

A peça foi coletada em 2013 da região cervical de uma paciente, mulher, de 41 anos. O tumor foi clinicamente e histologicamente classificado como benigno e medindo 4,5x3,5 cm. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP (Protocolo: 1171/2011).

3.3 Preparação das aortas de cobras

Espécimes de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* foram eutanasiados sob anestesia por isoflurano (atmosfera saturada; via inalatória) seguida por administração de quetamina (70mg/kg; via intracelomática), e posteriormente decapitados. Após a eutanásia, a aorta foi cuidadosamente

dissecada e imediatamente imersa em solução Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; glicose 5,6; pH 7,4), constantemente gaseificada com carbogênio (mistura de 95 % O₂ e 5 % CO₂) e mantida à 27°C. Toda gordura perivascular foi retirada e a aorta foi seccionada em anéis aórticos (3mm); tais anéis foram suspensos verticalmente entre dois brinços sob tensão de 10 mN em banho de órgão composto por cubas de 10mL preenchidas com solução de Krebs-Henseleit, constantemente gaseificada com carbogênio a 27°C.

3.3.1 Análise funcional

Após um período de estabilização dos anéis aórticos no banho de órgão isolado (45 minutos, sendo trocada a solução a cada 15 minutos), a integridade endotelial foi avaliada por meio da adição de fenilefrina (Phe; 1 µM) e, após o platô na contração do tecido, foi adicionada acetilcolina (ACh; 1 µM); foram considerados anéis com endotélio intacto aqueles cujo relaxamento promovido pela ACh foi maior do que 80%.

Em alguns experimentos o endotélio foi retirado mecanicamente com auxílio de uma pinça fina. A ausência do endotélio foi confirmada quando, após contração do tecido por fenilefrina, o relaxamento promovido pela ACh foi inferior a 10%. A viabilidade da musculatura lisa foi confirmada com a adição de nitroprussiato de sódio (SNP; 1 µM) e os tecidos com relaxamento maior que 80% foram considerados viáveis.

Os anéis aórticos com e sem endotélio foram expostos à estimulação elétrica de campo (60 V, 0.5 ms; trens de 30 segundos) em diferentes frequências (4, 8 e 16 Hz) através de estimulador GRASS S88 (Grass Medical Instruments, Quincy, MA, E.U.A.).

Em anéis com endotélio intacto, os estímulos foram realizados na presença e ausência de agentes simpatolíticos, fentolamina (10 µM), bloqueador alfa-adrenérgico, e guanetidina (30 µM), bloqueador da neurotransmissão dos nervos pós-ganglionares. Para inibir a neurotransmissão adrenérgica foi utilizado o bloqueador de canais de sódio dependentes de

voltagem tetrodotoxina (TTX; 1 μ M). Por outro lado, anéis aórticos sem endotélio não foram submetidos a tal tratamento farmacológico.

3.4 Imuno-histoquímica

Após a eutanásia dos animais (tópico 3.3), a aorta e o cérebro de espécimes de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* foram isolados e, após a retirada de todo tecido perivascular e adiposo, foram fixados em formalina 10% por 24 horas em temperatura ambiente para posterior processamento manual. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool [70% \rightarrow 80% \rightarrow 95% \rightarrow 100% (2x)], diafanizadas em banhos de xileno (álcool/xilol, 1:1), clarificadas em Xilol [xilol 100% (2x)] e embebidas em parafina pura aquecida a 60° C. Os blocos de parafina foram seccionados em 4 μ m e os cortes coletados em lâminas de vidro. Os cortes histológicos foram então desparafinizados em xilol seguido por recuperação antigênica com calor úmido em tampão citrato (pH:6.0). As amostras passaram por bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (3%) e de sítios inespecíficos com leite desnatado. Após o bloqueio, os anticorpos específicos para proteína S100 (marcador de tecido neural; diluição 1:200; anticorpo policlonal, Cat#NCL-L-S100p, Leixa Biosystem, Newcastle, Reino Unido) e para tirosina hidroxilase (marcador de produção de catecolamina; diluição 1:1500; anticorpo policlonal, Cat#ab6211, Cat#ab766442, Abcam, Cambridge, MA, E.U.A.) foram incubados por uma hora. Para a detecção da tirosina hidroxilase, foram realizadas duas etapas adicionais, sendo a primeira com o uso do anticorpo secundário de cabra anti-galinha (diluição 1:500; Cat#ab150169, Abcam, Cambridge, MA, E.U.A.) seguida pelo anticorpo terciário de coelho anti-cabra (diluição 1:250; Cat#ab106p, Abcam, Cambridge, MA, E.U.A.), uma vez que para o próximo passo (a leitura pelo kit Novolinktm) é realizado em anticorpo hospedado em coelho ou rato. Foram realizadas reações-controle na ausência de anti-corpo primário (Imagem no anexo do trabalho anexo).

Após a incubação, os anticorpos ligados foram detectados por meio do uso do kit Novolink™ Max Polymer (método de ligação não é descrito pelo fabricante, apenas é especificado que há a ligação do anticorpo IgG de coelho; Leica, Buffalo Grove, IL, E.U.A.). Primeiramente, houve a incubação (40 min em temperatura ambiente) da solução pós anticorpo de coelho que de acordo com o fabricante apresenta, em sua composição, a peroxidase que irá se ligar aos tecidos. Em seguida, ocorreu a incubação da solução cromógena de tetracloreto de diaminobenzidina (DAB; Sigma Aldrich, MO, E.U.A) para definir a atividade peroxidase, gerando um precipitado de cor marrom (Figura 09).

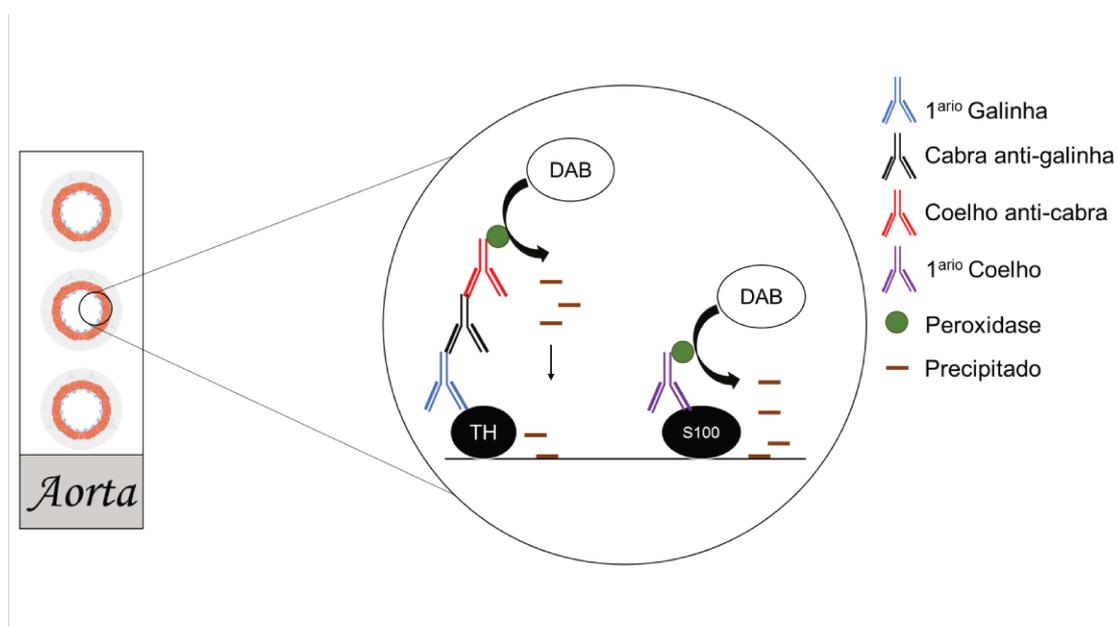


Figura 09. Ilustração da leitura com uso do kit Novolink™; Para análise da expressão de Tirosina Hidroxilase, TH, foi incubado o anticorpo primário (feito em galinha), seguido por anti galinha (feito em cabra) e anti cabra (feito em coelho), seguindo todas as lavagens descrita na do método, e para expressão da proteína S100 foi incubado o anticorpo primário (feito em coelho). Após a incubação dos anticorpos, foi adicionado com solução pós anticorpo de coelho que tem em sua composição uma peroxidase que sua função é oxidar o DAB (diamino benzidina), gerando um precipitado marrom, acusando a positividade da amostra. **Créditos ao autor.**

3.5 Análise de dados

Dados foram expressos em média \pm erro padrão da média do número de experimentos realizados, conforme indicado nas legendas.

Para análise dos efeitos dos agentes simpatolíticos (fentolamina e guanetidina) e do bloqueador de sódio dependente de voltagem (TTX) na contração induzida por estímulo elétrico de campo, foi utilizado o teste *t-Student* pareado, comparando a contração frequência-dependente em situação controle com a curva na presença da droga. Além dos resultados expresso os dados brutos nos resultados, foi realizado também a correção pela contração máxima realizada com a adição de KCl 80mM na seção de anexos. Para comparar o efeito do estímulo elétrico de campo em anéis de aorta com e sem endotélio foi realizado teste *t-Student* não pareado. O valor de $p < 0,05$ foi indica significância.

4. RESULTADOS



RESEARCH ARTICLE

Electrical field-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae are caused by endothelium-derived catecholamine

Rafael Campos^{1*}, Alberto Fernando Oliveira Justo¹, Fabíola Z. Mónica¹, José Carlos Cogo², Ronilson Agnaldo Moreno¹, Valéria Barbosa de Souza¹, Andre Almeida Schenka¹, Gilberto De Nucci^{1,2}

1 Faculty of Medical Sciences- Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, **2** Faculty of Biomedical Engineering, Brazil University, Itaquera, Brazil

* rafaelcampos.vet@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Campos R, Justo AFO, Mónica FZ, Cogo JC, Moreno RA, de Souza VB, et al. (2018) Electrical field-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae are caused by endothelium-derived catecholamine. PLoS ONE 13(9): e0203573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573>

Editor: John Wallace, University of Calgary, CANADA

Received: July 3, 2018

Accepted: August 22, 2018

Published: September 10, 2018

Copyright: © 2018 Campos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2011/11828-4) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq; 140731/2013-0). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Endothelium is the main source of catecholamine release in the electrical-field stimulation (EFS)-induced aortic contractions of the non-venomous snake *Pantherophis guttatus*. However, adrenergic vasomotor control in venomous snakes such as *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* has not yet been investigated. *Crotalus* and *Bothrops* aortic rings were mounted in an organ bath system. EFS-induced aortae contractions were performed in the presence and absence of guanethidine (30 μ M), phentolamine (10 μ M) or tetrodotoxin (1 μ M). Frequency-induced contractions were also performed in aortae with endothelium removed. Immunohistochemical localization of both tyrosine hydroxylase (TH) and S-100 protein in snake aortic rings and brains, as well as in human tissue (paraganglioma tumour) were carried out. EFS (4 to 16 Hz) induced frequency-dependent aortic contractions in both *Crotalus* and *Bothrops*. The EFS-induced contractions were significantly reduced in the presence of either guanethidine or phentolamine in both snakes ($p < 0.05$), whereas tetrodotoxin had no effect in either. Removal of the endothelium abolished the EFS-induced contractions in both snakes aortae ($p < 0.05$). Immunohistochemistry revealed TH localization in endothelium of both snake aortae and human vessels. Nerve fibers were not observed in either snake aortae. In contrast, both TH and S100 protein were observed in snake brains and human tissue. Vascular endothelium is the main source of catecholamine release in EFS-induced contractions in *Crotalus* and *Bothrops* aortae. Human endothelial cells also expressed TH, indicating that endothelium-derived catecholamines possibly occur in mammalian vessels.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Electrical field-induced contractions of isolated aorta of the non-venomous snake *Pantherophis guttatus* is insensitive to the voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin [1], inhibited by adrenergic receptor antagonists and abolished by removal of the endothelium [2]. These findings indicate that the endothelium as the potential source for the catecholamines in response to EFS. Moreover, in *Crotalus durissus terrificus* corpus cavernosum, tyrosine hydroxylase, an enzyme essential for catecholamine synthesis in sympathetic nerve fibers, was only detected in the endothelial cells [3]. In mammalian cells, tyrosine hydroxylase has also been identified in endothelial cells in both bovine aortic endothelial cells and mice superficial femoral arteries [4], indicating that endothelial cells are able to produce catecholamines. In this study, we investigated whether aortae from venomous snakes such as *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* would present similar behaviour following EFS. In addition, the presence of tyrosine hydroxylase was assessed by immunohistochemistry in the endothelium of both snake aortae and mammalian (human) vessels.

Material and methods

Animals

All experimental procedures using *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/UNICAMP: 1655–1 and 4722–1) and were performed in accordance with the Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College for Animal Experimentation.

The use of both *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* were authorized by the Brazilian Institute for Environment (Sisbio: 18020–1 and 20988–5). *Crotalus durissus terrificus* (body weight: 400–750 g) and *Bothrops jararaca* of either sex (body weight: 300–450 g) were provided by the Serpentarium Center for the Study of Nature at the University of Vale do Paraiba (UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brazil) and Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil), respectively.

Human Paranglioma tissue

The protocol was approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP; Protocol Number 1171/2011). For the sake of precision, the paraganglioma used in this study was resected from the cervical region of a 41-year-old woman in 2013, measured 4.5×3.5 cm and was clinically and histologically classified as benign.

Chemical and reagents

Acetylcholine, guanethidine, phentolamine, phenylephrine, sodium nitroprusside and tetrodotoxin were purchased from Sigma Aldrich Chemicals Co. (Missouri, USA). Rabbit anti-S100p was obtained from Novocastra/Leica Biosystems (Newcastle, UK). Rabbit anti-TH, chicken anti-TH, goat anti-chicken gamma immunoglobulin (IgG) and a rabbit anti-goat IgG were purchased from Abcam (Cambridge, USA).

Tissue preparation

The snakes were killed with isoflurane inhalation followed by ketamine (70 mg/kg) administration (intracoelomatic route) and their aortae were removed and immediately placed in Krebs-Henseleit solution at 27°C. Subsequently, aortic rings (3 mm) were obtained and suspended vertically between two metal hooks in 10 mL organ baths containing Krebs-Henseleit

solution: (mM) NaCl (118), KCl (4.7), CaCl₂ (2.5), MgSO₄ (1.2), NaHCO₃ (25), KH₂PO₄ (1.2), glucose (5.6) gassed with a mixture of 95% O₂; 5% CO₂ (pH 7.4) at 27°C.

Functional protocols for *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortic rings

Following the 45 min stabilization period, endothelial integrity was evaluated by assessing acetylcholine (1 μM)-induced relaxation. A relaxation exceeding 80% in a ring pre-contracted with phenylephrine (1 μM) was considered as a signal of endothelial functional integrity. In another set of experiments, the endothelium was removed with the aid of a thin stick. The muscular integrity was assessed by a relaxation induced by sodium nitroprusside (SNP; 1 μM).

Crotalus durissus terrificus and *Bothrops jararaca* aortic rings were submitted to electrical-field stimulation (EFS) at 60 V for 30 seconds, subsequently, at 4–16 Hz in square-wave pulses; 0.5 ms pulse width; 0.2 ms delay, using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical, RI, USA). EFS-induced contractions were performed in the presence and in the absence of the anti-adrenergic agents phentolamine (10 μM), guanethidine (30 μM) and the sodium-channel blocker tetrodotoxin (TTX; 1 μM) in aortic rings with endothelium-preserved rings (n = 3, for each group). In a separate set of experiments the endothelium was removed with the aid of a thin stick, and the effects of EFS were evaluated.

Histological and immunohistochemical analysis

Following euthanasia, the *Crotalus* (n = 4) and *Bothrops* (n = 6) aorta samples were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h at 24°C, dehydrated, embedded in paraffin wax and sectioned at 4 μm. Subsequently, these sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) for light-microscopy examination. Additionally, representative tissue sections were immuno-stained for S100 protein (S100p, a neural tissue marker) to investigate the presence of nerve fibers within aortic walls or for tyrosine hydroxylase (TH), using the following primary antibodies: (1) rabbit anti-S100p (polyclonal, Cat#NCL-L-S100p, which reacts with cow, human, chicken, pig, kangaroo, dog, cat, monkey, mouse and rat S-100 protein; Novocastra/Leica Biosystems, Newcastle, UK) at 1:200; (2) rabbit anti-TH (polyclonal, Cat#ab6211, which reacts with mouse, rat, guinea pig and human tyrosine hydroxylase and is predicted to react with chicken, chimpanzee and macaque monkey TH; Abcam, Cambridge, USA) at 1:200, 1:500 and 1:1000; and (3) chicken anti-TH (polyclonal, Cat#ab766442, which reacts with mouse, rat and human TH; Abcam, Cambridge, USA) at 1:500. The rabbit anti-TH antibody was used only in preliminary assays designed to establish the best primary antibody for the detection of this enzyme.

Immunohistochemistry was performed manually. Briefly, the sections were de-paraffinized in xylene and rehydrated in a series of ethanol baths of increasing concentration. They were then incubated in citrate buffer at pH 6.0 (S100p detection) or Tris-EDTA buffer pH 9.0 (tyrosine hydroxylase detection) in a steamer set for 40 min (at approximately 95°C). The sections were then incubated for 1h at 24°C with the above-mentioned primary antibodies. Tissue sections receiving the chicken anti-tyrosine hydroxylase antibody were sequentially incubated with a goat anti-chicken gamma immunoglobulin (IgG), and a rabbit anti-goat IgG, for 1h each, before applying the anti-rabbit IgG detection system (both antibodies were from Abcam (Cambridge, USA)). Regardless of the primary antibody, the detection system used was the NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra/Leica Biosystems), following the manufacturer's instructions, and using diaminobenzidine (liquid DAB, DakoCytomation, Carpinteria, USA) as a chromogen (which renders a brown precipitate at the antibody binding site).

Finally, the sections were counter-stained with Ehrlich's hematoxylin and cover-slipped in Entellan.

Negative controls consisted of the omission of the primary antibody and incubation with the primary antibody diluents (as well as with the secondary antibodies, where applicable). This was performed for all the immunohistochemistry assays to identify any background staining. Furthermore, formalin-fixed, paraffin-embedded *Crotalus* (n = 2) and *Bothrops* (n = 4) brain and a human paraganglioma (n = 1) were used as positive controls for the presence of both antigens (i.e., S100p and TH).

All slides were examined using a trinocular Eclipse 50i microscope (Nikon, Tokyo, Japan) coupled to a 5MP CMOS digital camera (Motic, Hong Kong, China).

Data analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM) of the number of experiments. To analyze the pharmacological characterization of EFS-induced contractions, two paired contractions in the presence and absence of antagonists (TTX inclusive) were performed, with the first stimulus being the "control" response. The contractions were quantified in milli-Newtons. Student's t-test (paired or unpaired depending on the protocol) were used. A p value <0.05 was considered significant.

Results

Functional characterization of endothelium-released catecholamine in *Crotalus* and *Bothrops* aortae

Electrical field stimulation-induced contractions on both *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae were frequency-dependent. Pre-incubation with guanethidine (30 μ M, 30 min) abolished the EFS-induced aortic contractions in both animals (Fig 1A and 1B) (n = 3) (p <0.05). Likewise, pre-treatment with the α -adrenergic antagonist phentolamine (10 μ M) significantly reduced the EFS-response in both tissues (Fig 2A and 2B) (n = 3) (p <0.05). Tetrodotoxin (1 μ M) incubation had no effect on the EFS-induced contraction in

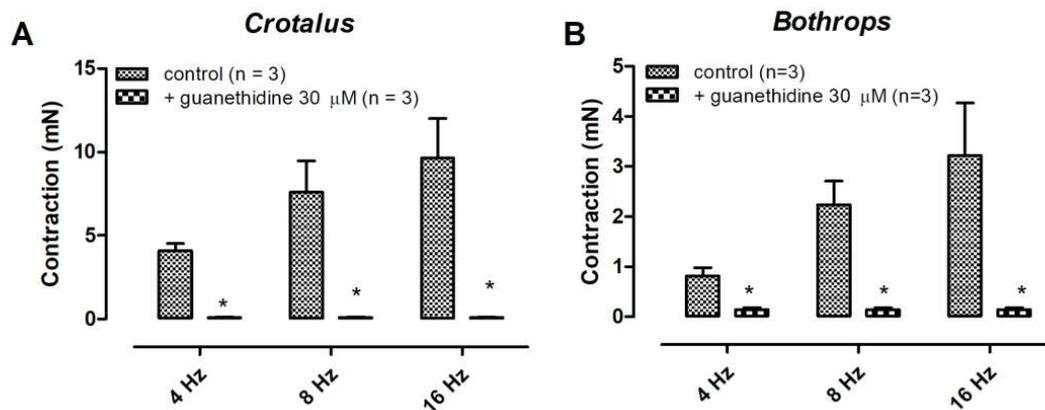


Fig 1. Effect of guanethidine (30 μ M) on electrical field stimulation-induced contractions of aortic rings isolated from *Crotalus* (A) and *Bothrops* (B). Data are expressed as mean \pm SEM. Paired Student's t test, *P <0.05 vs control (n = 3, for each group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.g001>

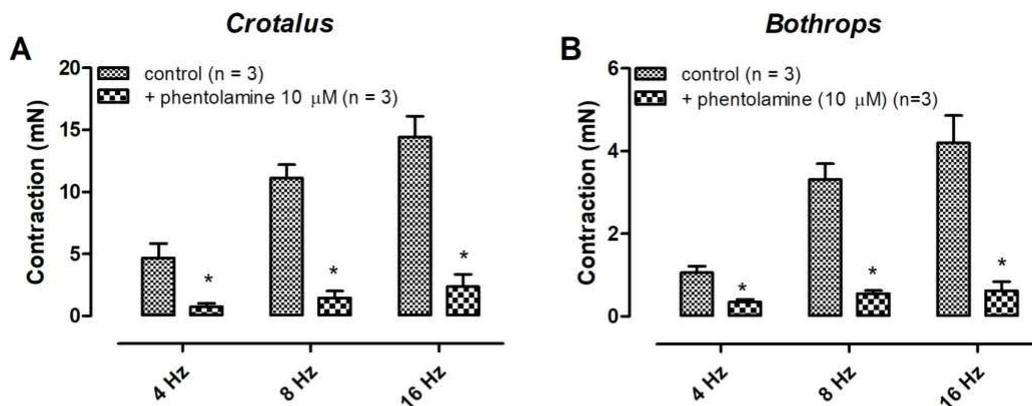


Fig 2. Effect of phentolamine (10 μM) on electrical field stimulation-induced contractions of aortic rings isolated from *Crotalus* (A) and *Bothrops* (B). Data are expressed as mean ± SEM. Paired Student's t test, *P < 0.05 vs control (n = 3, for each group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.g002>

both aortae (Fig 3A and 3B) (n = 3). Removal of the endothelium abolished the EFS-induced contraction of both aortae (Fig 4A and 4B) (n = 3) (p < 0.05).

Immunohistochemistry detection of tyrosine hydroxylase in *Crotalus* and *Bothrops* aortae. The results concerning S100p and tyrosine hydroxylase immunodetection in aortic specimens of *Crotalus durissus terrificus* are summarized in Table 1 and Figs 5–7. S100p was consistently negative in all aortic tunicae from both snakes investigated (4 out of 4 stained specimens), indicating the absence of nerve fibres in this vascular structure (Table 1 and Fig 5). As expected, in both positive controls (i.e., in human paraganglioma tissue and in snakes' brains), S100p was diffusely positive (Fig 6). The presence was strongest in the nuclei/

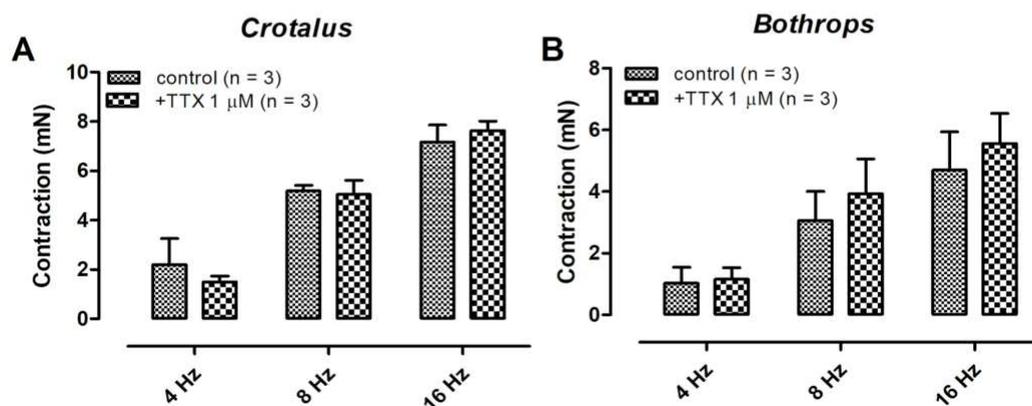


Fig 3. Effect of tetrodotoxin (1 μM) on electrical field stimulation-induced contractions of aortic rings isolated from *Crotalus* (A) and *Bothrops* (B). Data are expressed as mean ± SEM. Paired Student's t test, *P < 0.05 vs control (n = 3, for each group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.g003>

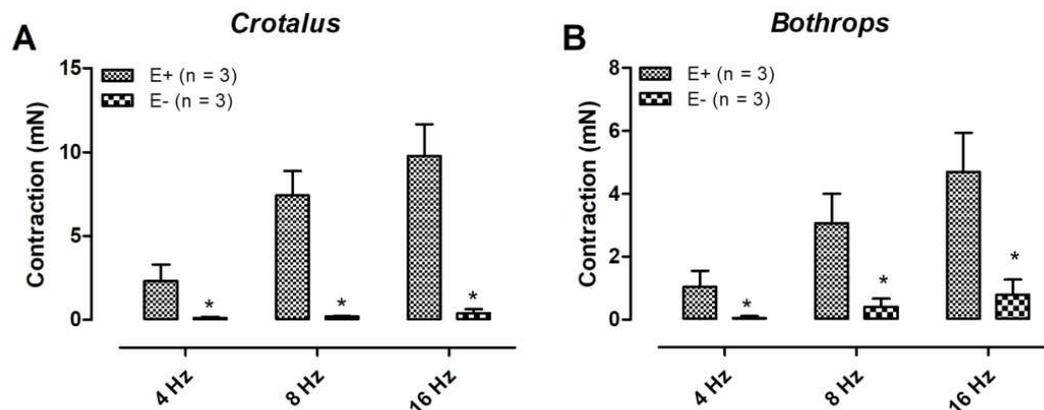


Fig 4. Removal of the endothelium reduced electrical field stimulation-induced contractions in *Crotalus* (A) and *Bothrops* (B) aortic rings. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs control (unpaired Student's *t* test) ($n = 3$, for each group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.g004>

cytoplasm of paraganglioma cells (Figs 6 and 7). No immunostaining was observed in stromal cells (such as smooth muscle cells, fibroblasts or endothelial cells) from either positive control tissues (Figs 6 and 7).

In preliminary experiments (development/standardization assays), tyrosine hydroxylase was detected in all tested tissues (i.e., in the human paraganglioma and in aorta samples from two *Crotalus* serpents) using both primary antibodies (that is, the rabbit- and the chicken-raised anti-TH antibodies). Tyrosine hydroxylase was consistently found in the cytoplasm of paraganglioma neoplastic cells and of the endothelia from both tested tissues (Figs 5 and 7). However, while both antibodies resulted in similar immunostaining intensities in the mentioned cell types, the one raised in chicken was considered more specific because it was not associated with significant background (nonspecific) staining in collagenous components of the aortic tunica media (as opposed to the rabbit anti-TH antibody) (data not shown).

Table 1. S100 protein and tyrosine hydroxylase immunodetection in *Crotalus* and human tissues: Frequency of positive cases and immunostaining intensity.

Antibody (dilution)	Aorta, <i>Crotalus</i> Frequency ^a (Intensity ^b)	Brain, <i>Crotalus</i> Frequency ^a (Intensity ^b)	Paraganglioma, Human Frequency ^a (Intensity ^b)
Rabbit polyclonal anti-S100p (1:200)	0/4 (-)	2/2 (+++)	1/1 (+++) in neoplastic cells
Rabbit polyclonal anti-tyrosine hydroxylase ^c (1:200, 1:500, 1:1000)	2/2 (+++) in tunica intima/vasa vasorum (endothelium) and tunica media (BS in collagenous elements)	NA	1/1 (+++) in neoplastic and endothelial cells
Chicken polyclonal anti-tyrosine hydroxylase (1:500)	4/4 (+++) in tunica intima/vasa vasorum (endothelium)	2/2 (+++) in neuron cell bodies of the cortex and (+) in neuropile	1/1 (+++) in neoplastic and endothelial cells

^aFrequency: no. of positive samples/total no. of samples.

^bImmunostaining intensity scale: (-): negative; (+): weak staining; (++) moderate staining; (+++) strong staining.

^cPerformed only in development/standardization assays.

BS: background staining. NA: non-applicable (immunostain was not performed).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.t001>

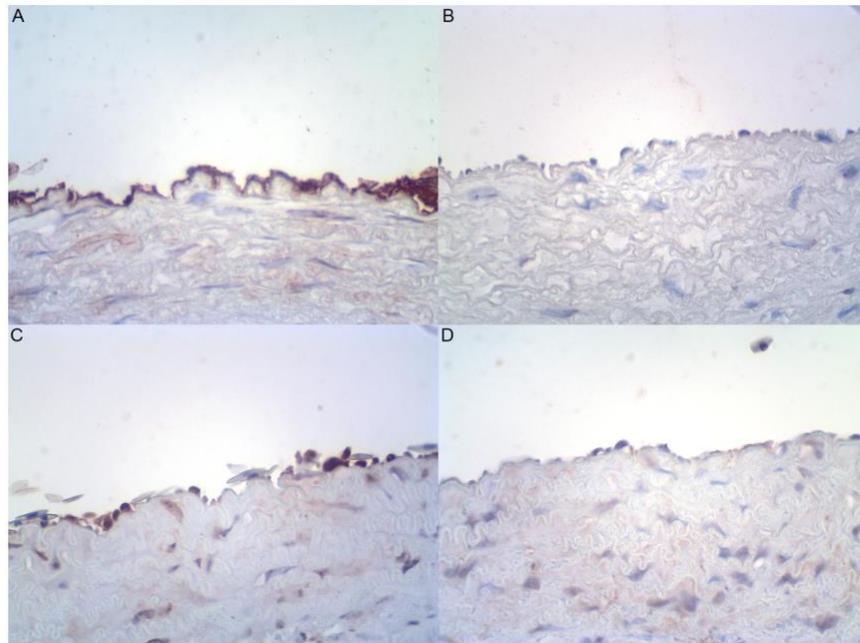


Fig 5. Representative photomicrographs illustrating the presence of tyrosine hydroxylase in endothelial cells of *Crotalus durissus terrificus* (n = 4) (A) and *Bothrops jararaca* (n = 6) (B) aorta specimens. Lack of S100 protein indicating the absence of nerve fibers within *Crotalus* (n = 4) (C) and *Bothrops* (n = 6) (D) aortic walls. Immunoperoxidase, 400X (original magnification).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.g005>

Therefore, the chicken anti-TH antibody was selected and subsequently applied to all tissue samples tested in this study.

Using the chicken anti-TH monoclonal antibody, TH was found to be moderately to strongly positive in paraganglioma neoplastic cells and endothelia (Fig 7), in cortical neurons from the positive control *Crotalus* brains (data not shown) and, most importantly, in aortic endothelial cells (Figs 5 and 6). Notice that the latter cells comprise not only the endothelial cell lining of the aorta lumen, but also the endothelia observed in the vasa vasorum.

In the paraganglioma sections, TH presence was observed in the endothelia of small to medium-sized vessels, which were seen either in close proximity to the tumour cells (small, thin-walled, venule-like vessels) or embedded in the tumour fibrous septae (larger, vein-like vessels, occasionally bearing an irregular/incomplete smooth muscle layer) (Fig 7). Similar tyrosine hydroxylase and S100p detection was also observed in *Bothrops* aortae and brain tissues (Table 2 and Fig 5).

Discussion

Our results clearly demonstrate that the EFS-induced contractions of both *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* isolated aortic rings were dependent upon catecholamine release, insensitive to tetrodotoxin and abolished by the removal of endothelium. These results

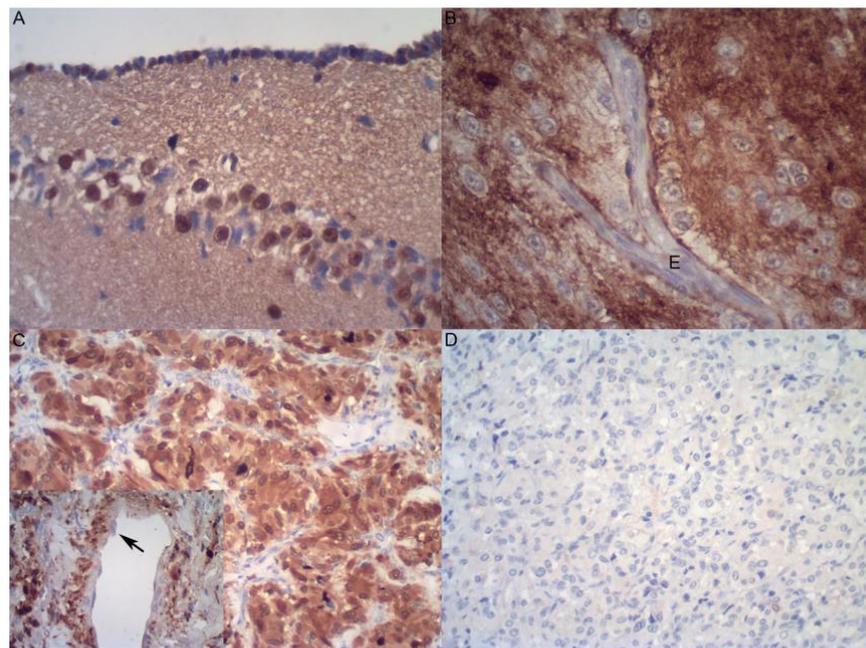


Fig 6. Immunodetection of S100 protein in *Crotalus* (n = 2) (A) and *Bothrops* (n = 4) (B) central nervous system, as well as in human paraganglioma tissue (n = 1) (positive controls). Notice the lack of S100 protein positivity in endothelial cells from *Bothrops* brain (B) and paraganglioma vessels (inset arrow in C). No staining was observed in the negative control (omission of primary antibody). Immunoperoxidase, 400x (A and B), 200x (C, including inset, and D), original magnifications.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.g006>

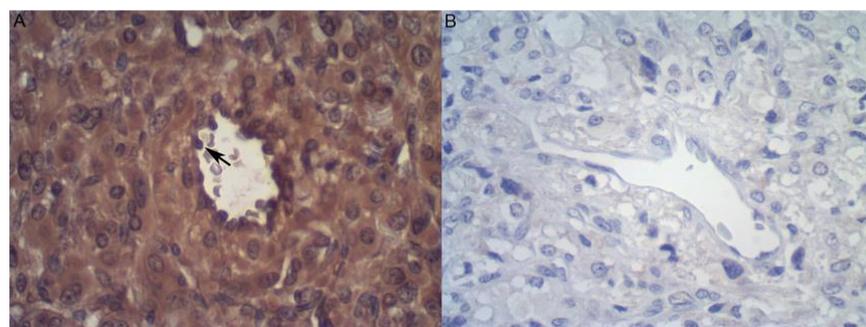


Fig 7. A: Immunodetection of tyrosine hydroxylase in human paraganglioma tissue (n = 1) (positive control). Notice the presence of S100 protein in both tumour and endothelial cells (arrow) (n = 1). B: no staining is observed in the negative control (omission of primary antibody). Immunoperoxidase, 400x original magnification.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.g007>

Table 2. S100 protein and tyrosine hydroxylase immunodetection in *Bothrops* tissues: Frequency of positive cases and immunostaining intensity.

Antibody (dilution)	Aorta, <i>Bothrops</i> Frequency ^a (Intensity ^b)	Brain, <i>Bothrops</i> Frequency ^a (Intensity ^b)
Rabbit polyclonal anti-S100p (1:200)	-	4/4 (++-+++) specimens Mostly in: glial cells (cytoplasmic and nuclear), ependymal cells (cytoplasmic and nuclear) and neuropil
Chicken polyclonal anti-tyrosine hydroxylase (1:500)	6/6 (+-+++) Mostly in: luminal (+6/6) and vasa vasorum (+2/2) endothelia	4/4 (+-+++) Mostly in: neurons (cytoplasmic) and neuropil

^aFrequency: no. of positive samples/total no. of samples.

^bImmunostaining intensity scale: (-): negative; (+): weak staining; (++) moderate staining; (+++): strong staining.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573.t002>

confirm previous results obtained in isolated aortic rings of *Pantherophis guttatus* (a non-venomous snake), reinforcing that the endothelium is the source for catecholamine release. Indeed, in *Crotalus durissus terrificus* corpus cavernosum, the EFS-induced contraction was dependent upon catecholamine release, but the enzyme tyrosine hydroxylase was identified only in the endothelium [3].

Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase of both *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae revealed that the enzyme is present in the endothelial cells. The antibody used for the immunohistochemistry was an anti-chicken tyrosine hydroxylase antibody. Tyrosine hydroxylase has not been cloned in reptiles. Using an avian antibody in a different taxon is complex, but the pharmacological findings support the evidence for the presence of this enzyme in snake endothelial cells. Furthermore, the immunohistochemistry was also positive using a mammalian antibody (anti-rabbit tyrosine hydroxylase antibody). As expected, the immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase was positive in both *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* brains as well as in the human paraganglioma sample.

Tyrosine hydroxylase is the enzyme responsible for the conversion of tyrosine to L-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), the precursor of dopamine [5]. Synthesis of adrenergic catecholamines has been shown to occur in bovine aortic endothelial cells and in mouse femoral arteries [4]. Our results identify, for the first time, immunoreactivity of TH in mammalian (human) endothelial cells in a neuroendocrine neoplasm. This raises an interesting possibility of a potential role of endothelial-derived catecholamines modulating tumour growth. Indeed, propranolol (a non-selective β -antagonist) administration in patients with ovarian cancer reduced the tumour progression [6]. Propranolol administration is also related to reduction of death risk in patient with malignant melanoma [7,8] reduction in breast cancer progression and mortality [9,10,11] and improved the lung survive outcomes in patient with non-squamous lung cancer treated with radiation therapy [12]. However, the physiological and pathophysiological role of endothelial-derived catecholamines in both circulation control and cancer progression remains to be further investigated.

Conclusion

Our results indicate that endothelial-derived catecholamines may modulate snake vascular tonus and confirms that human endothelial cells express tyrosine hydroxylase.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP;2011/11828-4) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq; 140731/2013-0).

Author Contributions

Conceptualization: Rafael Campos, Fabíola Z. Mónica, Valéria Barbosa de Souza, Andre Almeida Schenka, Gilberto De Nucci.

Data curation: Rafael Campos, Alberto Fernando Oliveira Justo, Valéria Barbosa de Souza, Gilberto De Nucci.

Formal analysis: Rafael Campos, Fabíola Z. Mónica.

Funding acquisition: Gilberto De Nucci.

Investigation: Rafael Campos, Alberto Fernando Oliveira Justo, Fabíola Z. Mónica, Valéria Barbosa de Souza, Andre Almeida Schenka, Gilberto De Nucci.

Methodology: Rafael Campos, Andre Almeida Schenka, Gilberto De Nucci.

Project administration: Rafael Campos, Ronilson Agnaldo Moreno.

Resources: Rafael Campos, José Carlos Cogo, Ronilson Agnaldo Moreno, Gilberto De Nucci.

Supervision: Rafael Campos, Fabíola Z. Mónica, Andre Almeida Schenka, Gilberto De Nucci.

Validation: Rafael Campos, Gilberto De Nucci.

Visualization: Rafael Campos, Gilberto De Nucci.

Writing – original draft: Rafael Campos, Valéria Barbosa de Souza, Andre Almeida Schenka, Gilberto De Nucci.

References

1. Smythies JR, Benington F, Morin RD. Model for the action of tetrodotoxin and batrachotoxin. *Nature*; 1971; 231: 188–190. PMID: [4930678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4930678/)
2. Campos R, Mónica FZ, Justo AFO, Cogo JC, Oliveira E de T, Moreno RA, et al. Electrical field stimulation-induced contractions on *Pantherophis guttatus* corpora cavernosa and aortae. *PLoS One* 2018; 1–9. April <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196123> PMID: [29672643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29672643/)
3. Campos R, Mónica FZ, Rodrigues RL, Rojas-Moscoso JA, Moreno RA, Cogo JC, et al. Tetrodotoxin-insensitive electrical field stimulation-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* corpus cavernosum. *PLoS One* 2017; 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183766> PMID: [28837636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28837636/)
4. Sorriento D, Santulli G, Del Giudice C, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension* 2012; 60: 129–136. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.189605> PMID: [22665130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665130/)
5. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase: The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem*. 1964; 239: 2910–2917. <https://doi.org/10.1097/00005792-196405000-00019> PMID: [14216443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14216443/)
6. Jang H-I, Lim S-H, Lee Y-Y, Kim T-J, Choi CH, Lee J-W, et al. Perioperative administration of propranolol to women undergoing ovarian cancer surgery: A pilot study. *Obstet Gynecol Sci*. 2017; 60: 170–177. <https://doi.org/10.5468/ogs.2017.60.2.170> PMID: [28344958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344958/)
7. Lemeshow S, Sørensen HT, Phillips G, Yang E V., Antonsen S, Riis AH, et al. β -blockers and survival among danish patients with malignant melanoma: A population-based cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20: 2273–2279. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0249> PMID: [21933972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21933972/)

5. DISCUSSÃO

Em anéis de aorta isolados de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* demonstramos que o estímulo elétrico de campo induz contrações de maneira dependente da frequência dos estímulos elétricos e do endotélio; essas contrações são mediadas por catecolaminas, porém, são insensíveis ao bloqueio da transmissão pré-sináptica pela tetrodotoxina. Mostramos ainda que, no endotélio de ambas espécies, há expressão de tirosina hidroxilase (TH; enzima essencial para síntese de catecolaminas) e ausência da proteína S100 (marcador neural), reforçando as hipóteses do endotélio como fonte de catecolaminas e da ausência de nervos simpáticos na estrutura aórtica. Da mesma forma, endotélio humano de um tumor de paraganglioma também expressa TH mas não S100.

Sabe-se que as catecolaminas têm papel fundamental na regulação do sistema vascular e respiratório em reptéis. Em *Chrysemys picta bellii* (tartaruga-pintada) foi visto o aumento dos níveis circulantes de catecolaminas, especialmente NOR durante anóxia [76]. Em uma outra espécie de quelônio, *Trachemys scripta* (Cágado-da-orelha-vermelha), a administração de adrenalina intra-arterial é seguida por vasoconstrição sistêmica [77] e, em condições de hipóxia, há o aumento massivo de noradrenalina enquanto apenas um discreto aumento de adrenalina [78]. Estudos envolvendo uma espécie de tartaruga terrestre (*Chelonoidis carbonaria*, conhecida como jabuti-piranga) [73] e uma espécie de colubrídeo constritor (*Pantherophis guttatus*, cobra do milho) [74] demonstraram que a contração induzida por estímulo elétrico de campo é mediada por catecolaminas e que a adição de um antagonista α -adrenérgico causa a diminuição dessa resposta.

Um estudo anterior com *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), uma espécie mais recente evolutivamente que as citadas no parágrafo anterior, reportou que a administração em forma de bolus de adrenalina causa vasoconstrição sistêmica e que, quando seguida pela administração de fentolamina, há a abolição dessa resposta contrátil [79]. Corroborando com esses dados, nossos resultados mostraram que em aortas isoladas, tanto de cascavel quanto de

jararaca, houve redução resposta contrátil na presença de agente simpatolíticos (fentolamina e guanetidina) sugerindo que as catecolaminas NOR e/ou dopamina estão envolvidas na contração induzida por estímulo elétrico de campo, visto que ambas estruturas podem ativar receptores alfa adrenérgicos [80,81].

Em leitos vasculares, as inervações simpáticas estão distribuídas entre a camada adventícia e a musculatura lisa [84] e tem função na regulação do tônus vascular de forma aguda e crônica mediada principalmente pela liberação de NOR pelas terminações nervosas [82], como ilustrado na Figura 01. A neurotransmissão se pela condução dos potenciais de ação neuronais ao longo do axônio pós-ganglionar culminando pela exocitose dos neurotransmissores; essa condução é iniciada pela ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem neuronais, sendo expressos principalmente os subtipos Nav1.6 e Nav1.7 em nervos simpáticos [87,88].

Sabe-se que o EFS é uma técnica que induz a despolarização de nervos em órgãos isolado quando utilizado em pulsos curtos [85,86] por meio da abertura de canais de sódio dependentes de voltagem neuronais. Levando em consideração que os canais de sódio dependentes de voltagem são importantes para a neurotransmissão simpática, porém não são essenciais para o mecanismo contrátil do músculo liso *per se*, bloqueadores de canais de sódio dependente de voltagens como a tetrodotoxina (TTX) podem ser adotados para o bloqueio seletivo da atividade neuronal nessas preparações. Sendo assim, nesse estudo utilizamos TTX para investigar se a contração das aortas induzida por EFS é de origem neural.

Nossos dados mostram que a incubação com TTX não alterou contração das aortas isoladas das cobras peçonhentas estudadas. Os mesmos resultados foram vistos em jabuti-piranga [73] e cobra-do-milharal [74]. Similar característica de resistência à TTX em répteis foi observada em musculatura esquelética, tecido que, em mamíferos, é altamente sensível à TTX. Essa resistência foi descrita como um mecanismo de adaptação, uma vez que umas das presas mais comuns de cobras como anfíbios *Taricha granulosa* e peixes *Tetraodontidae*s podem produzir tal toxina [83,84].

Considerando também que, em corpo cavernoso de cascavel, a retirada completa do cloreto de sódio da solução nutritiva não causou alteração na

contratilidade do tecido, diferentemente do observado em coelho onde houve a abolição da resposta contrátil na solução modificada [85], sugere-se um possível efeito adaptativo nas cobras peçonhentas utilizadas nesse estudo (cascavel e jararaca) como a resistência ao TTX (observada em certos anfíbios e peixes) e a contração mediada por EFS não ser de origem neural, como registrado anteriormente em corpo cavernoso da cascavel.

A proteína S100 é caracterizada com um dos principais marcadores neurais utilizados para identificação de tecido nervoso. Vários estudos vêm utilizando esse marcador para investigar a inervação simpática em diferentes órgãos [86–89], uma vez que cerca de 97% nos neurônios simpáticos expressam essa proteína [90]. No presente trabalho, investigamos a presença e funcionalidade da inervação simpática na aorta de cascavel e jararaca por meio de i) estudos funcionais, cujos quais registraram ausência de alterações na contração induzida por EFS na presença de TTX, e ii) imuno-histoquímica, que revelou a ausência de expressão da proteína S100 na aorta das duas espécies estudadas.

Outros trabalhos mostraram que o EFS tem diferentes efeitos de maneira endotélio dependente. Foi reportado que o EFS em células endoteliais de aorta de bovino induz a liberação de NO e EDHF *in vitro* [91]. Funcionalmente EFS causa relaxamento mediado pela estimulação do endotélio e liberação de NO em artéria pulmonar de coelho, gato e macacos [92] e o mesmo efeito foi visto em artéria caudal de rato causando relaxamento [91].

Classicamente, a remoção do endotélio dos vasos de mamíferos é seguida pela potencialização da contração vascular tanto em resposta a agonistas (como fenilefrina), ao cloreto de potássio [93] e também EFS [94]. Entretanto, respostas diferentes foram observadas em aorta de animais evolutivamente mais antigos que mamíferos a compreender o jabuti-piranga [73], a cobra-do-milharal [74] e, no presente estudo, os viperídeos cascavel e jararaca. Nesses animais, a retirada do endotélio causa abolição ou diminuição significativa da contração vascular.

Similar dependência do endotélio foi observado em corpo cavernoso de cascavel. Nosso grupo relatou que, além de serem resistentes à TTX e não serem alteradas pela ausência de NaCl_2 na solução nutritiva como já dissertados nessa discussão, as contrações do corpo cavernoso de cascavel

induzidas por EFS são também dependentes do endotélio [85]. Logo, em répteis, a peculiaridade das contrações vasculares induzidas por EFS de serem resistentes à TTX, inalteradas pela ausência de sódio na solução nutritiva e dependentes do endotélio não é exclusiva às aortas. Poderíamos sugerir que, em répteis, a estimulação elétrica de campo pode interagir com o endotélio por meio de: i) um canal de sódio dependente de voltagem resistente à TTX presente no endotélio; ou ii) um canal de cálcio dependente de voltagem presente no endotélio, embora esse canal deva possuir diferentes propriedades de abertura que lhe permitem serem ativados na condição de EFS utilizada, diferente dos canais de cálcio de preparações de mamífero. Entretanto, outros experimentos e metodologias específicas devem ser adotadas para a confirmação dessas hipóteses.

Para investigar a produção de catecolaminas nos tecidos, utilizamos a marcação da TH por essa enzima ser a mais específica quando comparada com a DCC, que também é uma enzima essencial para formação de histamina e serotonina [95,96]. Nas aortas das duas espécies utilizadas (cascavel e jararaca), expressão de TH foi exclusiva no endotélio. Essa expressão de TH exclusiva no endotélio também foi reportada anteriormente em corpo cavernoso de cascavel, um tecido rico em células endoteliais [85]. Assim, mostramos funcionalmente e por imuno-histoquímica que o endotélio de cascavel e jararaca tem a capacidade de sintetizar catecolaminas.

Diferentes trabalhos reportaram a produção de catecolamina em células endoteliais de mamíferos *in vitro*. Em endotélio bovino, a produção basal de noradrenalina (em maior concentração) e adrenalina ocorre através da estimulação da PKA e, em condição de hipóxia, há um aumento na produção de ambas catecolaminas. Além da produção de catecolaminas, foi vista a expressão de todas as enzimas relacionadas a produção desses dois neurotransmissores [97]. Em células endoteliais da artéria mesentérica superior de rato, foi vista a expressão de todas as enzimas para formação de noradrenalina (TH, DDC, DBH), porém, não houve expressão da enzima responsável pela síntese de adrenalina (FNMT) [98].

Além dos estudos *in vitro*, nosso grupo mostrou funcionalmente que, em veia umbilical humana, a presença do endotélio é necessária na contração vascular induzida por EFS [99,100]. Tal contração também é reduzida na

presença de antagonista alfa-adrenérgico não-seletivo. Levando em consideração que não há inervação adrenérgica nesse leito vascular [104,105], que a contração por EFS é dependente de endotélio e reduzida por antagonista alfa-adrenérgico, sugeriu-se que as catecolaminas responsáveis pela contração desse leito vascular são derivadas do endotélio [100].

Alguns tumores neuroendócrinos como feocromocitoma e paraganglioma têm capacidade de sintetizar catecolaminas. Originados de células neuroendócrinas chamados de paragânglios [101], sendo a hipertensão um dos principais sinais clínicos nesses tumores [102].

Nossos resultados imunohistoquímicos mostraram a expressão da proteína S100 e TH em células neoplásicas de paraganglioma humano, sendo essa uma característica associada a tumores benignos pela não diferenciação celular do paraganglioma [101,103]. Além de sua expressão nas células neoplásicas, identificamos pela primeira vez a expressão de TH no endotélio de um tumor neuroendócrino. Tal fato abre a discussão acerca do endotélio como uma fonte de catecolamina que pode ser capaz de modular o crescimento tumoral.

As catecolaminas, principalmente NOR e adrenalina, têm sido intensamente estudadas pela sua atividade proliferativa. Diferentes estudos mostraram que as vias pelas quais essas catecolaminas atuam são relacionadas à atividade adrenérgica β_2 : a modulação de forma positiva de vias do VEGF induz migração, invasão e metástase no câncer [104–106]. De fato, a administração de beta-bloqueadores juntamente com quimioterápicos teve efeitos benéficos em pacientes com diferentes tipos de câncer, como aumento de sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma pancreático [107], câncer de ovário e melanoma [108]. Sendo assim, o endotélio pode ter um importante papel importante na fisiopatologia do câncer, principalmente em tumores hipervascularizados como é o caso do paraganglioma aqui estudado.

6. CONCLUSÃO

- A contração por EFS de aorta isolada de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) e *Bothrops jararaca* (jararaca) é evocada por catecolaminas, visto que são abolidas por agentes simpatolíticos;
- Tais catecolaminas não são de origem neural, uma vez que as aortas das cobras estudadas não apresentam marcadores neurais e o uso de TTX não afetou as contrações induzidas por EFS;
- O endotélio parece ser um potencial modulador do tônus vascular pela síntese e liberação de catecolaminas nas cobras estudadas uma vez que as contrações induzidas por EFS são dependentes de endotélio.
- Igual dependência de endotélio e resistência a TTX é observada em aortas de espécies mais antigas evolutivamente como *Chelonoidis carbonaria* (jabuti-piranga) e *Pantherophis guttatus* (cobra-do-milharal), e em corpo cavernoso de cascavel.
- Células endoteliais de paraganglioma humano também expressam tirosina hidroxilase, apresentando a potencial função de modulação tumoral a partir da produção de catecolamina pelo endotélio.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev* 2009;89:535–606. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>.
- [2] Cannon WB, Paz D de La. Emotional Stimulation of Adrenal Secretion. *Am J Physiol* 1910;904:64–70. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1911.28.1.64>.
- [3] Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev* 2004;56:331–49. <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.1>.
- [4] Goldstein DS. Noradrenergic Neurotransmission. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00006-8>.
- [5] Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *J Nutr* 2018;137:1539S-1547S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1539s>.
- [6] Hudecova S, Vlcek M, Lejavova K, Kvetnansky R, Vargovic P, Krizanova O, et al. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. *Immunobiology* 2012;218:780–9. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.08.279>.
- [7] Huang MH, Friend DS, Sunday ME, Singh K, Haley K, Austen KF, et al. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest* 1996;98:1298–303. <https://doi.org/10.1172/JCI118916>.
- [8] Ebert SN, Rong Q, Boe S, Pfeifer K. Catecholamine-synthesizing cells in the embryonic mouse heart. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:317–24. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.008>.
- [9] Ebert SN, Baden JM, Mathers LH, Siddall BJ, Wong DL. Expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in the embryonic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1653–8. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0155>.
- [10] Ebert SN, Thompson RP. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: Association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* 2001;88:117–24. <https://doi.org/10.1161/01.RES.88.1.117>.

- [11] Tillinger A, Novakova M, Pavlovicova M, Lacinova L, Zatovicova M, Pastorekova S, et al. Modulation by 6-hydroxydopamine of expression of the phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) gene in the rat heart during immobilization stress. *Stress* 2006;9:207–13. <https://doi.org/10.1080/10253890601069385>.
- [12] Vargovic P, Ukropec J, Laukova M, Cleary S, Manz B, Pacak K, et al. Adipocytes as a new source of catecholamine production. *FEBS Lett* 2011;585:2279–84. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.06.001>.
- [13] Kvetnansky R, Ukropec J, Laukova M, Manz B, Pacak K, Vargovic P. Stress stimulates production of catecholamines in rat adipocytes. *Cell Mol Neurobiol* 2012;32:801–13. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9822-6>.
- [14] Vargovic P, Laukova M, Ukropec J, Manz G, Kvetnansky R. Lipopolysaccharide induces catecholamine production in mesenteric adipose tissue of rats previously exposed to immobilization stress. *Stress* 2016;19:439–47. <https://doi.org/10.1080/10253890.2016.1203414>.
- [15] Elenkov IJ. Effects of Catecholamines on the Immune Response. *NeuroImmune Biol* 2007;7:189–206. [https://doi.org/10.1016/S1567-7443\(07\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S1567-7443(07)00210-4).
- [16] Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium in Pharmacology Review. *Br J Pharmacol* 2009;157:527–36. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00240.x>.
- [17] Ruviaro AR, Barbosa P de PM, Alexandre EC, Justo AFO, Antunes E, Macedo GA. Aglycone-rich extracts from citrus by-products induced endothelium-independent relaxation in isolated arteries. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020;23:101481. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101481>.
- [18] Furchgott RF, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–6.
- [19] Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524–6. <https://doi.org/10.1038/327524a0>.
- [20] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987;92:639–46. <https://doi.org/10.1111/j.1476->

- 5381.1987.tb11367.x.
- [21] Lescano CH, Freitas de Lima F, Mendes-Silvério CB, Justo AFO, da Silva Baldivia D, Vieira CP, et al. Effect of Polyphenols From *Campomanesia adamantium* on Platelet Aggregation and Inhibition of Cyclooxygenases: Molecular Docking and in Vitro Analysis. *Front Pharmacol* 2018;9:1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00617>.
- [22] Scott NA, Zhao Y, Krishnamurthy B, Mannering SI, Kay TWH, Thomas HE. IFN γ -Induced MHC Class II Expression on Islet Endothelial Cells Is an Early Marker of Insulinitis but Is Not Required for Diabetogenic CD4 $^{+}$ T Cell Migration. *Front Immunol* 2018;9:1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02800>.
- [23] Naime ACA, Ganaes JOF, Lopes-Pires ME. Sepsis : The Involvement of Platelets and the Current Treatments. *Curr Mol Pharmacol* 2018;11:1–9. <https://doi.org/10.2174/1874467211666180619124531>.
- [24] Vasileiadis I, Politou M, Dimopoulos S, Rovina N, Kyriakopoulou M, Kyriakoudi A, et al. Variation of endothelium-related hemostatic factors during sepsis. *Microcirculation* 2018;25:1–7. <https://doi.org/10.1111/micc.12500>.
- [25] De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous Behavior of the Canine Arterial and Venous Wall Importance of the Endothelium. *Circ Res* 1982;51:439–47. <https://doi.org/10.1161/01.RES.51.4.439>.
- [26] De Mey JG, Vanhoutte PM. Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery. *J Physiol* 1983;335:65–74.
- [27] Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005;144:449–58. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706042>.
- [28] Bharadwaj LA, Prasad K. Mechanism of superoxide anion-induced modulation of vascular tone. *Int J Angiol* 2002;11:23–9. <https://doi.org/10.1007/s00547-001-0049-5>.
- [29] Warner TD, Mitchell JA, De Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:S85–8. <https://doi.org/10.1097/00005344-198900135-00021>.
- [30] Silva AS, Zanesco A. Physical exercise, β -adrenergic receptors, and

- vascular response. *J Vasc Bras* 2010;9:47–56. <https://doi.org/10.1590/S1677-54492010000200007>.
- [31] Galasso G, De Rosa R, Ciccarelli M, Sorriento D, Del Giudice C, Strisciuglio T, et al. β_2 -Adrenergic Receptor Stimulation Improves Endothelial Progenitor Cell-Mediated Ischemic Neoangiogenesis.pdf. *Circ Res* 2013;112:1026–34. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300152>.
- [32] Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001;7:569–74. <https://doi.org/10.1038/87895>.
- [33] Harvey P, Pagel M. *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford Ser Ecol Evol Vol 1 1991;7:68–9.
- [34] Brooks DR, McLennan DA. *Species: Exploring the Entities*. Nat. Divers. An Evol. Voyag. Discov. University, 2012.
- [35] Garland T, Bennett AF, Rezende EL. Phylogenetic approaches in comparative physiology. *J Exp Biol* 2005;208:3015–35. <https://doi.org/10.1242/jeb.01745>.
- [36] Fielding CL. Sodium and water homeostasis and derangements. 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118928189.ch2>.
- [37] Sieck GC. We learn from evolutionary/comparative physiology. *Physiology* 2016;31:390–1. <https://doi.org/10.1152/physiol.00027.2016>.
- [38] Rühli F, van Schaik K, Henneberg M. Evolutionary medicine: The ongoing evolution of human physiology and metabolism. *Physiology* 2016;31:392–7. <https://doi.org/10.1152/physiol.00013.2016>.
- [39] Garland T, Adolph SC. Why Not to Do Two-Species Comparative Studies: Limitations on Inferring Adaptation. *Physiol Zool* 1994;67:797–828.
- [40] Bennett AF. Division of Comparative Physiology and Biochemistry , Society for Integrative and Comparative Biology Experimental Evolution and the Krogh Principle : Generating Biological Novelty for Functional and Genetic Analyses 1. *Physiol Biochem Zool* 76(1)1–11 2016;76:1–11. <https://doi.org/10.1086/374275>.
- [41] Shedlock AM, Edwards S V. Amniotes. In: Hedges SB, Kumar S, editors. *Timetree Life*, Shedlock, A. M Edwards, S. V.; 2009, p. 375–9.

- [42] Anthony JM. Dinosaurs: the science behind the stories. In: Springer, editor. *Dinosaur Evol. From Where Did They Come Where Did They Go?*, Alexandria: 2002, p. 23–30.
- [43] Chiari Y, Cahais V, Galtier N, Delsuc F. Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biol* 2012;10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-65>.
- [44] Simões TR, Caldwell MW, Tałanda M, Bernardi M, Palci A, Vernygora O, et al. The origin of squamates revealed by a Middle Triassic lizard from the Italian Alps. *Nature* 2018;557:706–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0093-3>.
- [45] Uetz P. The Reptile Database: species numbers 2020. www.reptile-database.org (accessed April 15, 2020).
- [46] Harrington SM, Reeder TW. Phylogenetic inference and divergence dating of snakes using molecules, morphology and fossils: New insights into convergent evolution of feeding morphology and limb reduction. *Biol J Linn Soc* 2017;121:379–94. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blw039>.
- [47] Zheng Y, Wiens JJ. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Mol Phylogenet Evol* 2016;94:537–47. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.009>.
- [48] Uetz P. The Reptile Database: Phylogeny and diversity of Squamate. 2020. www.reptile-database.org (accessed April 15, 2020).
- [49] Burgin CJ, Colella JP, Kahn PL, Upham NS. How many species of mammals are there? *J Mammal* 2018;99:1–14. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>.
- [50] Foley NM, Springer MS, Teeling EC. Mammal madness: Is the mammal tree of life not yet resolved? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2016;371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0140>.
- [51] Springer MS, Foley NM, Brady PL, Gatesy J, Murphy WJ. Evolutionary Models for the Diversification of Placental Mammals Across the KPg Boundary. *Front Genet* 2019;10:1–22. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01241>.

- [52] Meredith RW, Janečka JE, Gatesy J, Ryder OA, Fisher CA, Teeling EC, et al. Impacts of the Cretaceous terrestrial revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science* (80-) 2011;334:521–4. <https://doi.org/10.1126/science.1211028>.
- [53] O’Leary M a, Bloch JI, Flynn JJ, Gaudin TJ, Giallombardo A, Giannini NP, et al. The Placental Mammal Ancestor and the Post-K-Pg Radiation of Placentals. *Science* (80-) 2013;339:662–7. <https://doi.org/10.1126/science.1229237>.
- [54] Steiper ME, Young NM. Primate molecular divergence dates. *Mol Phylogenet Evol* 2006;41:384–94. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.021>.
- [55] Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MAM, et al. A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 2011;7:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001342>.
- [56] Finstermeier K, Zinner D, Brameier M, Meyer M, Kreuz E, Hofreiter M, et al. A Mitogenomic Phylogeny of Living Primates. *PLoS One* 2013;8:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069504>.
- [57] Klein RG. Population structure and the evolution of *Homo sapiens* in Africa. *Evol Anthropol* 2019;28:179–88. <https://doi.org/10.1002/evan.21788>.
- [58] Bräuer G. The origin of modern anatomy: By speciation or intraspecific evolution? *Evol Anthropol* 2008;17:22–37. <https://doi.org/10.1002/evan.20157>.
- [59] Galway-Witham J, Stringer C. How did *Homo sapiens* evolve? *Science* (80-) 2018;360:1296–8. <https://doi.org/10.1126/science.aat6659>.
- [60] Hublin JJ, Ben-Ncer A, Bailey SE, Freidline SE, Neubauer S, Skinner MM, et al. New fossils from Jebel Irhoud, Morocco and the pan-African origin of *Homo sapiens*. *Nature* 2017;546:289–92. <https://doi.org/10.1038/nature22336>.
- [61] Page RDM. Extracting species trees from complex gene trees: Reconciled trees and vertebrate phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 2000;14:89–106. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0676>.
- [62] Luebke JI, Weider JM, McCarley RW, Greene RW. Distribution of NADPH-diaphorase positive somata in the brainstem of the monitor lizard

- Varanus exanthematicus. *Neurosci Lett* 1992;148:129–32. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90821-N](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90821-N).
- [63] Brüning G, Wiese S, Mayer B. Nitric oxide synthase in the brain of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J Comp Neurol* 1994;348:183–206. <https://doi.org/10.1002/cne.903480203>.
- [64] Campos R, Justo AFO, Jacintho FF, Mónica FZ, Rojas-Moscoso JA, Moreno RA, et al. Pharmacological and transcriptomic characterization of the nitric oxide pathway in aortic rings isolated from the tortoise *Chelonoidis carbonaria*. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 2019;222:82–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.015>.
- [65] Jiang PJ, Terashima SI. Distribution of NADPH-diaphorase in the central nervous system of an infrared-sensitive snake, *Trimeresurus flavoviridis*. *Brain Res* 1996;713:168–77. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01507-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01507-8).
- [66] Mónica FZ, Rojas-Moscoso J, Porto M, Schenka AA, Antunes E, Cogo JC, et al. Immunohistochemical and functional characterization of nitric oxide signaling pathway in isolated aorta from *Crotalus durissus terrificus*. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 2012;155:433–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.11.003>.
- [67] Staples JF, Zapol WM, Bloch KD, Kawai N, Val VMF, Hochachka PW. Nitric oxide responses of air-breathing and water-breathing fish. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 1995;268. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.268.3.r816>.
- [68] Jennings BL, Broughton BRS, Donald JA. Nitric oxide control of the dorsal aorta and the intestinal vein of the Australian short-finned eel *Anguilla australis*. *J Exp Biol* 2004;207:1295–303. <https://doi.org/10.1242/jeb.00883>.
- [69] Miller VM, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in isolated blood vessels of lower vertebrates. *Blood Vessels* 1986;23:225–35. <https://doi.org/10.1159/000158643>.
- [70] Suzuki H, Kou K. Direct and indirect effects of histamine on the smooth muscle cells of the guinea-pig main pulmonary artery. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1983;399:46–53. <https://doi.org/10.1007/BF00652521>.
- [71] Hicks JW, Comeau SG. Vagal regulation of intracardiac shunting in the

- turtle *Pseudemys scripta*. *J Exp Biol* 1994;186:109–26.
- [72] Nandiwada PA, Hyman AL, Kadowitz PJ. Pulmonary vasodilator responses to vagal stimulation and acetylcholine in the cat. *Circ Res* 1983;53:86–95. <https://doi.org/10.1161/01.RES.53.1.86>.
- [73] Campos R, Jacintho FF, Britto-junior J, Mónica FZ, Justo AFO, Pupo AS, et al. Endothelium modulates electrical field stimulation-induced contractions of *Chelonoidis carbonaria* aortic rings. *Comp Biochem Physiol Part C* 2020;233:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108763>.
- [74] Campos R, Mónica FZ, Justo AFO, Cogo JC, Oliveira EDT, Moreno RA, et al. Electrical field stimulation-induced contractions on *Pantherophis guttatus* corpora cavernosa and aortae. *PLoS One* 2018;13:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196123>.
- [75] Campos R de M. EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO NITRÉRGICA NO CONTROLE DOS TÔNUS DE AORTAS E CORPOS CAVERNOSOS DOS RÉPTEIS CHELONOIDIS CARBONARIA (JABUTI-PIRANGA) E PANTHEROPHIS GUTTATUS (COBRA DOS MILHARAIS). UNICAMP, 2017.
<https://doi.org/repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/325581>.
- [76] Wasser JS, Jackson DC. Effects of anoxia and graded acidosis on the levels of circulating catecholamines in turtles. *Respir Physiol* 1991;84:363–77. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(91\)90130-B](https://doi.org/10.1016/0034-5687(91)90130-B).
- [77] Hicks JMT, Farrell AP. The cardiovascular responses of the red-eared slider (*Trachemys scripta*) acclimated to either 22 or 5°C: I. Effects of anoxic exposure on in vivo cardiac performance. *J Exp Biol* 2000;203:3765–74.
- [78] Crossley D, Altimiras J, Wang T. Hypoxia elicits an increase in pulmonary vasculature resistance in anaesthetised turtles (*Trachemys scripta*). *J Exp Biol* 1998;201:3367–75.
- [79] Galli GLJ, Skovgaard N, Abe AS, Taylor EW, Wang T. The adrenergic regulation of the cardiovascular system in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. *Comp Biochem Physiol - A* 2007;148:510–20. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.420>.
- [80] Cornil CA, Castelino CB, Ball GF. Dopamine binds to α 2-adrenergic receptors in the song control system of zebra finches (*Taeniopygia*

- guttata). *J Chem Neuroanat* 2008;35:202–15. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.10.004>.
- [81] Ramsdell JS, Bethea CL, Jaffe RB, Wilson CB, Weiner RI. Characterization of dopamine and α -adrenergic receptors in human prolactin-secreting adenomas with phj-dihydroergocryptine. *Neuroendocrinology* 1985;40:518–25. <https://doi.org/10.1159/000124124>.
- [82] Martínez AC, Pagán RM, Prieto D, Recio P, García-sacristán A, Hernández M, et al. Full Paper Modulation of Noradrenergic Neurotransmission in Isolated Rat Radial Artery. *J Pharmacol Sci* 2009;311:299–311. <https://doi.org/10.1254/jphs.09135FP>.
- [83] Geffeney S, Jr EDB, Ruben PC, Iii EDB. Mechanisms of Adaptation in a Predator-Prey Arms Race: TTX-Resistant Sodium Channels. *Science* (80-) 2002;297:1336–9. <https://doi.org/10.1126/science.1074310>.
- [84] Geffeney SL, Fujimoto E, Iii EDB. Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator – prey interaction. *Nature* 2005;434:759–63. <https://doi.org/10.1038/nature03392>.
- [85] Campos R, Mónica FZ, Rodrigues RL, Rojas-Moscoso JA, Moreno RA, Cogo JC, et al. Tetrodotoxin-insensitive electrical field stimulation-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* corpus cavernosum. *PLoS One* 2017;12:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183766>.
- [86] Sheppard MN, Kurian SS, Henzen-Logmans SC, Michetti F, Cocchia D, Cole P, et al. Neurone-specific enolase and S-100: New markers for delineating the innervation of the respiratory tract in man and other mammals. *Thorax* 1983;38:333–40. <https://doi.org/10.1136/thx.38.5.333>.
- [87] Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, et al. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation* 2000;101:1960–9. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.16.1960>.
- [88] Huang J, Zhu C, Zhang P, Zhu Q, Liu Y, Zhu Z, et al. S100+ cells: A new neuro-immune cross-talkers in lymph organs. *Sci Rep* 2013;3:1–8. <https://doi.org/10.1038/srep01114>.
- [89] Campos R, Justo AFO, Mónica FZ, Cogo JC, Moreno RA, de Souza VB, et al. Electrical field-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae are caused by endothelium- derived

- catecholamine. PLoS One 2018;13:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573>.
- [90] Gonzalez-Martinez T, Perez-Piñera P, Díaz-Esnal B, Vega JA. S-100 proteins in the human peripheral nervous system. *Microsc Res Tech* 2003;60:633–8. <https://doi.org/10.1002/jemt.10304>.
- [91] Geary GG, Maeda G, Gonzalez RR. Endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation activated by electrical field stimulation. *Acta Physiol Scand* 1997;160:219–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1997.00141.x>.
- [92] Frank W, Bevan JA, Ezelectricazstim- JAB. Electrical stimulation dependent relaxation causes endothelium- in lung vessels. *Am J Physiol* 1983;244:H793-8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1983.244.6.H793>.
- [93] Zippel N, Loot AE, Stingl H, Randriamboavonjy V, Fleming I, Fisslthaler B. Endothelial AMP-Activated Kinase α 1 Phosphorylates eNOS on Thr495 and Decreases Endothelial NO Formation.pdf. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19092753>.
- [94] Novella S, Prieto D, Benedito S. Diminished Neurogenic Femoral Artery Vasoconstrictor Response in a Zucker Obese Rat Model : Differential Regulation of NOS and COX Derivatives. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106372>.
- [95] Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Transmissão Noradrernérgica*. Rang Dale *Farmacol.*, Elsevier Ltd; 2007, p. 170–5.
- [96] Hakanson R. Histamine-forming isoenzymes in the fetal and adult mouse. *Eur J Pharmacol* 1967;1:34–41. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(67\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(67)90063-5).
- [97] Sorriento D, Santulli G, Del Giudice C, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension* 2012;60:129–36. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.189605>.
- [98] Pfeil U, Kuncova J, Br D, Paddenberg R, Rafiq A, Henrich M, et al. Intrinsic vascular dopamine – a key modulator of hypoxia-induced vasodilatation in splanchnic vessels. *J Physiol* 2014;8:1745–56. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.262626>.
- [99] Britto-Júnior J, Pinheiro DH, Justo AFO, Murari GMF, Campos R, Mariano

- F V., et al. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacol Res Perspect* 2020;e00612:1–12. <https://doi.org/10.1002/prp2.612>.
- [100] Britto-júnior J, Fernandes F, Figueiredo GM, Campos R, Agnaldo R, Antunes E, et al. Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels. *Life Sci* 2020;243:117257. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117257>.
- [101] Asa SL, Ezzat S, Mete O. The Diagnosis and Clinical Significance of Paragangliomas in Unusual Locations. *J Clin Med* 2018;7:1–15. <https://doi.org/10.3390/jcm7090280>.
- [102] Colen TH, Mihm FG, Mason TP, Roberson JB. Catecholamine-Secreting Paragangliomas: Recent Progress in Diagnosis and Perioperative Management. *Skull Base* 2009;1:377–85. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1224771>.
- [103] Filho P de A, Rapoport A, Alves VAF, Denardin OVP, Sobrinho J de A, de Carvalho MB. Paragangliomas of the head and neck: clinical, morphological and immunohistochemical aspects. *Sao Paulo Med J* 2001;119:114–8. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802001000300006>.
- [104] Schuller HM, Porter B, Riechert A. Beta-adrenergic modulation of NNK-induced lung carcinogenesis in hamsters. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:624–30. <https://doi.org/10.1007/pl00008474>.
- [105] Yang E V. Role for catecholamines in tumor progression Possible use for β -blockers in the treatment of cancer. *Cancer Biol Ther* 2010;10:30–2. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.1.12260>.
- [106] Entschladen F, Iv TLD, Lang K, Joseph J, Zaenker KS. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol* 2004;5:254–8. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01431-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01431-7).
- [107] Udumyan R, Montgomery S, Fang F, Almroth H, Valdimarsdottir U, Ekblom A, et al. Beta-Blocker Drug Use and Survival among Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2017;77:3700–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0108>.
- [108] Hao X, Fan L, Xiao Y, Sun M. The effects of beta-blocker use on cancer prognosis: a meta-analysis based on 319,006 patients. *Onco Targets*

Ther 2018;11:4913–44. <https://doi.org/10.2147/OTT.S167422>.

APÊNDICE

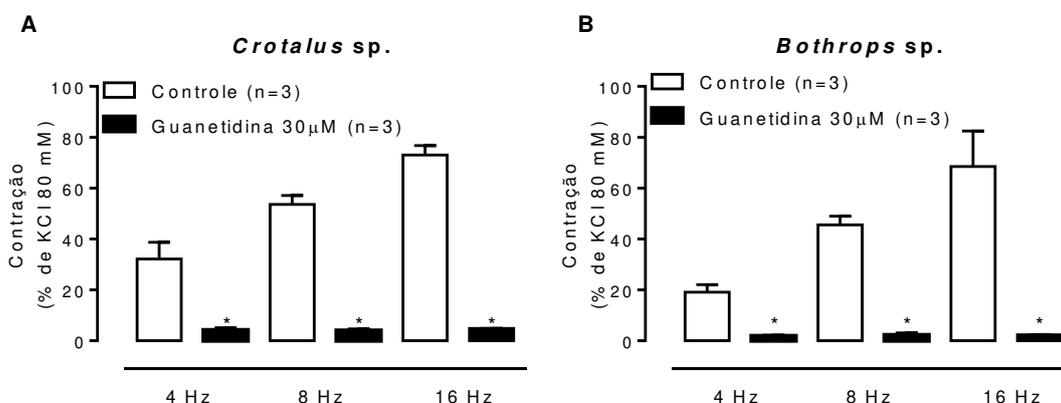


Figura 1. Efeito da guanetidina (30 µM) na contração induzida por estímulo elétrico de campo de aortas isolada de *Crotalus sp.* (A) e *Bothrops sp.* (B). Dados corrigidos pela contração máxima de KCl 80mM e expressos em média ± erro padrão da média. Teste *t-Student* pareado foi utilizado nesse estudo. * $p < 0.05$ comparado com o controle (n=3 para cada grupo).

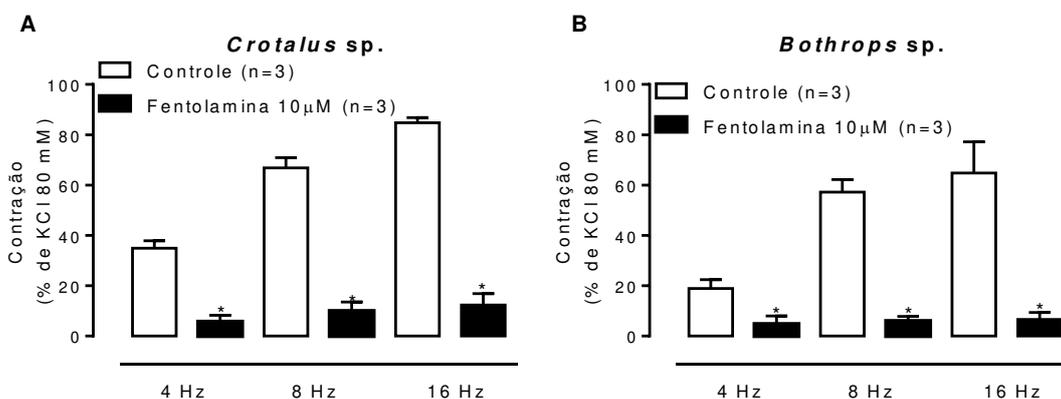


Figura 2. Efeito da fentolamina (10 µM) na contração induzida por estímulo elétrico de campo em aortas isolada de *Crotalus sp.* (A) e *Bothrops sp.* (B). Dados corrigidos pela contração máxima de KCl 80mM e expressos em média ± erro padrão da média. Teste *t-Student* pareado foi utilizado nesse estudo. * $p < 0.05$ comparado com o controle (n=3 para cada grupo).

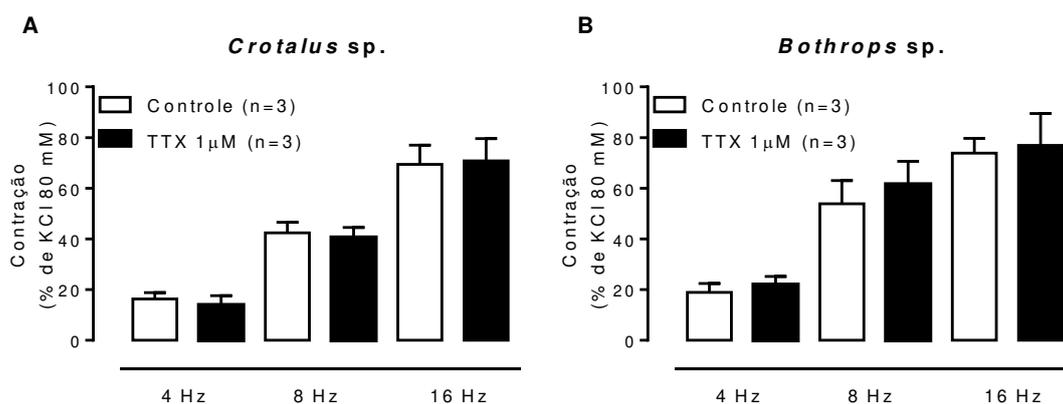


Figura 3. Efeito de TTX (1 µM) na contração induzida por estímulo elétrico de campo em aortas isoladas de *Crotalus sp.* (A) e *Bothrops sp.* (B). Dados corrigidos pela contração máxima de KCl 80mM e expressos em média ± erro padrão da média. Teste *t-Student* pareado foi utilizado nesse estudo. * $p < 0.05$ comparado com o controle (n=3 para cada grupo).

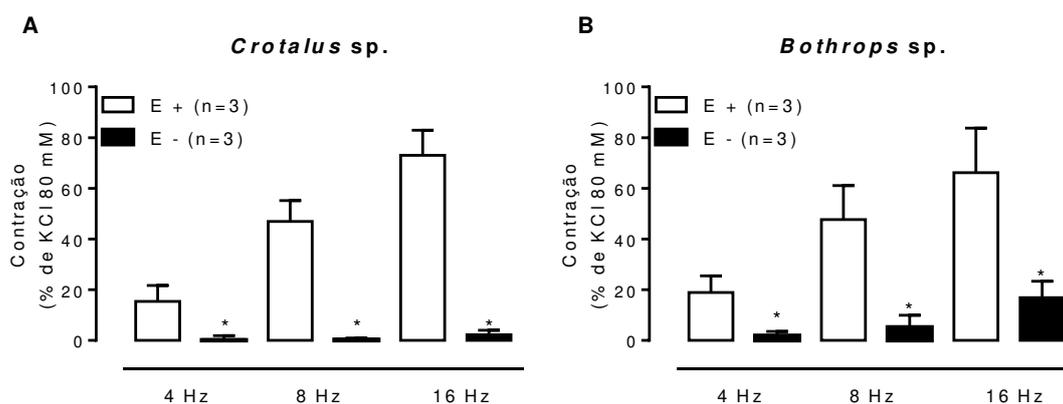


Figura 4. Efeito da remoção do endotélio na contração induzida por estímulo elétrico de campo em aortas isoladas de *Crotalus sp.* (A) e *Bothrops sp.* (B). Dados corrigidos pela contração máxima de KCl 80mM e expressos em média ± erro padrão da média. Teste *t-Student* pareado foi utilizado nesse estudo. * $p < 0.05$ comparado com o controle (n=3 para cada grupo).

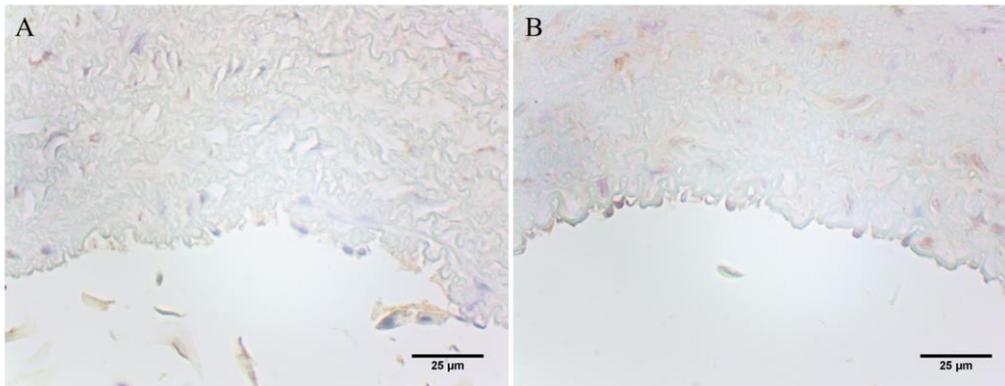


Figura 1. Painel representativo da análise imuno-histoquímica. Controle negativo do anticorpo anti-TH (omissão do anticorpo primário) em aorta de *Crotalus* sp. (A) e *Bothrops* sp. (B). magnificação original 400X.

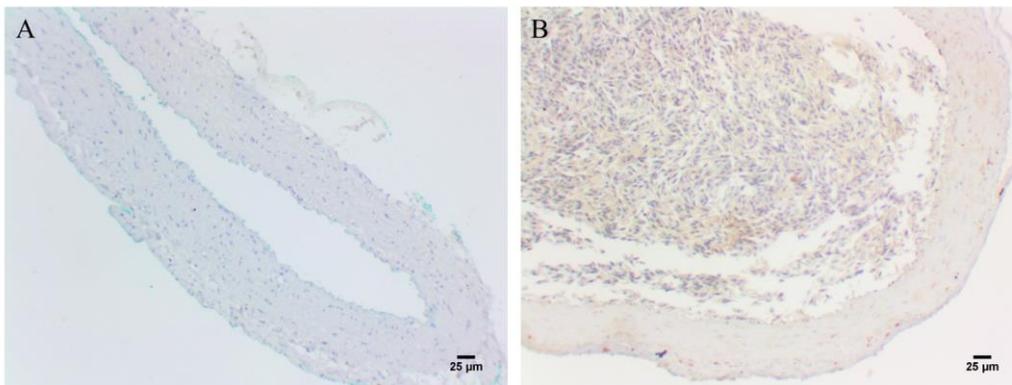


Figura 2. Painel representativo da análise imuno-histoquímica. Ausência da proteína S100 em aorta de *Crotalus* sp. (A) e *Bothrops* sp. (B). Magnificação original 100X.



Final Report – BEPE

Study of the regulation of eNOS Tyr81 phosphorylation

ALBERTO FERNANDO OLIVEIRA JUSTO

Supervisor in Brazil: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences,
University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

Supervisors abroad: Prof. Dr. Ingrid Fleming and Dr. Mauro Siragusa

Goethe Universität Frankfurt, Institute for Vascular Signalling
Centre for Molecular Medicine, Frankfurt am Main, Germany

Process number: 2018/10414-0

Period: September 2018 - September 2019.

Frankfurt am Main,
2019

ABSTRACT

Background and Aims: Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VEPTP) is a receptor-type phosphatase expressed at the cell membrane and at endothelial adherens junctions where it dephosphorylates and inactivates the tyrosine kinase receptor Tie-2. As Tie2 is a key regulator of vascular integrity, upregulation of VE-PTP is associated with vasculopathies (e.g. diabetic retinopathy) characterized by endothelial dysfunction and vascular destabilization. In diabetic patients, direct VE-PTP pharmacological inhibition was shown to restore Tie2 signalling thus promoting vascular integrity. In addition, VE-PTP pharmacological inhibition was associated with a decrease in blood pressure, an effect that was linked with the activation of the kinase Akt and consequent phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) on the stimulatory site S1177. While the phosphorylation of eNOS on S1177 is certainly associated with increased enzymatic activity, the phosphorylation of eNOS on Y81 was also shown to play an important role in the modulation of eNOS enzymatic activity, and may also contribute to the blood pressure lowering effects mediated by VE-PTP inhibition. To date, Src is the only kinase reported to phosphorylate eNOS on Y81, and the identity of a tyrosine phosphatase dephosphorylating this site is still unknown. Therefore, the aim of this study was to investigate whether and how VEPTP modulates the phosphorylation of eNOS on Y81.

Methods and Results: Concentration-response relaxation induced by a VE-PTP inhibitor (AKB-9785, AKB) was assessed in mice aortae in the presence and absence of a nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME). Phenylephrine-induced contraction and acetylcholine- as well as sodium nitroprusside-induced relaxation were analysed in the presence of AKB or solvent. VE-PTP inhibition concentration dependently induced vascular relaxation and enhanced acetylcholine-induced relaxation but had no effects on contraction and nitroprusside-induced relaxation. Human endothelial cells adenovirally transduced with a FLAG-tagged human eNOS and then treated for 30 min with increasing concentrations of AKB demonstrated a concentration-dependent increase in the phosphorylation of eNOS on Y81 and S1177 eNOS and consequently higher NO production. Since VE-PTP is expressed at the

endothelial cell membrane and at endothelial adherens junctions and may therefore affect the endothelial mechanotransduction machinery that leads to eNOS activation, human endothelial cells were pre-incubated with AKB and then treated with Yoda1, a Piezo1 channel agonist that mimics shear stress. VE-PTP inhibition potentiated Yoda-1-induced NO production as well as the phosphorylation of eNOS on Y81 and S1177. The AKB-dependent enhanced phosphorylation of eNOS on Y81 was however only partially inhibited by Src kinase inhibition, suggesting a role for another tyrosine kinase. As the Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1 (ABL1) plays an important role in the maintenance of vascular integrity and function, ABL1 was knockdown by small interfering RNA and the effects of VE-PTP inhibition on Yoda-1 dependent eNOS phosphorylation and NO production were investigated. Similar to the effects observed after Src inhibition, the phosphorylation of eNOS on Y81 and NO production were partially inhibited in ABL1 knockdown endothelial cells. To assess whether VE-PTP may directly dephosphorylate eNOS Y81, an in vitro phosphatase assay was carried out. VE-PTP time-dependently dephosphorylated Y81 eNOS, an effect that was inhibited by AKB.

Conclusions: These findings provide novel insights into the mechanisms leading to enhanced eNOS activity upon VE-PTP inhibition. Moreover, ABL1 and VE-PTP are novel direct modulators of the phosphorylation of eNOS on Y81.