



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFAEL DE MORAIS CAMPOS

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)

CAMPINAS

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFAEL DE MORAIS CAMPOS

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)

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 EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
RAFAEL DE MORAIS CAMPOS, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 140731/2013-0
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9816-2061>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

C157e Campos, Rafael de Moraes, 1988-
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) / Rafael de Moraes Campos. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Músculo liso. 2. Óxido nítrico. 3. Répteis. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evidence of nitreergic participation in the control of aortae and corpora cavernosa tonus of reptiles *Chelonoidis carbonaria* (turtle) and *Pantherophis guttatus* (corn snake)

Palavras-chave em inglês:

Muscle, Smooth

Nitric oxide

Reptiles

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto De Nucci [Orientador]

Stephen Hyslop

Sisi Marcondes Paschoal

Angelina Zanesco

Marcelo Nicolás Muscará

Data de defesa: 05-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RAFAEL DE MORAIS CAMPOS

ORIENTADOR PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI**
- 2. PROF. DR. STEPHEN HYSLOP**
- 3. PROF^a. DR^a SISI MARCONDES PASCHOAL**
- 4. PROF^a DR^a ANGELINA ZANESCO**
- 5. PROF. DR. MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ**

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 da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [05/06/2017]

Dedicatória

À minha mãe, Elizabeth, fonte inesgotável de amor, força e zelo e ao amigo e Deus encarnado, Jesus de Nazaré, a quem dedico esta e todas as futuras conquistas.

Agradecimentos

Ao Deus PAI, que apesar de sua soberania e habitar no mais alto do céu, se importa comigo e tem sido meu companheiro e meu refúgio.

A Jesus Cristo pessoa que criou os céus e a terra e que tem me chamado para desfrutar da sua amizade, do seu amor e da sua paz.

A minha Mãe, Elizabeth Elias, minha inspiração de perseverança em buscar pelos meus sonhos.

Ao Prof Dr Gilberto De Nucci, um dos cientistas mais brilhantes que conheci, pela confiança construída nesses anos, sua amizade e inspiração diária em como conduzir o pensamento científico.

À Profa Dr Fabíola Taufic pela imprescindível colaboração nesse trabalho e por sua amizade.

Aos amigos da cascata Julio Rojas-Moscoso, Luiz Ricardo Kiguti, Alberto Justo, Eduardo Alexandre, Fabiano Calmasini, Mariana Gonçalves, Sandra Bonilla e Renan Donomae.

Aos amigos de laboratório Cristiano Vieira, Gláucia Melo, Diana Majolli, Rita de Cássia, Edith Tavares e Caroline Lescano.

Às funcionárias Maísa, Cidinha e Ellen Landucci pelo carinho e atenção diário.

Ao meu primo Wendell Moraes da Frota, *in memoriam*, pelo seu carinho e incentivo aos meus estudos durante grande parte do meu doutorado.

RESUMO

Aves e mamíferos são animais endotérmicos que evoluíram de ancestrais comuns aos répteis. Devido à frequência cardíaca em répteis ser baixa, a manutenção da pressão arterial nestes animais ocorre, em grande parte, pela regulação local do tônus vascular. Os répteis também constituem uma classe importantíssima no estudo evolutivo da fisiologia da ereção, pois constituem os primeiros animais a desenvolverem pênis intromitente. Visto que o óxido nítrico é um importante mediador endógeno envolvido na regulação do tônus vascular e cavernosal de mamíferos, este trabalho propõe investigar o envolvimento deste neurotransmissor no controle do tônus de aorta e corpo cavernoso dos répteis *Chelonoidis carbonaria* (jabuti-piranga) e *Pantherophis guttatus* (cobra dos milharais). Anéis de aortas de ambos os répteis foram contraídos através de estimulação de campo elétrico (EFS) na presença e ausência de fentolamina, guanetidina e tetrodotoxina. Anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* foram pré-contraídos por acetilcolina (ACh) e submetidos a diferentes concentrações de adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e histamina na presença e ausência do inibidor da sintase de óxido nítrico, L-NAME (100 μ M). Curvas concentrações-respostas ao nitroprussiato de sódio (SNP), tadalafil, BAY 41-2272 e BAY 60-2770 foram realizadas na presença do inibidor do sítio heme da enzima guanilato ciclase solúvel (ODQ; 10 μ M). Foram realizadas análise transcriptômica em aortas de *C. carbonaria* para proteínas envolvidas na síntese de catecolaminas e na via NO-GCs-GMPc. Aortas de *P. guttatus* foram pré contraídas por fenilefrina (PHE) e curvas concentrações-respostas à ACh, SNP e BAY 41-2272 foram construídas na presença de L-NAME e ODQ, respectivamente. A fim de caracterizar a regulação do tônus de corpos cavernosos de *P. guttatus*, os tecidos foram contraídos por EFS na presença e ausência de fentolamina, guanetidina, tetrodotoxina e substituição equimolar de cloreto de sódio por N-metil D-glucamina (NMDG). Corpos cavernosos de *P. guttatus* foram pré contraídos por fenilefrina e realizado curvas concentrações-repostas à ACh e SNP, na ausência e presença de L-NAME e ODQ, respectivamente. Em outro momento, realizou-se relaxamento induzido por EFS na presença de TTX e L-NAME em tecidos pré-contraídos por fenilefrina. Estímulo de campo elétrico induziu resposta direta ao músculo liso de aorta de *C. carbonaria* inviabilizando a caracterização farmacológica do evento, entretanto contrações induzidas por EFS em aorta de *P. guttatus* foram reduzidas na presença de fentolamina e guanetidina e resistentes ao tratamento a TTX. ATP, ADP e histamina promoveram respostas relaxantes dependente de concentração em aorta de *C. carbonaria* e seus efeitos máximos foram reduzidos na presença de L-NAME.

SNP induziu resposta relaxante em aorta das duas espécies investigadas e tadalafil promoveu resposta relaxante em aorta de *C. carbonaria*. SNP e tadalafil tiveram suas curvas deslocadas para direita na presença de ODQ. BAY 41-2272 e BAY 60-2770 promoveram relaxamento em aorta de *C. carbonária*. Proteínas para eNOS e sGC foram encontradas no perfil transcriptômico com identidade superior a 80% quando comparado às proteínas humanas. Não foi encontrado proteína para nNOS e as demais proteínas investigadas não foram aprovadas no processo de validação transcriptômico. A resposta relaxante promovida por ACh foi inibida na presença de L-NAME em aorta de *P. guttatus* e a potência do BAY 41-2272 é menor quando comparado a encontrada em aorta de *C. carbonaria*. Corpo cavernoso de *P. guttatus* é sensível ao tratamento a fentolamina e guanetidina, entretanto assim como em aorta de *P. guttatus*, é resistente à TTX. O relaxamento induzido por ACh foi parcialmente abolido por L-NAME em corpo cavernoso de *P. guttatus*. Neste tecido, as curvas concentrações-respostas a SNP foram intensamente deslocadas na presença de ODQ e relaxamentos induzidos por EFS foram insensíveis ao tratamento com TTX e a L-NAME. Concluimos que a via NO-GCs-GMPc está envolvida no controle do tônus de aortas e de corpos cavernosos de *C. carbonaria* (jabuti-piranga) e *P. guttatus* (Cobra dos milharais) e que existem canais de sódio resistentes TTX em tecidos de *P. guttatus*.

Palavras chaves: músculo liso, óxido nítrico, répteis.

ABSTRACT

Due to their low heart rate the regulation of blood pressure in reptile is mainly controlled by peripheral resistance arterial pressure. Reptiles are also the first animals to develop an intromittent penis being an important animal model to study the evolution of penile erection. As a result of nitric oxide (NO) being an endogenous mediator involved on vascular and corpora cavernosa tone in mammals in this study is investigated the functional presence of NO pathway in aortae and corpora cavernosa of *Chelonoidis carbonaria* (turtle) and snake *Pantherophis guttatus* (snake). Electrical field stimulation-induced contractions were performed in aortic rings of both reptiles in presence and absence of phentolamine, guanethidine and tetrodotoxin. Aortic rings of *C. carbonaria* were pre-contracted with acetylcholine (ACh) and concentration-response curves to adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and histamine in presence and absence of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME 100 μ M) were performed. Concentration-response curves to sodium nitroprusside (SNP), tadalafil, BAY 41-2272 and BAY 60-2770 were also constructed in presence of soluble guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 10 μ M) in aortic rings of *C. carbonaria*. Transcriptomic analysis were performed for proteins involved on catecholamine synthesis and NO-sGC-GMPc pathway. Aortic rings of *P. guttatus* were pre-contracted with phenylephrine (PHE) and concentration-curves were constructed to ACh, SNP and BAY 41-2272 in presence and absence of L-NAME e ODQ, respectively. In order to characterize the regulation of corpora cavernosa tone, EFS-induced contractions were performed on corpora cavernosa of *P. guttatus* corpora cavernosa in presence and absence of phentolamine, guanethidine, tetrodotoxin and Krebs' modified solution (equimolar substitution of sodium chloride by N-methyl D-glucamine) (NMDG). Strips were also pre-contracted with phenylephrine and concentration response-curves to ACh and SNP were constructed in presence and absence of L-NAME and ODQ, respectively. In other set of protocols, EFS-induced-relaxation were performed in presence and absence of L-NAME (100 μ M) and TTX (1 μ M) in tissue pre-contracted with phenylephrine. EFS induced a direct stimulus on *C. carbonaria* aortic rings, however in *P. guttatus* aortic rings EFS-induced contractions were reduced in presence of phentolamine and guanethidine. No alteration was observed in TTX treatment in *P. guttatus* aortic rings. ATP, ADP and histamine induced relaxation concentration-dependently in *C. carbonaria* aortic rings and their effects were reduced in the presence of L-NAME. SNP evoked relaxant response in both tissues investigated. BAY 41-2272 and BAY 60-2770 promoted relaxation on *C. carbonaria* aortic rings. Tadalafil relaxed *C. carbonaria* aortic rings. eNOS and sGC proteins were found on transcriptome

analysis with identity superior to 70 % when compared with human library. nNOS was not found on *C. carbonaria* aortic ring transcriptome and the other proteins investigated were not validated on transcriptome analysis. ACh-induced relaxation was abolished in presence of L-NAME on *P. guttatus* aortic ring and BAY 41-2272 potency was lower in snake and compared to turtle. EFS-induced contractions in *P. guttatus* corpora cavernosa strips were reduced in presence of phentolamine and guanethidine. No alteration was observed after TTX treatment in *P. guttatus* corpora cavernosa. ACh-induced relaxations were partially inhibited by L-NAME and pre-treatment with ODQ promoted a rightshift on SNP curves. EFS-induced relaxations were not altered in presence of TTX or L-NAME in *P. guttatus* corpora cavernosa precontracted with phenylephrine. In conclusion, the NO-sGC-cGMP pathway are involved on regulation of vascular and corpora cavernosa of *C. carbonaria* and *P. guttatus* and tetrodotoxin sodium channels resistance were found on *P. guttatus* preparations.

Key words: smooth muscle, nitric oxide, reptiles,

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação comparativa da disposição das câmaras cardíacas em anfíbios (tricavitários), répteis (com exceção de crocodilianos; tricavitários septados) e mamíferos (tetracavitários) 22
- Figura 2.** Estímulo de campo elétrico em anéis de aorta isolados de *Chelonoidis carbonaria* na presença e na ausência de tetrodotoxina, guanetidina, fentolamina, suramin, fisiostigmina e inibidores muscarínicos 34
- Figura 3.** Contrações induzidas por estímulo de campo elétrico em anéis de aortas isoladas de *P. guttatus* na presença e ausência de tetrodotoxina, guanetidina e fentolamina, 35
- Figura 4.** Curva concentração-resposta à noradrenalina e acetilcolina na ausência e presença de L-NAME e de atropina em aorta isolada de *C. carbonária* 37
- Figura 5.** Curva concentração-resposta à adenosina trifosfato, adenosina difosfato e histamina na ausência e presença de L- NAME em anéis de aorta de *C. carbonaria* pré-contraídos com acetilcolina 38
- Figura 6.** Curva concentração-resposta à histamina na ausência e presença de cimetidina ou pirlamina em anéis de aorta de *C. carbonaria* pré-contraídos com acetilcolina (3 μ M). 39
- Figura 7.** Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272 em anéis de aorta isolados de *P. guttatus* pré contraídos com fenilefrina (PE). 40
- Figura 8.** Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) na presença e na ausência de L-NAME em anéis de aortas de *P. guttatus* pré-contraídos com fenilefrina (PE; 3 μ M). 41
- Figura 9.** Curva concentração-resposta à nitroprussiato de sódio (SNP) na presença e na ausência do inibidor da enzima guanilato cilase solúvel (ODQ) em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* e *P.* 43

guttatus pré-contraídos com acetilcolina (ACh; 3μM) e fenilefrina (PE; 3μM), respectivamente.

Figura 10.	Curva concentração-resposta ao tadalafil na presença e ausência de ODQ em anéis de aorta isolados de <i>C. carbonaria</i> pré-contraídos com acetilcolina (3 μM).	44
Figura 11.	Curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 e BAY 60-2770 na presença e ausência de ODQ em anéis de aortas isolados de <i>C. carbonaria</i> . Curva concentração resposta ao BAY 41-2272 na presença e na ausência de ODQ e L-NAME em anéis de aortas isolados de <i>P. guttatus</i> .	45
Figura 12.	Hemipenis de <i>C. d. terrificus</i> (ventral).	67
Figura 13.	Microscopia de varredura da região do corpo do hemipenis de <i>C. d. terrificus</i> .	68
Figura 14.	As vias centrais e periféricas que regulam a ereção peniana.	70
Figura 15.	Ilustração representativa do fenômeno hemodinâmico envolvido no estado detumescente.	71
Figura 16.	Mecanismo de ação dos inibidores de PDE5	73
Figura 17.	Curva concentração resposta a acetilcolina na ausência e presença de L-NAME e curva concentração- resposta ao SNP e BAY 41-2272 na ausência e presença de ODQ.	74
Figura 18.	Relaxamento frequência dependente induzido por estimulação de campo elétrico em hemipenis de <i>C. d. terrificus</i> e <i>c.jachus</i> na ausência e presença do L-NAME, ODQ e tetrodotoxina.	75
Figura 19.	Contrações induzidas por estímulo de campo elétrico em tiras de corpos cavernosos isoladas de <i>P. guttatus</i> na presença e ausência de fentolamina, guanetidina e tetrodotoxina.	81
Figura 20.	Estímulo de campo elétrico em tiras de corpos cavernosos isolados de <i>P. guttatus</i> nutridos por solução de Krebs- Henseleit (modificado através de substituição equimolar de NaCl por NMDG).	82

Figura 21.	Curvas concentração resposta à Acetilcolina na presença de L-NAME e nitroprussiato de sódio na presença de ODQ.	83
Figura 22.	Estímulo de campo elétrico em tiras de corpos cavernosos pré-contráídos por fenilefrina (3uM) na presença e ausência de tetrodotoxina e de L-NAME.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sumário de resultados referentes a busca de NOS em vasos de várias espécies de vertebrados.	24
Tabela 2.	Valores de potência e eficácia de noradrenalina e acetilcolina na presença e ausência de L-NAME em anéis de aorta isolados de <i>C. carbonária</i>	37
Tabela 3.	Valores de potência e eficácia de ATP, ADP e histamina em anéis de aorta isolados de <i>C. carbonaria</i>	39
Tabela 4.	Valores de potência e eficácia de histamina na presença e ausência de pirilamina e cimetidina em anéis de aorta isolados de <i>C. carbonaria</i>	40
Tabela 5.	Valores de potência e eficácia de acetilcolina, nitroprussiato de sódio e BAY 41-2272 em anéis de aorta isolados de <i>P. guttatus</i>	41
Tabela 6.	Valores de potência e eficácia de acetilcolina na presença e ausência de L-NAME em anéis de aorta isolados de <i>P. guttatus</i>	42
Tabela 7.	Valores de potência e eficácia de nitroprussiato de sódio na presença e ausência de ODQ em anéis de aorta isolados de <i>C. carbonaria</i> e <i>P. guttatus</i>	43
Tabela 8.	Valores de potência e eficácia de BAY 41-2272 e BAY 60-2770 na presença e ausência de ODQ em anéis de aorta isolados de <i>C. carbonaria</i> e <i>P. guttatus</i>	46
Tabela 9.	Contigs da <i>C. carbonaria</i> que representam a proteína tirosina hidroxilase.	50
Tabela 10.	Contigs da <i>C. carbonaria</i> que representam a proteína dopa descarboxilase	50
Tabela 11.	Contigs da <i>C. carbonaria</i> que representam a proteína dopamine beta-hydroxilase	51
Tabela 12.	Contigs da <i>C. carbonaria</i> que representam a proteína fosfodiesterase do tipo 5	52

Tabela 13.	Contigs da <i>C. carbonaria</i> que representam a proteína guanilato ciclase solúvel	53
Tabela 14.	Contigs da <i>C. carbonaria</i> que representam a proteína óxido nítrico sintase neuronal (nNOS).	54
Tabela 15.	Contigs da <i>C. carbonaria</i> que representam a proteína óxido nítrico endotelial (eNOS)	55
Tabela 16.	Resultados sumarizados das validações para nas bibliotecas de cérebro, aorta e corpo cavernoso de <i>C. carbonaria</i>	56
Tabela 17.	Contigs do transcriptoma de aorta isolada de <i>C. carbonaria</i> foram comparadas com proteínas humanas.	57
Tabela 18.	Descrição dos valores de potência e eficácia dos agonistas acetilcolina e nitroprussiato de sódio em corpo cavernoso isolado de <i>P. guttatus</i> .	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh, acetilcolina

ANOVA, análise de variância

ATP, adenosina trifosfato

DAG, diacilglicerol

E_{max}, resposta máxima

eNOS, sintase de óxido nítrico endotelial

GCs, guanilato ciclase solúvel

GMP_c, monofosfato cíclico de guanosina

GTP, trifosfato de guanosina

i.p., intraperitoneal

iNOS, sintase de óxido nítrico induzível

L-NAME, N-nitro L-arginina metil éster

NANC, não-adrenérgico/não colinérgico

NA, noradrenalina

nNOS, sintase de óxido nítrico neuronal

NO, óxido nítrico

NOS, sintase de óxido nítrico

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

PDE-5, fosfodiesterase-5

pEC₅₀, potência

FE, fenilefrina

PLC, fosfolipase C

PKA, proteína quinase dependente de AMPc

PKC, proteína quinase dependente de cálcio

PKG, proteína quinase dependente de GMPc

LISTA DE REAGENTES E FORNECEDORES

Acetilcolina, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO, EUA

BAY 41-2272, Bayer Health Care, Wuppertal, ALE

BAY 60-2770 Bayer Health Care, Wuppertal, ALE

Cimetidina Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO, EUA

Fentolamina, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO, EUA

Fenilefrina, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO EUA

Guanetidina Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO EUA

Histamina, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO EUA

Nitroprussiato de sódio, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO, EUA

[1,2,4]oxalodiazolo[4,3]oxonalina, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO,
EUA

Pirilamina, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO, EUA

Tetrodotoxina, Sigma-Aldrich, Missouri, St Louis, MO, EUA

Tadalafil Biolab Sanus Farmacêutica, São Paulo, BRA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Óxido nítrico em mamífero e a regulação do tônus vascular.....	22
1.2 Óxido nítrico em não mamíferos.....	23
1.3 Canais de sódio tetrodotoxina resistente em répteis.....	25
1.4 Justificativa e relevância.....	27
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivos parte 1.....	28
2.2 Objetivos específicos parte 1.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Animais de experimentação.....	29
3.2. Protocolos Funcionais.....	29
3.2.1 Isolamento e montagem dos tecidos.....	29
3.2.2 Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica em aortas de <i>Chelonoidis carbonaria</i> e <i>Pantherophis guttatus</i>	30
3.2.3 Avaliação da influência simpática e parassimpática sobre os tônus de anéis de aorta isolados de <i>Chelonoidis carbonaria</i>	30
3.2.4 Caracterização do relaxamento dependente de óxido nítrico.....	31
3.2.5 Caracterização downstream da via NO-GCs-GMPc em anéis de aortas isolados de <i>C.carbonaria</i> e <i>P.guttatus</i>	31
3.2.6 Análise dos resultados.....	31
3.3. Construção de bibliotecas de <i>C.carbonaria</i> em cérebro, aorta e corpo cavernoso.....	32
3.3.1 Clusterização do Transcriptoma.....	32
3.3.2 Blast: Buscando as proteínas.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Caracterização da contração induzida por estímulo de campo elétrico em anéis de aortas isolados de <i>C. carbonaria</i> e <i>P. guttatus</i>	34

4.2	Avaliação da influência simpática e parassimpática sobre os tônus de anéis de aorta isolados de <i>C. carbonaria</i>	36
4.3	Caracterização do relaxamento óxido nítrico-dependente em anéis de aorta isolados de <i>C. carbonária</i>	38
4.4	Caracterização downstream da via NO-sGC-cGMP em anéis de aortas isolados de <i>C. carbonaria</i> e <i>P. guttatus</i>	40
4.5	Análise transcriptômica.....	46
4.5.1	Primeira etapa: Hits encontrados.....	48
4.5.2	Segunda etapa: Hits Validados	49
5.	DISCUSSÃO	58
6.	Conclusão parte 1	65
	CAPÍTULO II	66
7	INTRODUÇÃO	70
7.1	Histórico da Fisiologia da Ereção.....	68
7.2	Neurofisiologia da ereção em mamíferos.....	69
7.3	O óxido nítrico e a ereção peniana em mamíferos.....	72
7.4	Óxido nítrico e a ereção peniana em serpentes.....	74
7.5	Justificativa e relevância.....	75
8	Objetivos.....	77
8.1	Objetivos parte 2.....	77
9	Materiais e Métodos	78
9.1	Animais de experimentação.....	78
9.2	Protocolos funcionais.....	78
9.2.1	Isolamento e montagem dos tecidos.....	78
9.2.2	Caracterização da contração induzida por estimulação de campo elétrico em corpo cavernoso de <i>P.guttatus</i>	79
9.2.3	Avaliação do efeito da substituição do equimolar do NaCl por N-metil-D-	

glucamina na contração induzida por estimulação elétrica.....	79
9.2.4 Avaliação da presença da via óxido nítrico- guanilato ciclase solúvel.....	79
9.2.5 Caracterização do relaxamento evocado por estímulo de campo elétrico...	80
9.3 Análise dos Resultados.....	80
10. RESULTADOS PARTE II	81
10.1 Caracterização da contração induzida por estimulação elétrica em corpo cavernoso de <i>P. guttatus</i>	81
10.2 Efeito da substituição equimolar do NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estímulo de campo elétrico em corpo cavernoso de <i>P. guttatus</i>	82
10.3 Avaliação da presença da via óxido nítrico- guanilato ciclase solúvel.....	82
10.4 Caracterização do relaxamento evocado por estímulo de campo elétrico em corpos cavernosos isolados de <i>P.s guttatus</i>	84
11. DISCUSSÃO	85
12. CONCLUSÃO PARTE II	88
13. REFERÊNCIAS	89
14. ANEXO	100

INTRODUÇÃO

Aves e mamíferos são animais endotérmicos que evoluíram de ancestrais comuns aos répteis¹. Devido ao elevado consumo de oxigênio necessário para manter diversos processos vitais (dentre eles a temperatura corporal), animais endotérmicos desenvolveram um complexo sistema de controle de nutrientes e regulação da resistência vascular. Exceto os crocodilianos, em geral os répteis apresentam coração tricavitário (Fig. 1), de forma que por não haver diferença de pressões nos ventrículos, as pressões pulmonares e sistêmicas tendem a ter o mesmo valor². Devido à frequência cardíaca em répteis ser baixa, a manutenção da pressão arterial nestes animais ocorre, em grande parte, pela regulação local do tônus vascular².

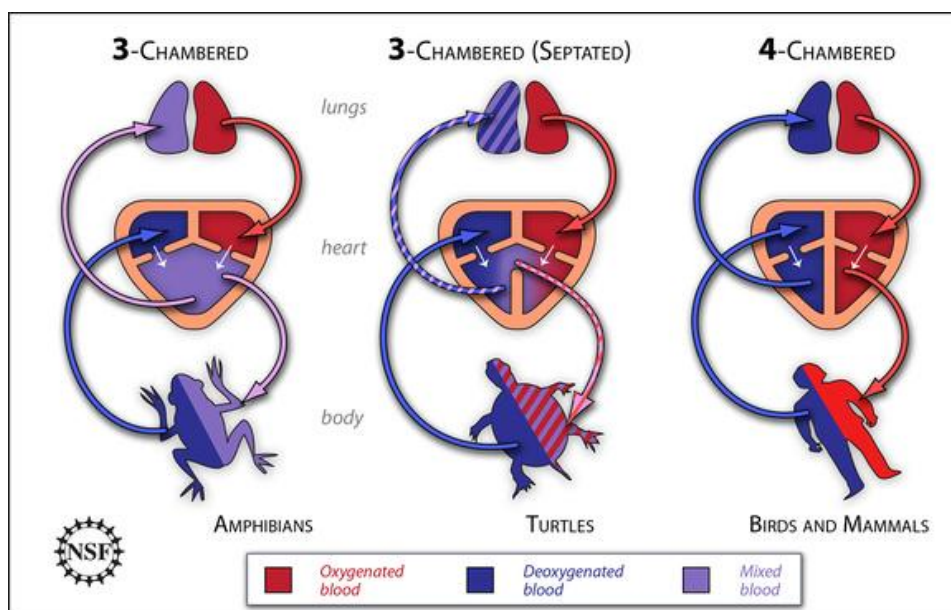


Figura 1: Representação comparativa da disposição de câmaras cardíacas em anfíbios (tricavitários), répteis (com exceção de crocodilianos; tricavitários septados) e mamíferos (tetracavitários). Referência 3

1.1 Óxido nítrico em mamífero e a regulação do tônus vascular

No final da década de 1970, estudos indicaram que nitrocompostos (nitratos orgânicos) promoviam vasorelaxamento ao ativar a enzima guanilato ciclase solúvel⁴. Pouco tempo após este achado, Furchgott e Zawadzki ao realizarem protocolos funcionais em artéria aorta isolada de coelho,

demonstraram a relação entre a preservação do endotélio e o efeito relaxante promovido após adição de acetilcolina, indicando a relação entre integridade endotelial e produção de um mediador até então desconhecido no qual foi denominado de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)⁵. No final da década de 1980 os efeitos do EDRF foram associados com a produção de óxido nítrico e este gás identificado como neurotransmissor⁶⁻⁷.

O óxido nítrico (NO) é produzido através da enzima óxido nítrico sintase na qual se apresenta em três isoformas (endotelial, neural e induzível)⁸⁻¹⁰. As isoformas endotelial e neural são classificadas como constitutivas, pois são continuamente produzidas e são ativadas na presença de cálcio. A isoforma induzível é expressa somente sob determinadas condições e não é cálcio-dependente. A isoforma endotelial (NOS-3) desempenha um papel importantíssimo na geração de NO em músculo liso vascular. Isto pode ser demonstrado pelo achado de que a pressão arterial em camundongos *knok out* para NOS-3 é 30% superior quando comparados com animais selvagens¹¹.

O NO ao interagir com seu alvo endógeno, a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), potencializa o catabolismo de guanosina trifosfato (GTP) gerando guanosina monofato cíclico (GMPc), e consequente ativação da proteína kinase G (PKG)⁴. Esta ativação resultará na abertura dos canais de potássio e hiperpolarização de membrana, sequestro do cálcio intracelular pelo retículo sarcoplasmático, inibição dos canais de cálcio com diminuição de seu influxo, causando relaxamento das células do músculo liso¹²⁻¹⁴. Entre outros possíveis mecanismos de ações da PKG está a alteração no estado de fosforilação da cadeia leve da miosina¹⁵.

1.2 Óxido nítrico em não mamíferos

O papel do NO no controle do tônus vascular tem sido pouco estudado em vertebrados não-mamíferos. Embora sua importância em peixes teleósteos ainda seja ambígua (seja pela não expressão da enzima ou por dificuldade em preservar o endotélio diante de uma pequena espessura dos vasos) (Tabela 1)¹⁶, o NO tem sido reportado como importante mediador envolvido no relaxamento de músculo liso vascular em aves¹⁷, répteis¹⁸ e anfíbios¹⁹.

Ensaio imuno-histoquímico demonstram a presença de NOS neuronal em nervos nitrérgicos localizados na região perivascular de peixes e anfíbios, indicando a participação nitrérgica no controle do tônus vascular ¹⁶. Entretanto, ao contrário do observado em mamífero, no qual a expressão de NOS-1 está localizada em nervos parassimpáticos, os vasos de peixes são inervados apenas por nervos simpáticos, indicando que nesses animais o mesmo terminal nervoso que libera agente contrátil (noradrenalina) também libera agente relaxante (óxido nítrico)²⁰.

Tabela 1: Sumário de resultados referentes a busca de NOS em vasos de várias espécies de vertebrados

	eNOS	nNOS
Peixes cartilaginosos: Tubarão	Não detectado	Nervos perivasculares de artérias e veias
Peixes ósseos	Não detectado	Nervos perivasculares de artérias e veias
Anfíbios: sapo	Não detectado	Nervos perivasculares de artérias e veias
Repteis: Lagarto	Presente em células endoteliais	Nervos perivasculares de artérias e veias
Aves: Pinguim	Presente em células endoteliais	Nervos perivasculares de artérias e veias
Mamíferos: Rato	Presente em células endoteliais	Não determinado

O NO desempenha um importante papel na regulação do tônus vascular de répteis. Estudos indicam que a infusão de doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP) induziu vasodilatação sistêmica em serpentes, tartarugas e lagartos²¹. Entretanto, a maior parte dos estudos avaliando o

papel do NO em tónus vasculares de répteis foram realizados em ensaios *in vivo*. Protocolos funcionais mostram que acetilcolina promove relaxamento NO-dependente em anéis de aorta isolados de crocodilo *Crocodylus porosus*²² e que a via de sinalização NO-sGC-cGMP está presente em anéis de aorta isolados de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel)²³. Entretanto, nenhum estudo foi realizado avaliando o efeito direto de agentes moduladores da cascata de sinalização NO-sGC-cGMP em quelônios (*Chelonoidis carbonaria*) ou em serpentes de hábitos constritor (*Pantherophis guttatus*), ambos animais evolutivamente mais antigos que serpentes perçõhentas.

1.3 Canais de sódio tetrodotoxina resistente em répteis

Os canais de sódio dependentes de voltagem são críticos para a iniciação e propagação do potencial de ação em células excitáveis (nervo, músculo e células neuroendócrinas), pois são responsáveis pela despolarização inicial da membrana. São também expressos em baixas quantidades em células não excitáveis; entretanto, neste caso, seu papel fisiológico não se encontra completamente elucidado²⁴⁻²⁷.

Os canais de sódio são constituídos por uma subunidade alfa (aproximadamente 260 kDa) associada a subunidades beta auxiliares (33-37 kDa)²⁸⁻³⁰. Todos os agentes farmacológicos que atuam em canais de sódio apresentam sítios ligantes na subunidade alfa. Foram descritos seis distintos sítios de ligação para neurotoxinas e um para anestésicos locais e fármacos relacionados²⁷.

Os vários tipos de canais de sódio têm sido identificados através de registro eletrofisiológico, purificação bioquímica e clonagem. Sabe-se que os mesmos pertencem à superfamília de canais iônicos que incluem os canais de potássio e de cálcio dependentes de voltagem³¹. Na atual nomenclatura, o nome de um canal iônico individual consiste do símbolo químico do principal íon permeador (Na) e o principal regulador fisiológico (voltagem), indicado em subscrito (Nav). O número após o subscrito indica a subfamília gênica (atualmente apenas Nav 1), e o número após o ponto identifica uma isoforma específica (Nav 1.1)³². Até o momento foram identificados

nove isoformas de canais de sódio dependentes de voltagem em mamíferos (Nav 1.1 a Nav 1.9). As isoformas Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3 e Nav 1.7 são altamente sensíveis à tetrodoxina (TTX), sendo expressos em neurônios centrais e periféricos. Nav 1.4 e Nav 1.6 também são sensíveis à TTX, sendo expressos em músculo esquelético e sistema nervoso central. Por outro lado, Nav 1.5, Nav 1.8 e Nav 1.9 são resistentes à TTX, sendo que a primeira isoforma é expressa em coração, enquanto que as duas últimas são expressas em neurônios ganglionares da raiz dorsal³³⁻³⁴. Os canais de sódio resistentes à TTX estão sendo estudados como alvos terapêuticos para analgésicos, uma vez que estão envolvidos na sensibilização dos neurônios aferentes primários que resulta na hiperalgesia encontrada nos processos inflamatórios³⁵⁻³⁷.

Canais de sódio resistentes a tetrodotoxina foram reportados na musculatura esquelética da serpente *Thamnophis sirtalis* e relacionados como característica evolutiva de proteção contra a presa *Taricha granulosa* que secreta tetrodotoxina por sua pele³⁸⁻⁴⁰. Entretanto, recentemente identificamos um novo canal de sódio dependente de voltagem em hemipênis da cascavel *C. d. terrificus*⁴¹. Esse novo canal de sódio apresenta características farmacológicas interessantes, a saber:

1. É um canal de sódio resistente à TTX. No nosso entendimento, é o primeiro canal com essa característica (TTX-resistente) expresso em terminação nervosa acoplada à musculatura lisa.
2. Este canal de sódio parece ser fundamental na inervação do hemipênis, visto ser responsável tanto pela ativação adrenérgica como nitrérgica.

Dados ainda não publicados do nosso grupo indicam que este canal de sódio resistente a TTX também está presente em preparações de anel de aorta isolados de *Crotalus durissus terrificus*, entretanto nenhum estudo foi realizado avaliando a presença desse canal de sódio em preparações de quelônios (*C. carbonaria*) ou em serpentes de hábitos constrictor (*P. guttatus*), ambos os animais evolutivamente mais antigos que serpentes perconhentas.

1.4 Justificativa e relevância

A regulação da pressão arterial em répteis ocorre em grande parte devido o controle local da resistência vascular periférica. Este fenômeno pode ser mediado pelo óxido nítrico, visto que este corresponde a um importante mediador endógeno envolvido na regulação local da musculatura lisa vascular em mamíferos e estudos sugerem seu envolvimento em vertebrados inferiores como répteis e anfíbios. Entretanto, uma caracterização *in vitro* da via NO-GCs-GMPc ainda não foi realizada em quelônios (tartarugas) e em serpentes de hábitos constrictors. Embora o leito vascular adotado neste trabalho não regule diretamente a resistência vascular periférica, adotamos o anel de aorta como modelo, pois este é comumente utilizado para investigar a via de sinalização NO-GCs- GMPc e devido grande parte da literatura envolvendo farmacologia vascular de répteis reportar-se a experimentos realizados neste vaso, facilitando, portanto, uma discussão e comparação de fisiologia comparada em vertebrados inferiores.

Acreditamos que o estudo de fisiologia comparada utilizando ferramentas farmacológicas e transcriptômicas possibilitará um maior entendimento do papel nitrérgico no controle local do tônus vascular, bem como o quanto a via de sinalização NO-GCs-GMPc está funcionalmente conservada em répteis.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

No presente trabalho buscamos caracterizar os mediadores envolvidos na contração evocada por estímulo de campo elétrico e o relaxamento mediado pela via NO-sGC-cGMP em anéis de aortas isolados de *C. carbonaria* (Jabuti-piranga) e *P. guttatus* (Corn snake).

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a contração induzida por estímulo de campo elétrico em aortas de *C. carbonaria* e *P. guttatus*.
- Avaliar a influência simpática e parassimpática sobre o tônus de anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*.
- Caracterizar o relaxamento dependente de óxido nítrico em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*.
- Investigar a ação de moduladores da guanilato ciclase solúvel em anéis de aortas isolados de *C. carbonaria* e *P. guttatus*.
- Realizar perfil transcriptômico para a via NO-GCs-GMPc em anéis de aorta de *C. carbonaria*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais de experimentação

Exemplares de *C. carbonaria* (jabuti-piranga) (machos e fêmeas; peso 0,9 Kg a 3,5 Kg) e *P. guttatus* (corn snake) (machos e fêmeas; peso 0,7 Kg a 0,9 Kg) foram obtidos do Parque Ecológico do Tietê (Guarulhos) e da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), respectivamente.

Jabutís-pirangas foram sedados com ketamina (50 mg/kg) e anestesiados por ropivacaína na região cervical (botões anestésicos). A veia jugular foi canulada, na qual foi administrada propofol (5 mg/kg) ⁴². Depois de observada perda de reflexos pupilares e álgicos, os animais foram submetidos à exsanguinação. Corn snakes foram anestesiadas por inalação de isoflurano e eutanasiadas por exsanguinação ⁴³.

Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob protocolos número CEUA N° 3907-1 e N° 3949-1 e o uso dos animais foi autorizado pelo Instituto do Meio Ambiente (SISBIO N° 20910-1).

3.2 Protocolos funcionais

3.2.1 Isolamento e montagem dos tecidos

Após realizar uma incisão ventral, um fragmento de aorta de cada espécie (12 cm) foi removido e imediatamente colocado em solução de Krebs-Henseleit (mM); NaCl (117), KCl (4,7), CaCl₂ (2.5), MgSO₄ (1.2), K₂PO₄ (1.2), NaHCO₃ (25), glicose (11), mantido a 27° CO tecido conjuntivo perivascular foi removido e a aorta foi seccionada em anéis (3 mm).

Os anéis foram mantidos em solução nutritiva de Krebs-Henseleit gaseificados por mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e submetidas à tensão de 10 miliNewtons (mN) em banho de órgãos com capacidade de 10 mililitros (mL). Os anéis permaneceram em período de estabilização de 60 minutos com sucessivas lavagens a cada 15 minutos e reajuste de tensão. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema Power Lab 4/30 de aquisição de dados (software versão 5.0, AD Instruments, Austrália).

A integridade endotelial foi avaliada mediante o relaxamento evocado por ATP (3 µM) e acetilcolina (1 µM) em aortas isoladas de *C. carbonaria* e *P. guttatus*, respectivamente.

3.2.2 Caracterização da contração induzida por estímulo de campo elétrico em aortas de *C. carbonaria* e *P. guttatus*

Tecidos foram submetidos a estímulo de campo elétrico (EFS) (60 V; 0,1 ms de duração, frequência de 4-16 Hz e train de estímulo de 30 segundos) na presença e na ausência de TTX (1 µM), guanetidina (30 µM) e fentolamina (10 µM).

3.2.3 Avaliação da influência simpática e parassimpática sobre os tônus de anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*

Foram realizadas curvas concentrações respostas à noradrenalina (0,001-100 µM) e acetilcolina (0,001-100 µM) na ausência e presença de N-metil-ester de L-arginina (L-NAME; 100 µM) e atropina (1 µM)

3.2.4 Caracterização do relaxamento dependente de óxido nítrico em anéis de aorta isolados de *C. carbonária*

Curvas à adenosina trifosfato (ATP; 0,001-100 μ M), adenosina difosfato (ADP; 0,001-100 μ M) e histamina (0,001-100 μ M) foram construídas na presença e ausência de L-NAME (100 μ M). Em outro experimentos, curvas à histamina foram obtidas na presença e ausência dos antagonistas histaminérgicos pirilamina (10 μ M) e cimetidina (10 μ M).

3.2.5 Caracterização downstream da via NO-sGC-cGMP em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* e *P. guttatus*

Curvas concentrações-respostas à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272 (100 pM - 10 μ M) foram construídas na presença e na ausência do inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME; 100 μ M), e do inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ; 10 μ M).

3.2.6 Análise dos resultados

As contrações provocadas pelo estímulo elétrico (EFS) foram expressas em seus valores absolutos (mN). Os relaxamentos evocados por agonistas foram expressos como percentual da pré-contracção induzida por fenilefrina ou acetilcolina.

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n). Para comparações das variáveis, usou-se o teste “t” de STUDENT pareado ou análise de variância (One-way ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni O programa Prisma (GraphPad Software) foi usado para estas análises. $p < 0,05$ foi aceito como significativo.

3.3 Construção de bibliotecas de *C. carbonaria* em cérebro, aorta e corpo cavernoso

O RNA total foi extraído de amostras de cérebro, aorta e corpo cavernoso de *C. carbonaria* usando o Direct-zol™ kit (Zymo Research), seguindo instruções do fabricante. A concentração e qualidade de RNA foi determinada usando NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) e por eletroforese em gel de agarose 1.2%. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese usando 2100 Bioanalyzer (Agilent) e as três diferentes bibliotecas de cDNA (cérebro, aorta e corpo cavernoso) foram preparadas usando o protocolo Illumina TruSeq V2. Em seguida High Output (HO), Paired Ends (PE) sequenciamento foi realizado utilizando o aparelho Illumina HiSeq 2500 seguindo instruções do fabricante, com tamanho de 100 nt.

3.3.1 Clusterização do transcriptoma

As sequências das três bibliotecas foram submetidas separadamente ao processo de clusterização através do *software Trinity* versão 2.0.6 para obter transcritos nos quais fosse possível verificar a existência das proteínas pré-selecionadas; tirosina hidroxilase, dopa descarboxilase, dopamina β -hidroxilase, óxido nítrico sintase neuronal, óxido nítrico sintase endotelial, guanilato ciclase solúvel, fosfodiesterase do tipo 5.

3.3.2 Blast: Buscando as proteínas

O processo de alinhamentos foi realizado utilizando a ferramenta BLAST. O trabalho de busca de proteínas nos contigs foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa realizamos a comparação através de alinhamento entre os contigs com as proteínas e observamos os hits encontrados. Dos hits encontrados, analisamos apenas os mais expressivos, para este trabalho consideramos aqueles cujo alinhamento teve hit com e-value da ordem de e^{-10} ou menor.

Na segunda etapa, selecionamos os contigs com hits mais expressivos e comparamos com o banco de dados NR (*non-redundant database*) do NCBI, para verificar se de fato o contig representa a proteína sinalizada no hit, ou é

um falso positivo. Esta etapa é chamada de validação. A etapa de validação é necessária para observar se o hit considerado como expressivo não indica um falso positivo para uma determinada proteína. Um contig pode ser bastante parecido com a proteína da lista de selecionadas para comparação, mas ao realizarmos a validação contra um banco completo de proteínas, notamos que ele é muito mais parecido, senão idêntico à outra proteína.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da contração induzida por estímulo de campo elétrico em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* e *P. guttatus*

O estímulo de campo elétrico em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* não induziu resposta de origem neurogênica, uma vez que na presença de TTX (inibidor de canal de sódio dependente de voltagem) a resposta contrátil não foi reduzida (**Figura 2A**) (n=4). Respostas similares foram observadas na presença de fentolamina (antagonista alfa adrenérgico), guanetidina (agente simpatolítico), suramina (antagonista purinérgico) e na presença de antagonistas muscarínicos (atropina ou associação de 4-Damp + pirenzepina + metocritamina) (**Figura 2A e 2B**) (n=3, para cada grupo).

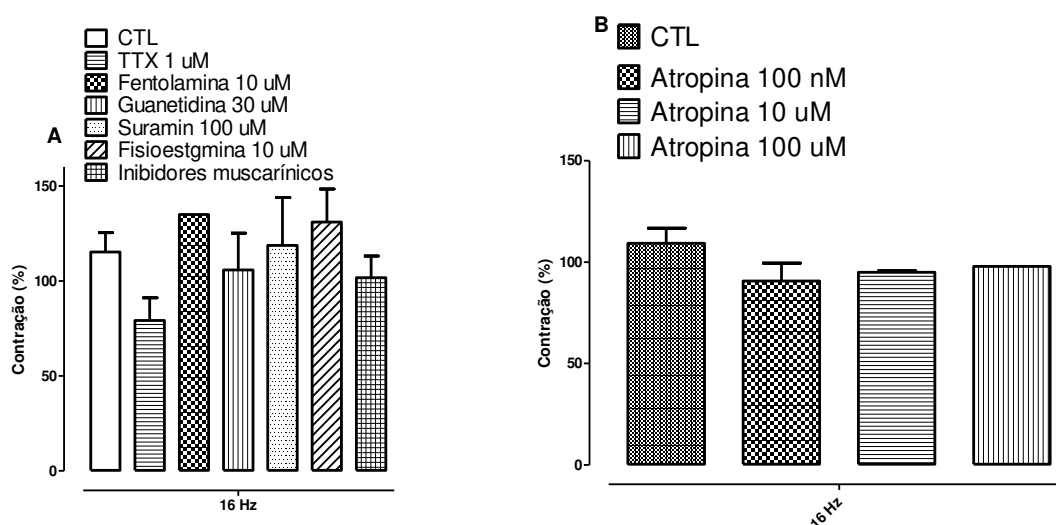


Figura 2. **A** Estímulo de campo elétrico (EFS; 60 V, 16 Hz, 0,1 ms) em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* na presença e na ausência de TTX (1 μ M), guanetidina (30 μ M), fentolamina (10 μ M), suramin (100 μ M), fisiostigmina (10 μ M) inibidores muscarínicos **B** (4-Damp; 10 μ M + metocritamina (100 η M) + pirenzepina; 10 μ M; atropina 0,1-100 μ M). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Estímulos de campo elétrico (EFS) promoveram contrações frequência-dependente em aortas isoladas de *P. guttatus* (**Figura 3**). Embora a adição de TTX (1 μ M) não tenha reduzido a amplitude da contração (n=3), a resposta contrátil foi intensamente reduzida após o tratamento com guanetidina (30 μ M) ou fentolamina (10 μ M) (**Figura 3A e 3B**, respectivamente) (n=3 para cada grupo) ($p<0,05$).

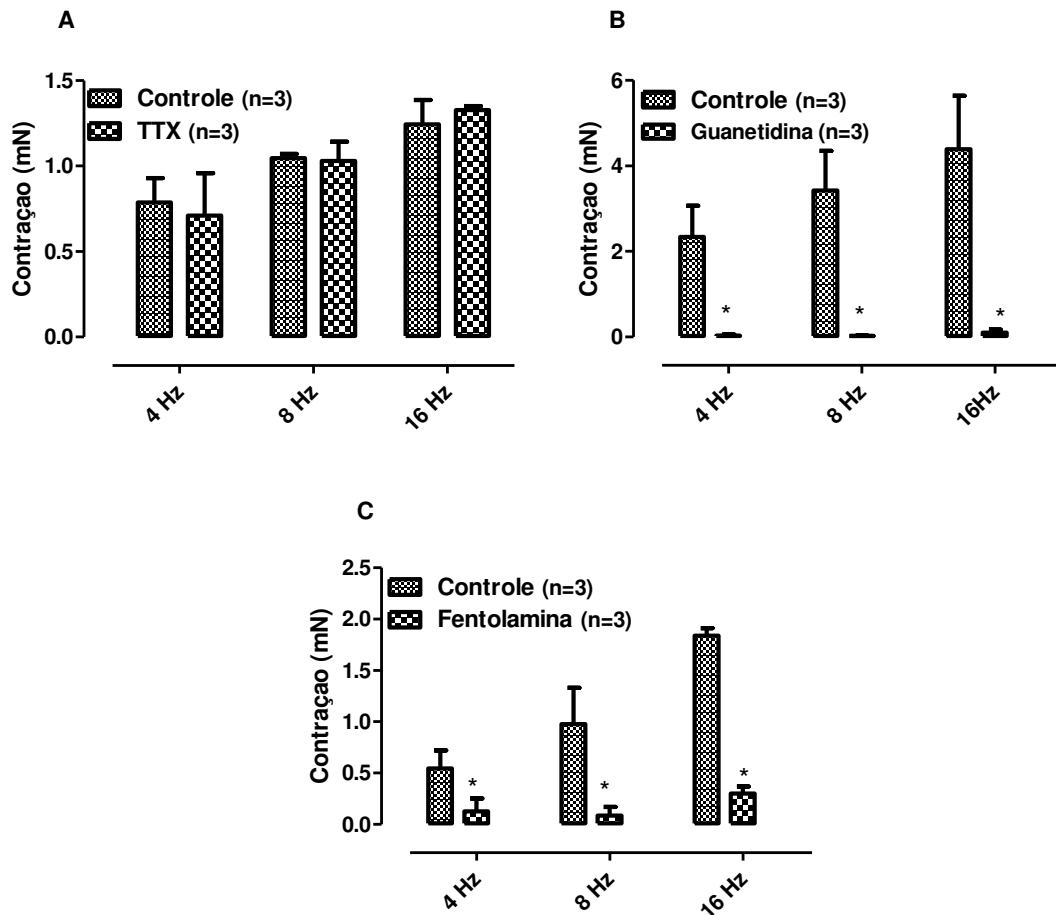
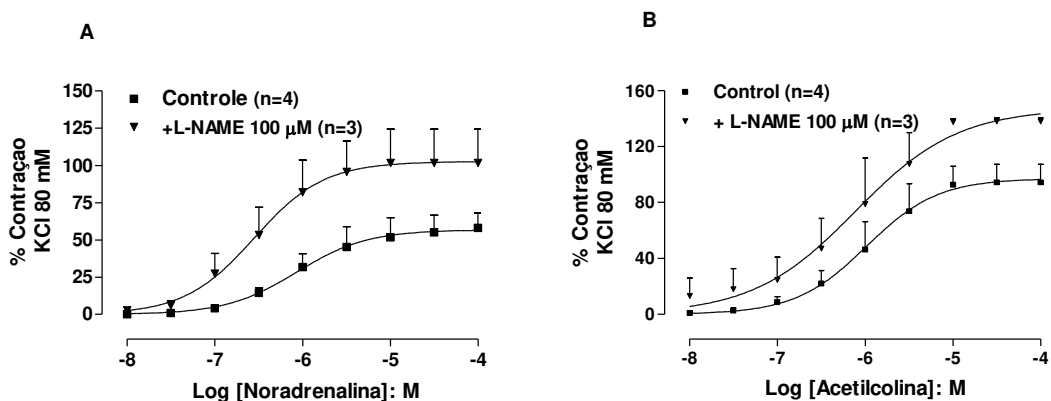


Figura 3: Contrações induzidas por estímulo de campo elétrico (EFS; 60 V, 4-16 Hz, 0,1 ms) em anéis de aortas isolados de *P. guttatus* na presença e ausência de TTX (1 μ M), guanetidina (30 μ M) e fentolamina (10 μ M). Resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de valores absolutos de miliNewton. $p^*<0,05$; comparado ao Controle ; teste t de Student pareado.

4.2 Avaliação da influência simpática e parassimpática sobre os tônus de anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*

Visto que não foi possível caracterizar a contração induzida por estímulo de campo elétrico em anéis de aortas isolados de *C. carbonaria*, buscou-se adicionar agonistas adrenérgico e colinérgico a fim de averiguar a influência simpática e parassimpática sobre o tônus da musculatura vascular desses animais. Noradrenalina e acetilcolina foram capazes de promover contrações concentração-dependente em anéis de aorta (**Tabela 2**). A adição de L-NAME (100 μ M) aumentou a resposta máxima promovida por ambos os agonistas (**Figura 4A e 4B**) ($n=3$ para ambos os grupos). A incubação de atropina (antagonista muscarínico) aboliu a resposta induzida pela acetilcolina (**Figura 4C**) ($n=3$) ($p<0,05$).



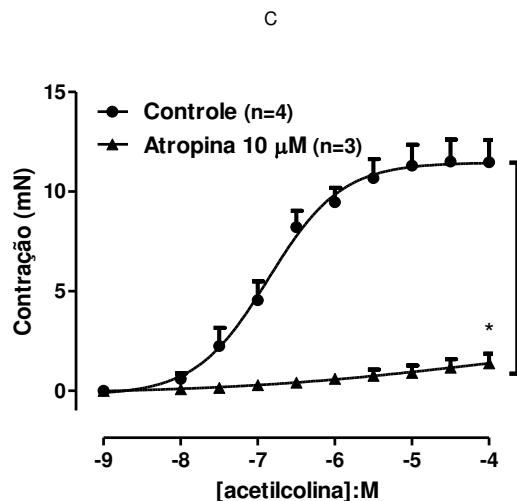


Figura 4. Curva concentração-resposta à noradrenalina (0,001 μ M - 100 μ M) (**A**) e acetilcolina (0,001- 100 μ M) (**B**) na ausência e presença de L-NAME (100 μ M) e (**C**) de atropina (10 μ M) em aorta isolada de *C. carbonaria*. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão do percentual de contração evocado por solução despolarizante (KCl; 80 mM) (n=3-4) *p<0,05 comparado ao controle.

Tabela 2: Valores de potência e eficácia de noradrenalina e acetilcolina na presença e ausência de L-NAME (100 μ M) em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão do percentual de contração evocado por solução despolarizante (KCl; 80 mM).

	pEC ₅₀	E _{max} (% KCl)	n
Noradrenalina	6,0 $\pm$ 0,1	56,7 $\pm$ 5	4
Acetilcolina	5,9 $\pm$ 0,1	97,2 $\pm$ 8,8	4
Noradrenalina + L-NAME	6,5 $\pm$ 0,1	102,5 $\pm$ 8,5	3
Acetilcolina + L-NAME	6,1 $\pm$ 0,2	147 $\pm$ 15,4	3

4.3 Caracterização do relaxamento dependente de óxido nítrico em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*

Devido a acetilcolina, um agonista comumente utilizado para avaliar integridade endotelial e relaxamento dependente de NO, promover contração em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*, bem como a adição de L-NAME ter aumentado a resposta máxima de agonistas adrenérgicos e colinérgicos sugerindo a produção endógena de NO, buscamos averiguar a presença de relaxamento dependente de NO promovido por agonistas clássicos envolvidos na via NO-GCs-GMPc em anéis de aortas pré-contraídos por acetilcolina (3 μ M).

Adenosina trifosfato, adenosina difosfato e histamina induziram relaxamento concentração-dependente em anéis de aortas isolados de *C. carbonaria*. A adição de L-NAME (100 μ M), atenuou a resposta relaxante dos três agonistas investigados (**Figura 5**) (n=3 para cada grupo) (p<0,05).

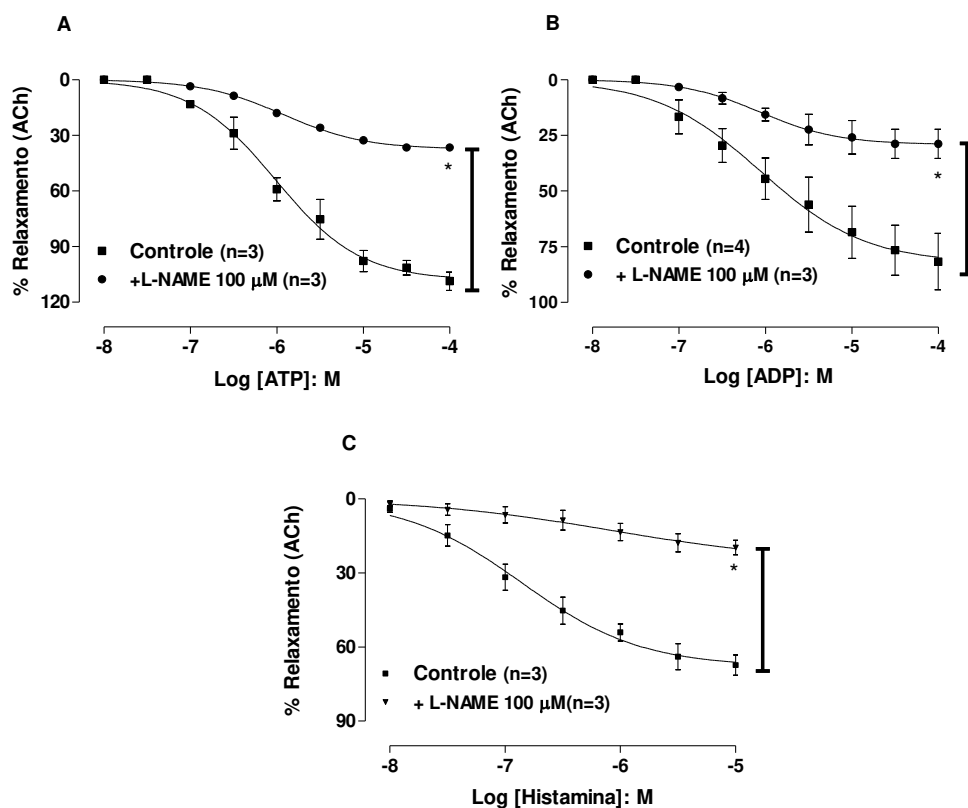


Figura 5. Curva concentração-resposta à (A) adenosina trifosfato (B) adenosina difosfato e (C) histamina na ausência e presença de L-NAME (100 μ M) em anéis de aorta de *C. carbonaria* pré-contraídos com acetilcolina (3 μ M). Os dados estão

representados como média $\pm$ erro padrão da média do percentual da contração evocada por acetilcolina (3 μ M). $p^* < 0,05$ comparado ao controle; teste t de Student não pareado.

Tabela 03: Valores de potência e eficácia de ATP, ADP e histamina em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria*

	pEC ₅₀	E _{max} (% ACh)	n
ATP	6,01 $\pm$ 0,08	108,3 $\pm$ 4,83	3
ADP	6,05 $\pm$ 0,24	82,51 $\pm$ 9,32	4
Histamina	6,85 $\pm$ 0,12	68,08 $\pm$ 4,38	3

Em outra série de experimentos, foram realizadas curvas concentração-resposta à histamina na ausência e presença de pirilamina (10 μ M) (n=5) ou cimetidina (10 μ M) (n=4). Ambos antagonistas histaminérgicos reduziram a resposta máxima evocada por histamina (**Figura 6**) ($p < 0,05$).

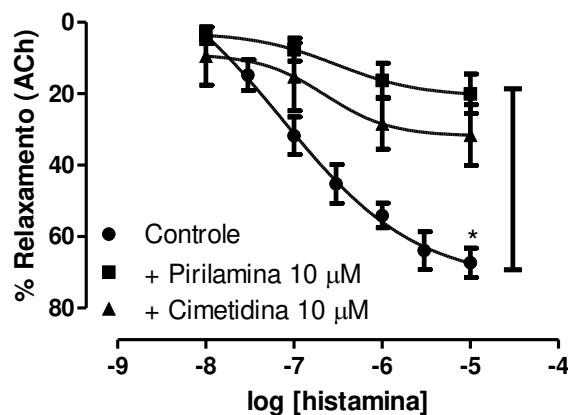


Figura 06. Curva concentração-resposta à histamina na ausência e presença de cimetidina (10 μ M) ou pirilamina (10 μ M) em anéis de aorta de *C. carbonaria* pré-contraídos com acetilcolina (3 μ M). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão do percentual da contração evocada por acetilcolina. $p^* < 0,05$; comparado ao controle; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

Tabela 4: Valores de potência e eficácia de histamina na presença e ausência de pirilamina (10 μ M) e cimetidina (10 μ M) em anéis de aorta isolados de *C.carbonaria*. $p^* < 0,05$ comparado ao controle; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni

	pEC ₅₀	E _{max} (% ACh)	n
Histamina	7,1 $\pm$ 0,5	72,7 $\pm$ 10,1	3
Histamina + Pirilamina (10 μM)	6,5 $\pm$ 0,7	20,7 $\pm$ 6,6*	5
Histamina + Cimetidina (10 μM)	6,6 $\pm$ 0,8	31,9 $\pm$ 0*	4

4.4 Caracterização downstream da via NO-sGC-cGMP em anéis de aortas isolados de *C. carbonaria* e *P. guttatus*

Acetilcolina (ACh), o nitroprussiato de sódio (SNP; um doador exógeno de óxido nítrico) e o BAY 41-2272 (um estimulador da guanilato ciclase solúvel) promoveram relaxamento concentração-dependente em anéis de aortas pré-contraídas de *P. guttatus* (**Figura 7**) sendo a potência do SNP > ACh > BAY 41-2272 (**Tabela 5**).

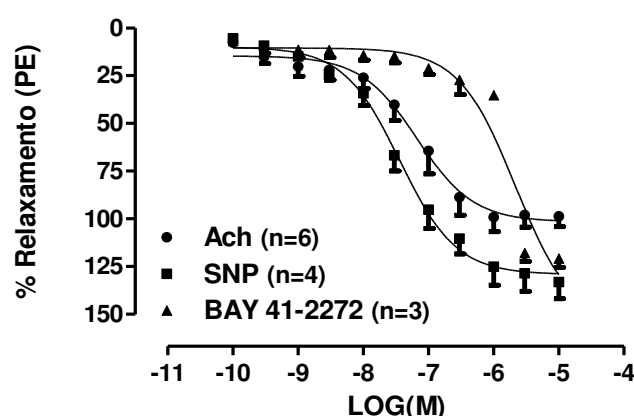


Figura 07: Curva concentração–resposta à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272 em anéis de aorta isolados de *P. guttatus* pré contraídos com fenilefrina (PE; 3 μ M). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão do percentual da contração evocada por fenilefrina.

Tabela 5: Valores de potência e eficácia de acetilcolina, nitroprussiato de sódio e BAY 41-2272 em anéis de aorta isolados de *Pantherophis guttatus*

	pEC ₅₀	E _{max} (% PE)	n
Acetilcolina (ACh)	7,1 ± 0,1	104,4 ± 0,1	6
Nitroprussiato de sódio (SNP)	7,4 ± 0,1	131,5 ± 4,2	4
BAY 41-2272	5,6 ± 0,1	154,7 ± 13,3	3

Com o intuito de averiguar se o mecanismo de ação envolvido no relaxamento evocado por acetilcolina em anéis de aorta de *P. guttatus* era via produção de NO, adicionou-se L-NAME (100 µM), no qual foi observado a redução da resposta máxima induzida por acetilcolina, indicando a participação nitrérgica neste evento (**Figura 8**).

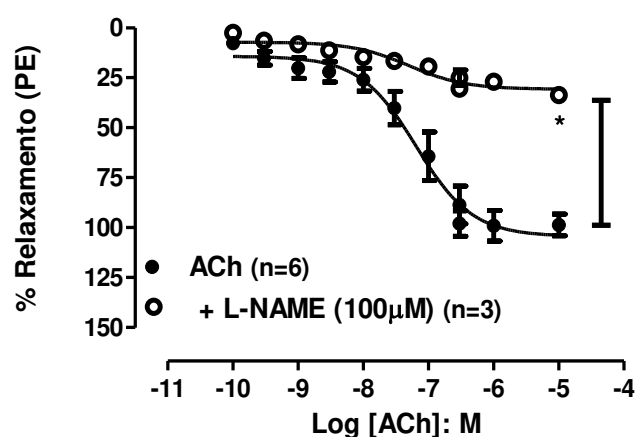


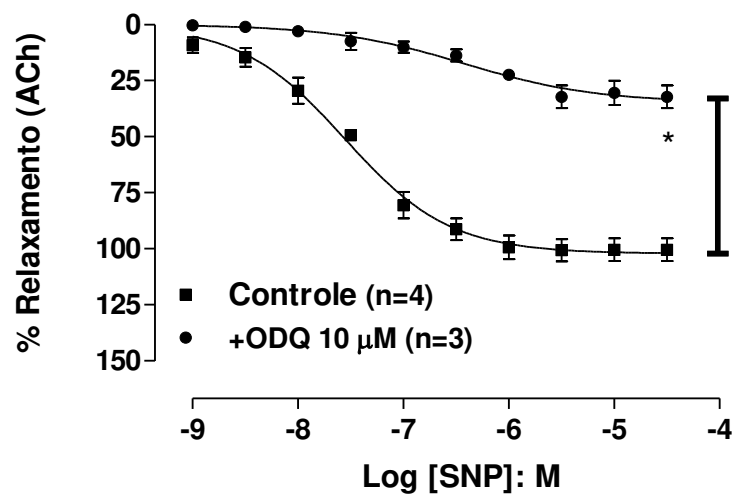
Figura 8: Curva concentração–resposta à acetilcolina (ACh) na presença e na ausência (L-NAME; 100 µM) em anéis de aortas isolados de *P. guttatus* pré-contraídos com fenilefrina (PE; 3 µM). p<0,05; * vs. Controle; Teste t de Student.

Tabela 6: Valores de potência e eficácia de acetilcolina na presença e ausência de L-NAME (100 μ M) em anéis de aorta isolados de *P. guttatus*. $p^* < 0,05$ comparado ao controle; Teste t de Student

	pEC_{50}	E_{max} (% PE)	n
Acetilcolina (ACh)	$7,1 \pm 0,1$	$104,4 \pm 4,8$	6
Acetilcolina (ACh) + L-NAME	$7,29 \pm 0,1$	$30,7 \pm 1,7^*$	3

O SNP promoveu relaxamento em aortas isoladas de ambas espécies analisadas com ordem de potência próximas (**Tabela 7**). Em ambos os tecidos, a resposta relaxante evocada pelo SNP foi reduzida na presença do ODQ (inibidor do sítio heme da enzima guanilato ciclase solúvel) (**Figura 9A e 9B**) ($n=4$; *C. carbonaria*) e $n=3$; *P. guttatus*) ($p < 0,05$)

A



B

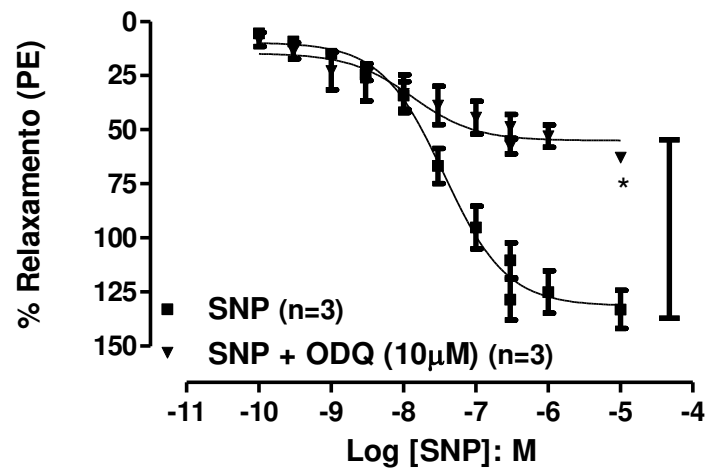


Figura 9: Curva concentração-resposta à nitroprussiato de sódio (SNP) na presença e na ausência do inibidor da enzima guanilato cilase solúvel (ODQ; 10 μ M) em anéis de aorta isolados de **(A)** *C. carbonaria* e **(B)** *P. guttatus* **(B)** pré contraídos com acetilcolina (ACh; 3 μ M) e fenilefrina (PE; 3 μ M), respectivamente. $p^* < 0,05$; comparado ao controle; Teste t de Student.

Tabela 7: Valores de potência e eficácia de nitroprussiato de sódio na presença e ausência de ODQ (10 μ M) em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* e *P. guttatus*. $p^* < 0,05$; comparado ao *C. carbonaria*; Teste t de Student ; $p^\# < 0,05$ comparado ao *P. guttatus*; Teste t de Student.

	pEC ₅₀	E _{max} (% ACh/ PE)	n
SNP (<i>C. carbonaria</i>)	7,5 $\pm$ 0	102 $\pm$ 2,5	4
SNP + ODQ (<i>C. carbonaria</i>)	6,4 $\pm$ 0,2	34,83 $\pm$ 3,8*	3
SNP (<i>P. guttatus</i>)	7,4 $\pm$ 0	131,5 $\pm$ 4,2	3
SNP + ODQ (<i>P. guttatus</i>)	7,87 $\pm$ 0,2	55 $\pm$ 3,2 [#]	3

Nucleotídeos cíclicos são hidrolizados por uma classe de enzimas denominadas fosfodiesterases. A fim de avaliar o quanto estas enzimas estão presentes e funcionalmente importantes em anéis de aortas de *C. carbonaria*, realizou-se curvas concentração-resposta ao tadalafil (um inibidor específico de fosfodiesterase do tipo V). Tadalafil promoveu relaxamento máximo de $131 \pm 15,3\%$ ($pEC_{50} 6,7 \pm 0,3$) ($n=4$) e na presença de ODQ ($10 \mu M$), sua resposta máxima foi reduzida ($E_{max} 36,4 \pm 7\%$; $pEC_{50} 6,5 \pm 0,5$) $p<0,05$, $n=4$) (**Figura 10**).

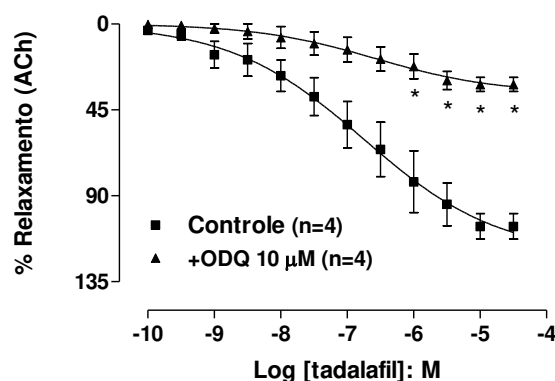


Figura 10. Curva concentração-resposta ao tadalafil na presença e ausência de ODQ ($10 \mu M$) em anéis de aorta isolados de *Chelonoidis carbonaria* pré-contraídos com acetilcolina ($3 \mu M$). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. $p^*<0,05$; comparado ao controle; teste t de Student.

Embora os moduladores de GCs (BAY 41-2272 e BAY 60-2770) tenham evocado respostas máximas similares em aortas isoladas de ambas espécies estudadas, a potência do BAY 41-2272 foi superior em *C. carbonaria* quando comparado a *P. guttatus* ($7,5 \pm 0,06$ e $5,8 \pm 0$, respectivamente) ($p<0,05$) ($n=4$ e $n=3$, respectivamente) (**Figura 11A e 11B**) e quando na presença de ODQ ($10 \mu M$) observou-se um intenso deslocamento à direita em aortas isoladas de ambos os répteis investigados.

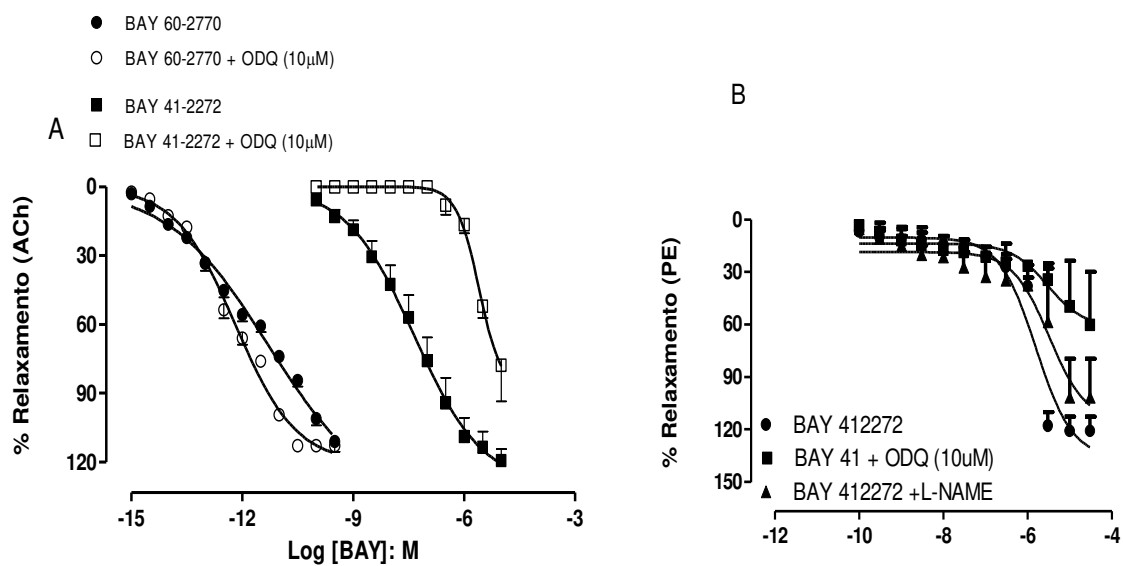


Figura 11. **A** Curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 e BAY 60-2770 na ausência e presença de ODQ (10 μ M) em anéis de aortas isolados de *C. carbonaria*. **B** Curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 ausência e na presença de ODQ (10 μ M) e L-NAME (100 μ M) em anéis de aortas isolados de *P. guttatus*. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. $p^* < 0,05$ comparado ao E+; One Way Anova.

Tabela 8: Valores de potência e eficácia de BAY 41-2272 E BAY 60-2770 na presença e ausência de ODQ (10 μ M) em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* e *P. guttatus*. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão $p^* < 0,05$; * vs. BAY 41-2272 (*C. carbonaria*) Teste t de Student. $p\# < 0,05$; vs. BAY 41-2272 (*P. guttatus*); One Way Anova.

	pEC ₅₀	E _{max} (% ACh/ % PE)	n
BAY 41-2272 (<i>C. carbonaria</i>)	7,5 $\pm$ 0,06	102 $\pm$ 2,5	4
BAY 41-2272 + ODQ (<i>C. carbonaria</i>)	6,4 $\pm$ 0,23	89,5 $\pm$ 0,1 *	3
BAY 60-2770 <i>C. carbonaria</i>)	11,2 $\pm$ 0,26	131,5 $\pm$ 4,2	3
BAY 60-2770 + ODQ (<i>C. carbonaria</i>)	7,87 $\pm$ 0,25	55 $\pm$ 3,2	3
BAY 41-2272 (<i>P. guttatus</i>)	5,8 $\pm$ 0	136,4 $\pm$ 6,7	3
BAY 41-2272 + L-NAME (<i>P. guttatus</i>)	5,4 $\pm$ 0,1 ⁺	115,8 $\pm$ 10,8	3
BAY 41-2272 + ODQ (<i>P. guttatus</i>)	5,5 $\pm$ 0,2	67,25 $\pm$ 9,5#	3

4.5 Análise transcriptômica

A seguir apresentamos a lista das sequências de proteínas extraídas do UniProt:

- **Tirosina hidroxilase** (EC 1.14.16.2): P90986 (*Caenorhabditis elegans*), P07101 (*Homo sapiens*), P17289 (*Bos taurus*), P18459 (*Drosophila melanogaster*), P04177 (*Rattus norvegicus*), Q761Q3 (*Canis lupus familiaris*), A0A060X6Z0 (*Oncorhynchus mykiss*), P11982 (*Phasianidae* sp), P24529 (*Mus musculus*), O42091 (*Anguilla anguilla*), A8X3V8 (*Caenorhabditis briggsae*), O17446 (*Schistosoma mansoni*).

- **Dopa decarboxilase (aromatic L-amino acid decarboxilase)** (EC 4.1.1.28): P05031 (*Drosophila melanogaster*), P20711 (*Homo sapiens*), P80041 (*Sus scrofa*), P14173 (*Rattus norvegicus*), P34751 (*Caenorhabditis elegans*), P27718 (*Bos taurus*), P17770 (*Catharanthus roseus*), P22781 (*Cavia porcellus*), O96567 (*Drosophila simulans*), P54770 (*Papaver somniferum*), O88533 (*Mus musculus*), P48861 (*Manduca sexta*), P54768 (*Papaver somniferum*), P54769 (*Papaver somniferum*), P54771 (*Papaver somniferum*).
- **Dopamina beta-hidroxilase** (EC 1.14.17.1): P15101 (*Bos taurus*), P09172 (*Homo sapiens*), Q64237 (*Mus musculus*), Q9XTA0 (*Equus caballus*), Q68CI2 (*Canis lupus familiaris*), Q05754 (*Rattus norvegicus*).
- **Fosfodiesterase do tipo 5:** (EC 3.1.4.17): P91119 (*Caenorhabditis elegans*) (EC 3.1.4.35): O76074 (*Homo sapiens*), Q28156 (*Bos taurus*), O54735 (*Rattus norvegicus*), Q8CG03 (*Mus musculus*), O77746 (*Canis lupus familiaris*).
- **Guanilato ciclase solúvel** (EC 4.6.1.2): P90895 (*Caenorhabditis elegans*), Q6DNF3 (*Caenorhabditis elegans*), Q6DNF4 (*Caenorhabditis elegans*), O02298 (*Caenorhabditis elegans*), P92006 (*Caenorhabditis elegans*), P22717 (*Rattus norvegicus*), Q9WVI4 (*Rattus norvegicus*), Q4ZHR9 (*Canis lupus familiaris*), Q4ZHS0 (*Canis lupus familiaris*), P11528 (*Arbacia punctulata*), P70106 (*Cavia porcellus*).
- **Óxido nítrico neuronal (nNOS)** (EC 1.14.13.39): Q9Z0J4 (*Mus musculus*), P29475 (*Homo sapiens*), P29476 (*Rattus norvegicus*), O19132 (*Oryctolagus cuniculus*), Q29498 (*Ovis aries*).
- **Óxido nítrico endotelial (eNOS)** (EC 1.14.13.39): P29473 (*Bos taurus*), P29474 (*Homo sapiens*), P70313 (*Mus musculus*), Q62600 (*Rattus norvegicus*), Q9TUX8 (*Canis lupus familiaris*), Q28969 (*Sus scrofa*), P97270 (*Cavia porcellus*), P79209 (*Ovis aries*).

Para este estudo foram utilizadas sequências de transcriptoma de três tecidos (bibliotecas) de *Chelonoidis carbonaria*: aorta, cérebro e corpo cavernoso.

O sequenciamento foi realizado utilizando a tecnologia HiSeq2500. Com esta tecnologia extraíram-se 33.344.632 sequências da biblioteca aorta, 92.300.292 sequências da biblioteca cérebro, e 41.392.820 sequências da biblioteca de corpo cavernoso.

4.5.1 Primeira etapa: Hits encontrados

A seguir, apresentamos um resumo dos hits mais expressivos encontrados para cada conjunto de proteínas.

- **Tirosina hidroxilase** (EC 1.14.16.2): Entre as doze proteínas selecionadas, em somente oito foram encontrados hits expressivos com contigs da biblioteca cérebro. As proteínas foram: P90986, P07101, P17289, Q76IQ3, A0A060X6Z0, P11982, P24529, O42091; e os hits tiveram e-value variando de e^{-118} a 0. Não houveram hits de destaque com contigs das bibliotecas aorta e corpo cavernoso.
- **Dopa decarboxilase (aromatic L-amino acid decarboxylase)** (EC 4.1.1.28): Foram encontrados contigs da biblioteca cérebro com hits expressivos para as quinze proteínas selecionadas cujos e-value variaram de e^{-113} a 0. Para quatorze delas, exceto a P34751, contigs da biblioteca aorta apresentaram hits expressivos, com e-value variaram de e^{-10} a e^{-14} . Nenhum contig do corpo cavernoso teve semelhança com esta proteína.
- **Dopamina beta-hidroxilase** (EC 1.14.17.1): As seis proteínas selecionadas tiveram hits com contigs das três bibliotecas dentro do e-value de corte. Sendo que os hits com os contigs de cérebro foram melhores, e-value na ordem de e^{-80} . Para biblioteca aorta os e-values foram da ordem de e^{-37} e para corpo cavernoso de e^{-17} .
- **Fosfodiesterase do tipo 5:**
 - (EC 3.1.4.17): A Proteína P91119 obteve hits com um contig das três bibliotecas, com e-values variando de e^{-33} a e^{-150} .

- (EC 3.1.4.35): Contigs das três bibliotecas tiveram bons hits com as cinco proteínas pesquisadas. Nas bibliotecas cérebro e corpo cavernoso destacaram-se dois contigs em cada, com e-value = 0 e alta cobertura. Na biblioteca aorta, um contig se destacou com e-value de e^{-80} .
- **Guanilato ciclase solúvel (EC 4.6.1.2)**: Foram observados contigs das três bibliotecas semelhantes às proteínas selecionadas. Para os contigs de cérebro, notamos e-values de e^{-50} a 0, para os de aorta e-values de e^{-50} a 0, para os de corpo cavernoso e-values de e^{-51} a 0.
- **Óxido nítrico neuronal (nNOS) (EC 1.14.13.39)**: As cinco proteínas selecionadas tiveram hits expressivos com contigs de todas as bibliotecas. Para os contigs de cérebro, os e-values variaram de e^{-63} a 0, para os de aorta variaram de e^{-31} a 0, e para os de corpo cavernoso variaram de e^{-66} a 0.
- **Óxido nítrico endotelial (eNOS) (EC 1.14.13.39)**: Foram encontrados hits expressivos entre contigs das três bibliotecas e as oito proteínas selecionadas. Para biblioteca cérebro, os e-values variaram de e^{-38} a 0, para aorta variaram de e^{-41} a 0, e para corpo cavernoso variaram de e^{-41} a 0.

4.5.2 Segunda etapa: Hits Validados

- **Tirosina hidroxilase (EC 1.14.16.2)**: Os hits considerados expressivos entre as oito proteínas e os contigs de cérebro foram validados na comparação contra o banco NR (Tabela 9).

Tabela 9: Contigs da tartaruga que representam a proteína tirosina hidroxilase

Proteína	Tamanho (aa)	Contigs	Biblioteca	% Cobertura	e-value
P90986	519	TR21830 c0_g1_i2	Cérebro	77,26	3e ⁻¹¹⁸
P07101	528	TR21830 c0_g1_i2 e TR21830 c0_g1_i1		100	0
P17289	491				
Q76IQ3	495				
A0A060X6Z0	489				
P11982	491				
P24529	498				
O42091	488				

- **dopa decarboxilase** (aromatic L-amino acid decarboxylase) (EC 4.1.1.28): As quinze proteínas selecionadas e com hits expressivos com contigs da biblioteca cérebro tiveram o alinhamento validado. Os contigs da biblioteca aorta não foram validados para esta proteína. A Tabela 10 exibe a lista das proteínas, os contigs de cérebro que as representam, bem como detalhes dos alinhamentos.

Tabela 10: Contigs da tartaruga que representam a proteína dopa descarboxilase

Proteína	Tamanho (aa)	Contigs	Biblioteca	% Cobertura	e-value
P05031	510	TR37659 c0_g1_i1, TR37659 c0_g1_i5, TR37659 c0_g1_i2	Cérebro	92,75	0
P20711	480			99,38	0
P80041	486			96,09	0
P14173	480			99,38	0
P34751	905			50,50	e ⁻¹¹³
P27718	487			97,95	0
P17770	500			95,20	e ⁻¹²³

P22781	480			99,17	0
O96567	510			92,75	0
P54770	533			95,12	e^{-137}
O88533	480			99,38	0
P48861	508			93,50	0
P54768	518			98,07	e^{-136}
P54769	531			94,16	e^{-136}
P54771	523			95,41	e^{-130}

- **dopamine beta-hydroxylase (EC 1.14.17.1):** Os contigs de cérebro e aorta que obtiverem hits expressivos com as seis proteínas selecionadas passaram na validação com o NR. No entanto, os contigs do corpo cavernoso não foram validados. Na Tabela 11 são apresentados detalhes do alinhamento das proteínas com os contigs de cérebro e aorta.

Tabela 11: Contigs da tartaruga que representam a proteína dopamine beta-hydroxylase

Proteína	Tamanho (aa)	Contigs	Biblioteca	% Cobertura	e-value
P15101	610	TR37628 c0_g1_i2	Cérebro	89,51	e^{-89}
P09172	617			88,33	e^{-89}
Q64237	610			90,49	e^{-84}
Q9XTA0	620			87,78	e^{-86}
Q68CI2	625			73,12	e^{-88}
Q05754	620			88,06	e^{-83}
P15101	610			27,54	e^{-37}
P09172	617			40,03	e^{-37}

Q64237	610	TR41003 c0_g1_i1	Aorta	41,18	e^{-39}
Q9XTA0	620			39,87	e^{-38}
Q68CI2	625			47,20	e^{-37}
Q05754	620			40,00	e^{-34}

• **Fosfodiesterase do tipo 5:**

- (EC 3.1.4.17): A proteína P91119 teve o alinhamento validado com o contig TR22807|c6_g1_i2 do corpo cavernoso. Os contigs de cérebro e aorta não foram validados como tipo 5 de *phosphodiesterase*.
- (EC 3.1.4.35): Os contigs das bibliotecas cérebro e corpo cavernoso, que possuíam e-value 0 no alinhamento da etapa 1, foram validados. O contig da biblioteca aorta é pequeno, possui 440 bases e cobre apenas 15% da proteína utilizada como isca. No entanto, o listamos na Tabela 12 pois pode ser uma evidência parcial da presença de *fosfodiesterase do tipo 5* na aorta da tartaruga.

Tabela 12: Contigs da tartaruga que representam a proteína fosfodiesterase do tipo 5

Proteína	Tamanho (aa)	Contigs	Biblioteca	% Cobertura	e-value
P91119	728	TR22807 c6_g1_i2	Corpo cavernoso	74,31	e^{-33}
O76074	875			96,80	0
Q28156	865			98,50	0
O54735	866			99,16	0
Q8CG03	865			98,61	0
O77746	865			99,88	0
O76074	875	TR47742 c0_g1_i1	Aorta	15,20	e^{-81}
Q28156	865			15,26	e^{-80}
O54735	866			15,97	e^{-77}
Q8CG03	865			15,38	e^{-77}

O77746	865			15,38	e^{-80}
O76074	875			96,80	0
Q28156	865	TR22807 c6_g1_i3, TR22807 c6_g1_i2	Corpo cavernoso	98,50	0
O54735	866			99,16	0
Q8CG03	865			98,61	0
O77746	865			99,88	0

- **Guanilato ciclase solúvel (EC 4.6.1.2):** Nove das proteínas selecionadas e com hits expressivos tiveram seus alinhamentos validados. Contigs das três bibliotecas parecem representar tais proteínas, os de cérebro e corpo cavernoso com melhor qualidade e os de aorta com menor qualidade

Tabela 13: Contigs da tartaruga que representam a proteína guanilato ciclase solúvel

Proteína	Tamanho(aa)	Contigs	Biblioteca	% Cobertura	e-value
P90895	945	TR68845 c0_g1_i3	Cérebro	66,45	e^{-50}
Q6DNF3	708			87,57	e^{-79}
Q6DNF4	675	TR13698 c0_g2_i3		97,62	e^{-118}
O02298	688			89,09	e^{-133}
P92006	686			96,06	e^{-108}
P22717	682	TR13698 c0_g2_i3, TR13698 c0_g2_i4		87,82	0
Q9WVI4	730	TR27078 c0_g1_i1, TR72295 c0_g1_i1		93,15	0
Q4ZHR9	619	TR68845 c0_g1_i3, TR68845 c0_g2_i1		99,67	0
Q4ZHS0	690	TR72295 c0_g1_i1, TR27078 c0_g1_i1		100	0
Q6DNF3	708	TR26686 c0_g1_i1, TR26686 c0_g2_i1		48,87	e^{-46}
Q6DNF4	675			60,44	e^{-77}
O02298	688	TR8605 c0_g1_i1	Aorta	78,19	e^{-81}
P92006	686	TR26686 c0_g1_i1		59,18	e^{-72}
P22717	682			55,86	e^{-87}

Q9WVI4	730	TR8605 c0_g1_i1	Corpo cavernoso	85,20	0
Q4ZHR9	619	TR26686 c0_g1_i1, TR26686 c0_g2_i1		68,01	0
Q4ZHS0	690	TR8605 c0_g1_i1		100	0
P90895	945			65,39	e ⁻⁵¹
Q6DNF3	708	TR50398 c0_g1_i3		95,05	e ⁻⁷⁹
Q6DNF4	675			92,59	e ⁻¹¹⁵
O02298	688			87,93	e ⁻¹⁰⁸
P92006	686			91,83	e ⁻¹⁰⁷
P22717	682			85,77	e ⁻¹¹⁶
Q9WVI4	730	TR2698 c0_g1_i1, TR2698 c0_g1_i2		85,20	0
Q4ZHR9	619	TR50398 c0_g1_i3, TR50398 c0_g1_i1, TR50398 c0_g1_i2		99,67	0
Q4ZHS0	690	TR2698 c0_g1_i1, TR2698 c0_g1_i2		100	0

- **Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (EC 1.14.13.39):** A validação mostrou que as cinco proteínas selecionadas possuem representação nas bibliotecas cérebro e corpo cavernoso. Na Tabela 14 são apresentadas os detalhes dos alinhamentos validados entre estas proteínas e contigs de cérebro e corpo cavernoso.

Tabela 14: Contigs da tartaruga que representam a proteína Nitric oxide synthase 1 (nNOS).

Proteína	Tamanho(aa)	Contigs	Biblioteca	% Cobertura	e-value
Q9Z0J4	1429	TR31762 c0_g1_i1	Cérebro	100	0
P29475	1434				
P29476	1429				
O19132	1435				
Q29498	186				e^{-63}
Q9Z0J4	1429			77,89	

P29475	1434	TR6317 c0_g1_i1 TR22843 c0_g1_i2, TR22843 c0_g1_i1	Corpo Cavernoso	77,62	0
P29476	1429			77,89	
O19132	1435			77,56	
Q29498	186			61,83	e^{-66}

- **Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (EC 1.14.13.39):** Os alinhamentos de contigs de aorta e corpo cavernoso com as oito proteínas selecionadas foram validados e serão detalhados na Tabela 15. Apesar de terem ocorrido bons hits com contig de cérebro, na validação ele mostrou ser na verdade sequência de nNOS.

Tabela 15: Contigs da tartaruga que representam a proteína óxido nítrico endotelial (eNOS)

Proteína	Tamanho (aa)	Contigs	Biblioteca	% Cobertura	e-value
P29473	1205	TR9612 c0_g1_i1, TR9612 c0_g2_i1	Aorta	93,86	0
P29474	1203			93,18	
P70313	1202			94,09	
Q62600	1202			94,09	
Q9TUX8	1205			93,86	
Q28969	1205	TR9612 c0_g2_i1	Corpo cavernoso	93,44	e^{-41}
P97270	100			98,00	
P79209	99			100,00	
P29473	1205			91,12	
P29474	1203			92,10	
P70313	1202	TR9598 c0_g1_i1, TR9598 c0_g1_i2, TR9598 c0_g2_i1	Corpo cavernoso	92,18	0
Q62600	1202			92,18	
Q9TUX8	1205			91,95	
Q28969	1205			91,54	

P97270	100	TR9598 c0_g2_i1	98,00	e^{-41}
P79209	99		98,99	e^{-51}

Tabela 16: Resultados sumarizados das validações para nas bibliotecas de cérebro, aorta e corpo cavernoso de *Chelonoidis carbonária*

Proteína	Cérebro		Aorta		C.C.	
	1° passo	Validação	1° Passo	Validação	1° Passo	Validação
Tir. Hidrox.	✓	✓	x	N.A.	x	N.A.
Dopa Decarb.	✓	✓	✓	X	x	N.A.
Dopamina Hidrox.	✓	✓	✓	✓	✓	x
PDE5	✓	✓	✓	✓ *	✓	✓
sGC	✓	✓	✓	✓	✓	✓
nNOS	✓	✓	✓	X	✓	✓
eNOS	✓	x	✓	✓	✓	✓

N.A.= Validação não aplicável.

✓ Contigs Homólogos encontrados

x Contigs Homólogos não encontrados

✓* Contig foi encontrado, entretanto o percentual de alinhamento foi de apenas 15 %

Tabela 17: Contigs do transcriptoma de aorta isolada de *C. carbonaria* foram comparadas com proteínas humanas.

Proteínas Humanas	Genes Humanos	Biblioteca de Aorta (contigs)	query size (aa)	% coverage	% identidade
eNOS	NOS3	TR9612	1129	93	74
		c0_g1_i1			
		TR9612	687	93	76
		c0_g2_i1			
sGC subunit β_1	GUCY1B3	TR26686	421	98	97
		c0_g1_i1			
		TR26686	421	55	97
		c0_g2_i1			
sGC subunit α_1	GUCY1A3	TR8605	690	67	84
		c0_g1_i1			

5. DISCUSSÃO

Neste primeiro capítulo caracterizamos farmacologicamente a contração induzida por estímulo de campo elétrico e a participação da via de sinalização NO-GCs-GMPc no relaxamento de anéis de aorta de duas espécies de répteis: *C. carbonaria* (jabuti-piranga) e *P. gutattus* (cobra dos milharais).

Identificar quais mediadores estão envolvidos em uma contração evocada por estímulo de campo elétrico (EFS) é um importante passo no entendimento da fisiologia comparada, permitindo inferir detalhadamente sobre a participação autonômica no evento de contração muscular, e consequente regulação da resistência vascular periférica. Conforme observado na **Figura 2**, mesmo na presença de antagonistas muscarínicos, purinérgicos, agentes simpatolíticos e da toxina tetrodoxina, a contração induzida por EFS em *C. carbonaria* não foi alterada, sugerindo que este evento contrátil ocorreu por estimulação direta ao músculo liso vascular. Duas hipóteses surgem na tentativa de explicar este achado: (1) a densidade de nervos presente no segmento vascular é reduzida, de forma que é necessário um grande estímulo para que uma quantidade maior de fibras sejam evocadas ou (2) inexistência de feixes nervosos na aorta, de maneira que a liberação de mediadores contráteis como noradrenalina e acetilcolina seja inteiramente de origem humoral. A segunda hipótese é refutada diante do achado que aortas de crocodilo e de lagartos são amplamente inervada por nervos colinérgicos e adrenérgicos, respectivamente ^{21, 22}.

Entretanto, a estimulação de campo elétrico em anéis de aorta isolados de *P. gutattus* foi inibida na presença de antagonista adrenérgico e agente

simpatolítico. Isto fortemente sugere que as catecolaminas vasoativas como noradrenalina e/ou dopamina podem estar diretamente envolvidas na contração, visto que ambos mediadores são de origem simpáticas e interagem com receptores alfa adrenérgicos do tipo 1. Achados similares são reportados em tecidos vasculares de mamíferos, relacionando a liberação de noradrenalina a partir de nervos transmurais no controle do tônus vascular ⁴³.

A resistência à tetrodotoxina observada em preparação de anéis de aorta de *P. gutattus* foi também relatada em outra espécie de serpente de hábitos constritor, a *T. sirtalis* e em *C.d. terrificus* (cascavel) ⁴⁰⁻⁴¹. Embora no presente trabalho a ferramenta utilizada a fim de averiguar a participação neuronal não inibiu a resposta contrátil, devido observarmos a redução da resposta frente a fentolamina e guanetidina, garantimos que a resposta observada não é estimulação direta ao músculo. Resultado similar (dado não publicado) foi encontrado em aorta de cascavel na qual também apresenta sensibilidade a antagonista adrenérgico, mas é resistente ao tratamento à tetrodotoxina.

A resistência à tetrodotoxina em répteis apresenta-se como uma característica de co-adaptação. Estudos realizados com a serpente *T. sirtalis* identificou que sua principal presa, o anfíbio *T. granulosa*, é capaz de secretar toxinas por meio de sua pele e que a o grau de intensidade da resistência à tetrodotoxina nestas serpentes varia conforme a quantidade deste anfíbio na natureza, sugerindo que a resistência à tetrodotoxina em serpentes consiste em um fenômeno de auto-proteção das serpentes contra suas presas ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. Canais de sódio TTX-resistentes são encontrados em mamíferos, sobretudo em gânglio da raiz dorsal, fibras sensoriais do tipo C, músculo esquelético

desnervado, e músculo cardíaco⁴⁴⁻⁴⁸. A diferença entre canais entre canais de sódio TTX-sensíveis e TTX-resistentes está na sequência de aminoácidos do segmento S5-S6 do canal iônico, reduzindo a sensibilidade à ligação com a tetrodotoxina, sendo necessária uma concentração 1000 vezes maior em canais TTX resistentes para que se observe sua inibição^{40, 47}.

Visto que foi impossível investigar detalhadamente a contração evocada por EFS em anéis de aorta isolados *C. carbonaria*, realizou-se a adição exógena de conhecidos agentes neurotransmissores tais como noradrenalina e acetilcolina. Curiosamente, a acetilcolina, que é comumente utilizada em preparações vasculares *in vitro* para avaliar integridade endotelial ao induzir relaxamento óxido nítrico-dependente em mamíferos, evocou resposta contração-dependente com potência superior à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio preservado. Este achado não se apresenta de forma isolada e pontual, visto que acetilcolina é capaz de induzir contração em artérias isoladas de anfíbios e peixes pulmonares⁴⁹⁻⁵⁰. Dados ainda não publicados do nosso grupo mostram que a acetilcolina é capaz de contrair anéis de artéria pulmonar de sagui (*Callithrix jacchus*) embora a inervação adrenérgica em mamíferos seja mais proeminente que a colinérgica.

Sabe-se que em mamíferos a acetilcolina promove relaxamento ao interagir com receptores muscarínicos, induzindo o aumento da concentração intracelular de cálcio, e consequente aumento na produção de óxido nítrico. Em situações de disfunção endotelial ou remoção mecânica do endotélio, a acetilcolina ao interagir com receptores muscarínicos induz contração muscular⁵¹. A inibição da síntese de óxido nítrico ocorrida após o tratamento com o, L-NAME, promoveu aumento da resposta máxima contrátil induzida por ACh

devido a inibição endógena da produção de NO. A adição de atropina, um antagonista muscarínico inespecífico, aboliu a resposta contrátil sugerindo que a resposta colinérgica é exclusiva via interação com receptores muscarínicos.

Visto que a acetilcolina não induz relaxamento endotélio-dependente, a avaliação da integridade endotelial em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* ocorreu pela adição de ATP (3 uM), um conhecido agente envolvido na produção endógena de NO⁵²⁻⁵³. Os mediadores purinérgicos ATP e ADP foram capazes de induzir relaxamento concentração-dependente e este relaxamento foi praticamente abolido na presença de L-NAME, indicando que o mecanismo de ação dos mediadores purinérgicos é exclusivo via produção de NO. Ambos mediadores foram capazes de promover relaxamento em anéis de aorta isolados de outros répteis⁵⁴. Apesar de sua estrutura química simples e de serem subprodutos de reações bioquímicas, o ATP e ADP apresentam um importante papel fisiológico nos diferentes sistemas biológicos de mamíferos. A crescente busca no desenvolvimento de novos agonistas exógenos capazes de ativar receptores purinérgicos tem aberto novas perspectivas no entendimento do papel purinérgico em diversos modelos animais. Mediadores como a adenosina são importantíssimos em estado de hipóxia, condição esta na qual alguns répteis marinhos podem eventualmente serem encontrados, corroborando os dados farmacológicos encontrados neste estudo relacionando a produção de mediadores purinérgicos e a produção de NO, e consequente controle do tônus vascular.

A histamina é um importante mediador envolvido na produção de óxido nítrico endógeno⁵⁵⁻⁵⁷. Estudo realizado em embriões de tartaruga demonstrou que a histamina está envolvida no controle da pressão arterial nesse período

de vida ⁵⁸. Conforme demonstrado na figura 5, o mecanismo de ação do relaxamento evocado por histamina é exclusivamente NO-dependente. A produção de NO pode ocorrer devido a interação de histamina com receptores H₁ ou H₂ ⁵⁹⁻⁶⁰. Entretanto, em aorta de *C. carbonaria* ambos receptores estão envolvidos na produção de NO, visto que na presença de pirilamina ou cimetidina a resposta máxima é reduzida.

Diferente do observado em *C. carbonaria*, a ACh foi capaz de induzir resposta relaxante em anéis de aorta isolados de *P. guttatus*. Esse efeito foi completamente abolido na presença do L-NAME, indicando que a produção de NO está envolvida no mecanismo de ação da ACh. Resultado semelhante foi observado em anéis de aorta da serpente cascavel²³. A guanilato ciclase solúvel (GCs), um dos receptores endógenos do NO, está funcionalmente presente em ambos répteis investigados neste trabalho, visto que o SNP (doador de óxido nítrico) foi capaz de promover resposta relaxante e esta resposta é reduzida na presença de ODQ, substância capaz de oxidar o sítio heme (óxido nítrico dependente) da guanilato ciclase.

A interação do NO com a GCs potencializa em 400 vezes a formação do segundo mensageiro GMPc a partir do GTP ⁴. Enzimas fosfodiesterases são capazes de hidrolisar o GMPc em GMP (ou AMPc em AMP) ⁶¹. Neste estudo buscou-se investigar a ação de inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 sobre a resposta relaxante vascular de *C. carbonaria*. O tadalafil (inibidor da fosfodiesterase do tipo 5) induziu resposta relaxante em *C. carbonaria* sendo está reduzida na presença de ODQ. Isto ocorreu devido a redução da produção endógena de GMPc, devido a inativação do sítio heme, reduzindo a concentração do substrato GMPc. O efeito do tadalafil não foi investigado em

P. guttatus, devido quantidade limitada de exemplares desta espécie estarem a nossa disposição.

Uma redução na biodisponibilidade de NO está relacionada com diversas enfermidades como hipertensão, diabetes e obesidade ⁶²⁻⁶³. Diante disso, cresceu o interesse em buscar novas alternativas em modular a GCs de forma independente do NO, com o intuito de aumentar a produção de GMPc. Agentes estimuladores da guanilato ciclase solúvel como o BAY 41-2272 possuem a capacidade de atividade de modular a guanilato ciclase solúvel, interagindo com o sítio heme (mesmo sítio que o NO interage com a sGC) ⁶⁴. Quando a enzima é oxidada pela ação do ODQ, a curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 é deslocada a direita, reduzindo a potência deste agente ⁶⁵⁻⁶⁶. Outra classe de droga responsável por modular a sGC são os ativadores da guanilato ciclase solúvel. Este em situações de oxidação do sítio heme possuem seu efeito potenciado ⁶⁷.

Ambos BAY 41-2272 e BAY 60-2770 (estimulador e ativador de GCs, respectivamente) foram capazes de induzir relaxamento em anéis de aorta isolados de *C. carbonaria* de forma concentração-dependente. Algo notório é a elevada potência destes agonistas (100 vezes maior deste agente) quando comparado com mamíferos ou até mesmo com répteis (cascavel) ²³. Estes resultados indicam que mais do que uma GCs responsiva ao NO, a GCs possui capacidade de amplificar intensamente o estímulo gerado por estes moduladores desenvolvidos recentemente.

As enzimas envolvidas na síntese de catecolaminas (tirosina hidroxilase, Dopa descarboxilase e Dopamina Hidroxilase) não foram validadas/encontradas nas bibliotecas de aorta e corpo cavernoso de *C.*

carbonaria, entretanto foram reportadas em cérebro (controle positivo). Apesar desta aparente ausência, resultados funcionais demonstraram que a noradrenalina foi capaz de induzir resposta contrátil concentração-dependente em aortas isoladas de *C. carbonaria*, sugerindo participação adrenérgica na manutenção do tônus vascular nesta espécie.

O achado transcriptômico para enzimas eNOS e GCs corroboram com os dados farmacológicos, indicando a participação nitrérgica na regulação do tônus de aorta de *C. carbonaria*. Diferente do observado em *C.d. terrificus*, a nNOS não foi encontrada em aorta de *C. carbonaria*, resultado este similar ao observado em mamíferos e sugerindo que a única fonte produtora de NO é de origem endotelial. Embora a enzima PDE 5 não seja encontrada na análise transcriptômica em aorta de *C. carbonaria*, os ensaios funcionais com tadalafil (um inibidor específico de PDE 5) demonstraram a participação desta enzima em regular os níveis intracelulares de GMPc. Provavelmente tanto as enzimas envolvidas na síntese de catecolaminas como a própria PDE 5 não foram validadas na análise transcriptômica em virtude da dificuldade em localizar e comparar com banco de dados transcriptômicos escassos de répteis.

Sobre o ponto de vista evolutivo, estes achados encontrados neste primeiro capítulo sugerem que uma via de sinalização tão complexa e sensível como a NO-sGC-GMPc está presente em ambos répteis investigados (*C. carbonaria* e *P. gutattus*), regulando o tônus vascular de segmentos de aorta e responsiva a estímulos de drogas comumente utilizadas como o ATP e o BAY 60-2770.

6. Conclusão parte 1

- A contração induzida por estímulo de campo elétrico em anéis de aorta isolada de *P. guttatus* é catecolamina-dependente e resistente a tetrodotoxina.
- A metodologia aplicada envolvendo protocolos de farmacologia clássica não foi capaz de gerar um evento indireto e neuronal, inviabilizando a caracterização da contração evocada por estímulos de campo elétrico em aortas isoladas de *C. carbonária*.
- A via de sinalização NO-GCs-GMPc está funcionalmente presente e envolvida no relaxamento de aortas isoladas de *C. carbonaria* e *P. guttatus*.
- Contigs do transcriptoma para proteínas eNOS e GCs estão presentes em aorta de *C. carbonaria* e apresentam uma identidade superior a 70% quando comparado às proteínas humanas.

Capítulo II

7. Introdução

Órgãos intromitentes são estruturas funcionais masculinas que possuem objetivo de transferir gametas e constituem uma adaptação de seres que desenvolveram fertilização interna, sendo encontrados em animais vertebrados ⁶⁹. Embora alguns animais (aves e o réptil *Sphenodon sp*) apresentem fecundação interna, eles não possuem pênis intromitentes sendo essa transferência dos gametas ocorrida por sobreposição de cloaca ⁷⁰.

Para que o pênis seja eficiente na transferência dos gametas, ele precisa ser firme o suficiente para penetrar na vagina ou cloaca e maleável o bastante para sobrepor a curvatura de cascos ou outras estruturas, conforme observado em quelônios ⁷¹. Embora a morfologia do pênis dos animais amniotas varie, é comum a presença de estruturas em formas de cavernas, denominada de corpos cavernosos, nos quais ficam repletas de sangue (em mamíferos e répteis) ou de linfa (algumas aves) a depender da classe ou de variações inter-espécie ⁷²⁻⁷³.

Os répteis constituem uma classe importantíssima no estudo evolutivo da fisiologia da ereção, pois constituem os primeiros animais a desenvolverem pênis intromitente, visto que aves e mamíferos evoluíram a partir de um ancestral comum aos répteis. A ordem dos escamados (Squamata) apresentam pênis denominado hemipênis, devido sua estrutura ser pareada, cilíndrica e bilateral que são completamente invertidos quando não utilizados na sua cauda (figura 12 e 13) ^{70, 74-76}.



Figura 12: *Crotalus durissus terrificus* hemipenis (A) Vista ventral mostrando arranjo geral de hemipênis invertido: (1) Base; (2) Corpo (3) Ápice (4) Músculo retractor magnus (B) Hemipênis evertido (1) Base (2) corpo (3) ápice. Observe a presença de espículas na região do corpo (C) Microscopia de varredura mostrando a região central (1) periférica (2) e sinusóides circundado por tecido conectivo. Inset: Ultraestrutura amplificada da camada externa mostrando feixes radiados de músculo liso cavernosal (3) e o tecido conectivo. (D) Músculo liso detectado por coloração de tricromico de Masson. Referência 75.

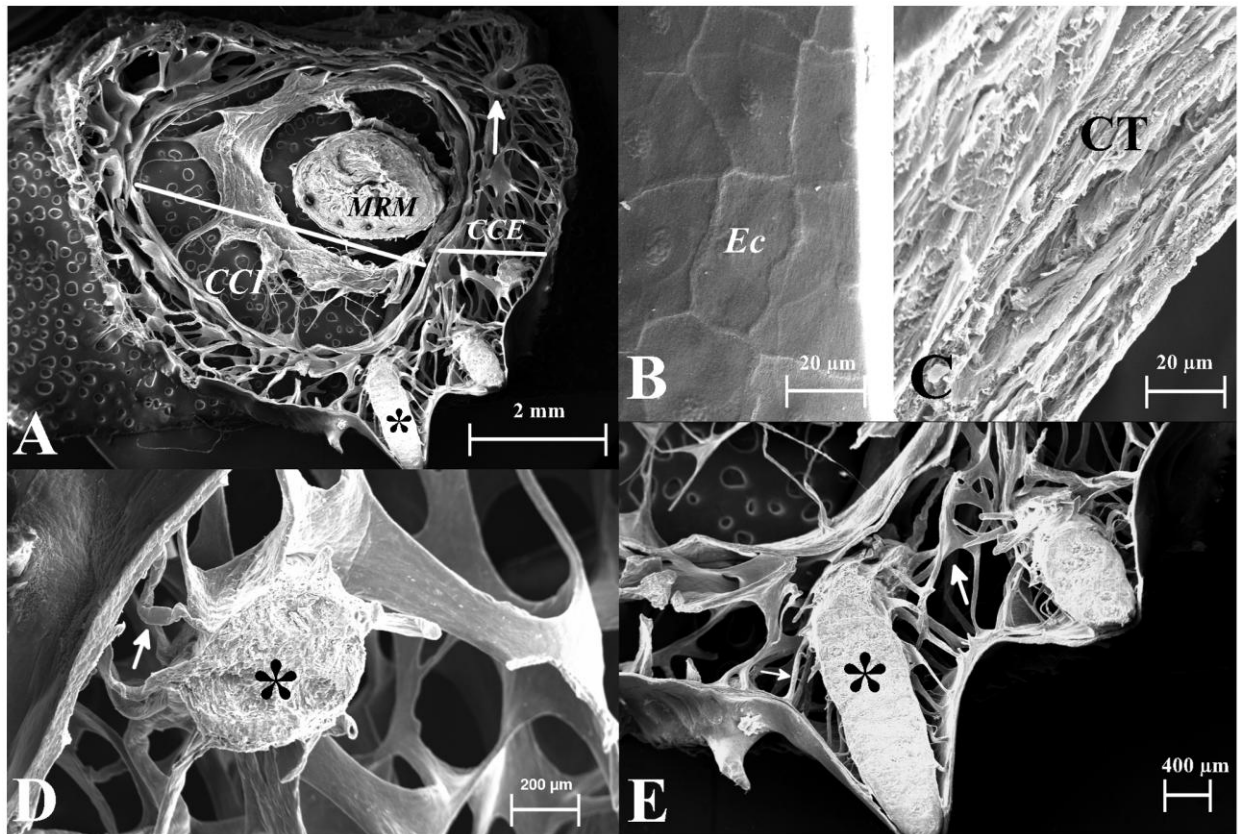


Figura 13. Microscopia de varredura da região do corpo do hemipenis de *Crotalus durissus terrificus*. A: Visão geral do corpo mostrando dois corpos cavernosos, um interno (CCI) e outro externo, próximo o sulco espermático; músculo retractor magnus (MRM), espículas circundando o corpo (**) e é observado um número de trabécula maior em CCE do que em CCI. B: Detalhe da superfície externa do hemipênis sem as espículas. São observadas células epiteliais (Ec) cobrindo a túnica albugínea (TA) na face externa do hemipênis. C: Detalhes das camadas de tecido conectivos sobre células epiteliais presentes em B. O tecido conectivo presente não é estratificado e composto de 2- 5 camadas. D e E: Detalhe da ponte de inserção de espículas em CCE e (*) na região do tronco, setas apontam para região de músculo liso que ancora na região espiculada do hemipênis. Referência 75.

7.1 Histórico da Fisiologia da Ereção

A primeira descrição de disfunção erétil data por volta de 2000 AC sendo registrada em um papiro egípcio. Foram reportados dois tipos de etiologias: A natural (incapacidade humana de obter a ereção durante o ato sexual) e a sobrenatural (dificuldade devido espíritos maus). Em outro momento, Hipócrates relatou a disfunção erétil em indivíduos da cidade de Schyntia e atribuiu esta incidência ao hábito de andar a cavalo. Posteriormente,

Aristóteles afirmou que 3 ramos de nervos transportavam energia e espírito ao pênis e que a ereção acontecia devido ao influxo de ar para o órgão sexual ⁷⁶.

Esta teoria foi bem aceita até o momento em que Leonardo da Vinci (1504) identificou sangue no interior de corpos cavernosos colocando em dúvida a necessidade de influxo de ar, entretanto, esse registro permaneceu em segredo até o início do século XX ⁷⁷. No ano de 1585 Ambroise Paré demonstrou que o pênis era composto de feixes nervosos, artérias, veias, dois corpos cavernosos, trato urinário e de quatro músculos. Segundo Ambroise “quando o homem está inflamado de desejo o sangue vai para o pênis tornando-o ereto”. Dionis (1718) adicionou o pensamento de vênulo-oclusão ao afirmar que os músculos pressionavam as veias. Hunter (1785) reforçou esta idéia ao dizer que a “compressão de veias previnha o efluxo de sangue” ⁷⁷.

Grandes avanços foram obtidos entre 1980 e 1990 a fim de compreender o fenômeno hemodinâmico da ereção. Dentre estes está o papel do músculo liso na regulação do influxo de sangue através das artérias e na redução do efluxo através da compressão de veias. Outro avanço importante foi a descoberta da regulação neural através do mediador óxido nítrico, do papel modulador do endotélio sobre o tônus da musculatura lisa cavernosal, bem como de enzimas fosfodiesterases.

7.2 Neurofisiologia da ereção em mamíferos

A função erétil é mediada por estímulos táteis, olfatórios, visuais e mentais cuja integração e processamento ocorrem no sistema nervoso central ⁷⁸. A participação do sistema nervoso pode ainda ser dividida em inervação autonômica, sendo classificada como simpática e parassimpática e em somática, sensitiva e motora. A via aferente envolve nervos sacrais (S2-S4) e apresenta receptores na pele do pênis, glândula, uretra e dentro do corpo cavernoso. Essas fibras convergem e formam o nervo dorsal, que ao se unir com nervos pélvicos origina o nervo pudendo interno. As fibras deste nervo ascendem através do feixe espino-talâmico até o tálamo e córtex sensitivo ⁷⁹. A

via eferente é formada pelo sistema autonômico simpático tóraco-lombar (T10-L2), pelo parassimpático sacral (S2-S4) e do sistema nervoso somático (S2-S4) (Figura 14).

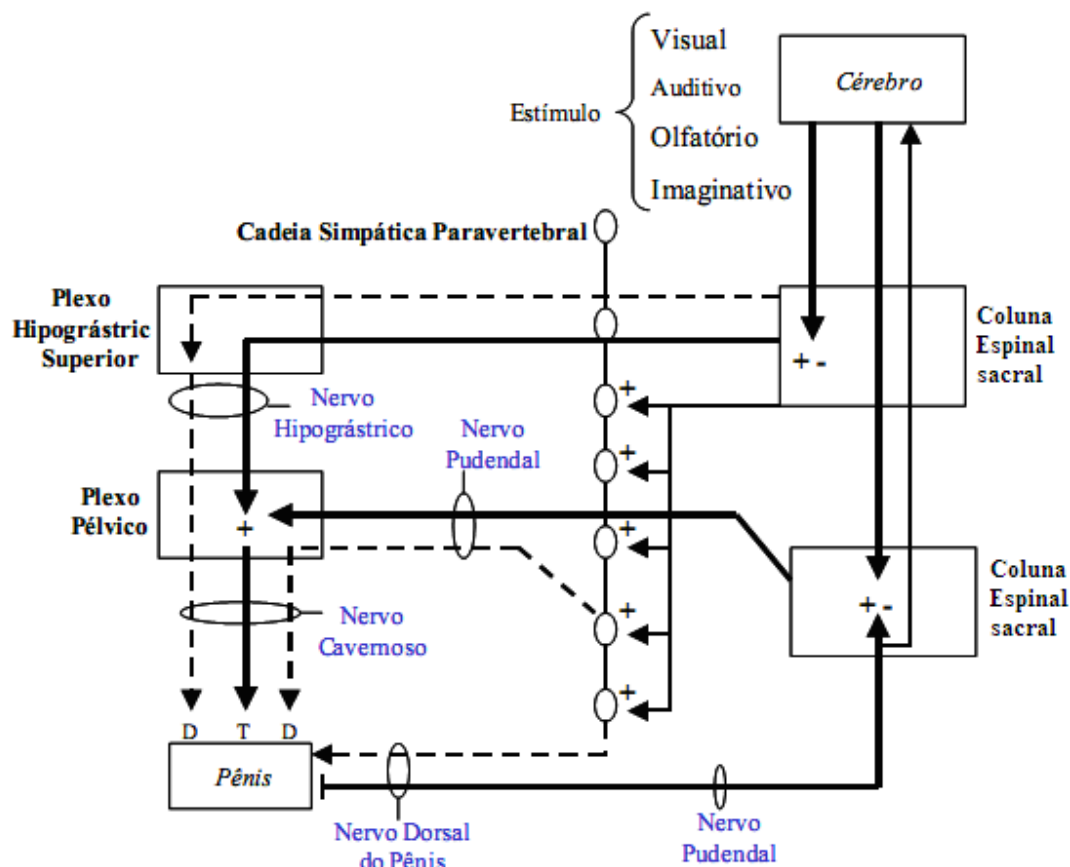


Figura 14. - Diagrama representando as vias centrais e periféricas que regulam a ereção peniana. T, tumescência peniana; D, detumescência peniana. Mecanismos sinápticos excitatórios e inibitórios são indicados por + e -, respectivamente. FONTE: referência 79.

A função erétil envolve um fenômeno neuro-vascular, que como citado acima envolve o sistema nervoso central e periférico. O pênis mantém seu estado flácido devido a ação constritora da noradrenalina sobre vasos penianos e o músculo liso cavernosal⁸⁰. A liberação deste mensageiro químico estimula os receptores do tipo α -adrenérgicos presente na musculatura lisa dos vasos e do músculo cavernosal, gerando trifosfato de inositol (IP3) e Diacilglicerol (DAG) a partir do fosfolípido de membrana difosfatidilinositol 4,5 bifosfato. O IP3 liga-se à receptores presentes no retículo sarcoplasmático (atua como estoque de cálcio) liberando o íon cálcio para o sarcoplasma. O cálcio, assim como no músculo estriado, age como componente regulador e essencial para o processo contrátil. No citosol, o cálcio irá interagir com a

proteína calmodulina formando um complexo denominado cálcio-calmodulina. Este complexo ativa a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK). Após ativada, esta quinase irá fosforilar a subunidade regulatória da cadeia leve da miosina, tornando possível a capacidade de quebra do ATP na miosina ⁸¹.

Estudos demonstraram que a participação do sistema nervoso simpático no estado detumesciente é algo importantíssimo⁸⁰, pois a sua contribuição para o aumento da concentração de cálcio no citosol é intensa. Pesquisas demonstraram que a diminuição da concentração de cálcio no citosol induz a redução do complexo cálcio – calmodulina - MLCK tendo como consequência o desmembramento do complexo actina-miosina e relaxamento do músculo liso ⁸¹⁻⁸³.

Durante a ereção ocorre algo inverso do que observamos no estado flácido. A começar que o sistema nervoso simpático não se comporta como sistema predominante. Fibras parassimpáticas e fibras não- adrenérgicas e não-colinérgicas (NANCs) aumentam a sua participação no estado erétil e secretam acetilcolina e óxido nítrico, respectivamente ⁸¹.

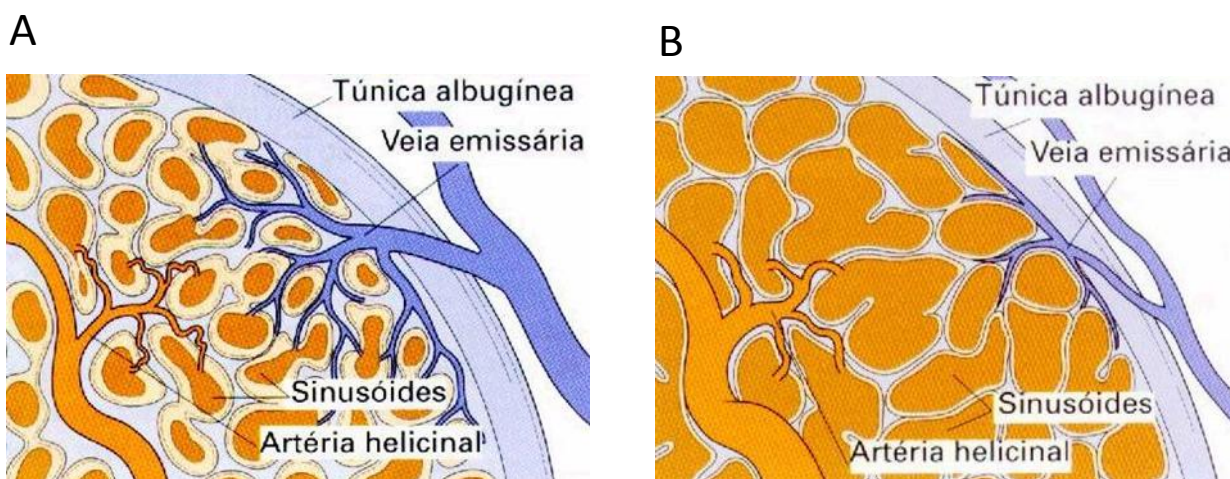


Figura 15: Ilustração representativa do fenômeno hemodinâmico envolvido no estado detumesciente **(A)**. Observa-se forte influência simpática causando baixo fluxo sanguíneo devido contração das artérias helicinais, musculatura lisa e grande drenagem venosa. Ilustração representativa do fenômeno hemodinâmico envolvido no estado tumescente **(B)**. Observa-se forte influência parassimpática e de fibras não-adrenérgica não-colinérgica causando aumento do fluxo sanguíneo e da pressão intracavernosa devido ao relaxamento da musculatura lisa cavernosa.

7.3 O óxido nítrico e a ereção peniana em mamíferos

No início dos anos 90, estudos realizados em tiras de corpos cavernosos isolados de coelhos e de humanos identificaram a participação do fator relaxante derivado do endotélio / óxido nítrico no relaxamento de corpos cavernosos evocado por estímulo de campo elétrico ⁸⁴. O tratamento com tetrodotoxina aboliu o relaxamento indicando que este possuía origem neural. Situação idêntica aconteceu após o tratamento com azul de metileno, oxihemoglobina e L-NAME demonstrando que a via NO-GMPc estava envolvida ⁸⁵ de forma que a descoberta e conceito de óxido nítrico como neurotransmissor estava sendo formada.

Depois de identificada a participação do NO em estudos *in Vitro*, buscou-se investigar sua ação em modelos *in Vivo*. Para tanto, o gânglio pélvico foi estimulado e obtido o aumento da pressão intracavernosa. Por conseguinte, administrou-se o inibidor da enzima óxido Nítrico Sintase (L-NAME), no qual observou-se a redução na pressão intracavernosa ⁸⁵.

Assim, o NO corresponde ao principal mediador envolvido na função erétil em mamíferos ⁸⁶⁻⁸⁸. Em condições normais o óxido nítrico apresenta-se na forma de gás sendo produzido e liberado através de células endoteliais e fibras autonômicas não-adrenérgicas e não- colinérgicas (NANC) difundindo-se para o interior da trabécula. A produção de óxido nítrico requer a participação da enzima óxido nítrico Sintase (NOS), sendo esta expressa em diversos tecidos sob três diferentes isoformas: neuronal, endotelial e induzida ⁸⁻¹⁰. As isoformas neuronal e endotelial necessitam de cálcio, oxigênio, arginina e de NADPH para formação de NO. A isoforma induzida, que é principalmente expressa em células de defesa, não envolve a participação de cálcio e corresponde a única isoforma que não está envolvida na ereção peniana.

Diversos estudos buscaram comprovar a importância da participação de fibras nitrérgicas na função erétil. Isto foi realizado ao utilizar bloqueadores da NOS em fibras estimuladas eletricamente de rato ⁸⁴⁻⁸⁵ e macaco ⁸⁸ onde foi observado uma redução na ereção.

O NO promove a ereção peniana após difundir-se localmente no músculo liso e ligar-se a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC). Esta enzima possui um sítio específico de ligação para o NO de modo que ela funciona como um “receptor” intracelular para o óxido nítrico ⁸⁹. A interação NO-GCs provocará uma alteração conformacional na enzima de modo potencializar a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina Monofasfato cíclico (GMPc). O GMPc irá ativar uma proteína quinase- dependente de GMPc (PKG) no qual irá fosforilar certas proteínas e canais iônicos, resultando na abertura dos canais de potássio e hiperpolarização de membrana, sequestro do cálcio intracelular pelo retículo sarcoplasmático, inibição dos canais de cálcio com diminuição de seu influxo resultando em diminuição dos níveis de cálcio intracelular e causando relaxamento das células do músculo liso, necessário para ereção ^{80,90-92}. Entre outros possíveis mecanismos de ações da PKG estão alterações no estado de fosforilação da cadeia leve da miosina resultando em mudanças em outras vias de transdução de sinais e inibição da liberação pré-sináptica ⁹³. Para retornar ao estado flácido, o GMPc é hidrolisado em GMP através de uma classe de enzimas denominadas de fosfodiesterases (PDE) dentre estas PDE do tipo 5 possui atividade específica em GMPc ⁹⁴.

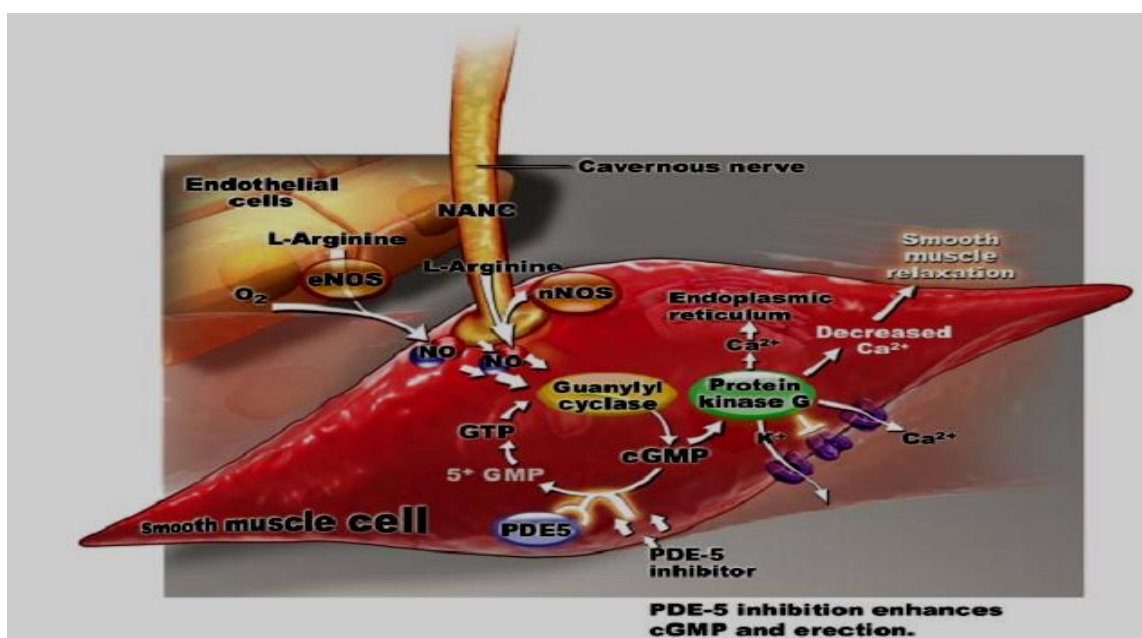


Figura 16. Mecanismo de ação dos inibidores de PDE5.

7.4 Óxido nítrico e a ereção peniana em serpentes

Recentemente foi observado que acetilcolina e o nitroprussiato de sódio promoviam relaxamento em corpos cavernosos isolados de cascavel e que essas respostas eram abolidas na presença de L-NAME (100 μ M) e ODQ (10 μ M), respectivamente, indicando a participação da via NO-sGC-cGMP em corpos cavernosos de *C. d. terrificus* (figura 17) ⁴¹.

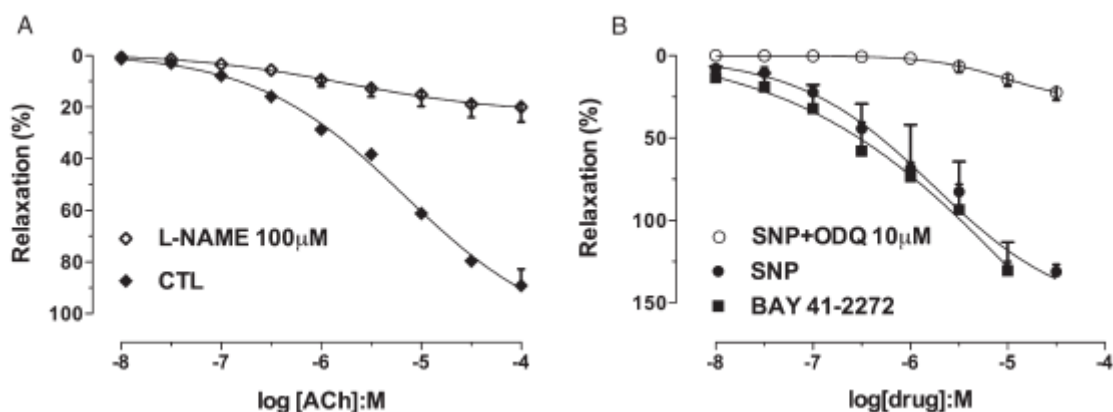


Figura 17 Curva concentração resposta a (A) Acetilcolina (ACh, 0,01–100 mM) na ausência (controle—CTL) e presença de L- arginina metil-ester (L-NAME, 100 μ M) e (B) o doador de óxido nítrico SNP (0,01–30 μ M) na ausência (controle—CTL) e presença do inibidor de sGC 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ M) bem como resposta ao estimulador BAY 41-2272 (0,01–10 μ M) na região não espiculada do hemipenes de cascavel (*C. d. terrificus*). O percentual de relaxamento foi calculado em relação à contração evocada por fenilefrina. Os pontos são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de n=3-4. Referência 41

Estímulos de campo elétrico foram capazes de induzir relaxamento frequência- dependente e foram abolidos na presença de L-NAME (100 μ M), sugerindo a participação do NO no relaxamento, entretanto essa resposta não foi alterada na presença de TTX(1 μ M) em corpos cavernosos de cascavel (*C. d. terrificus*) (figura 18).

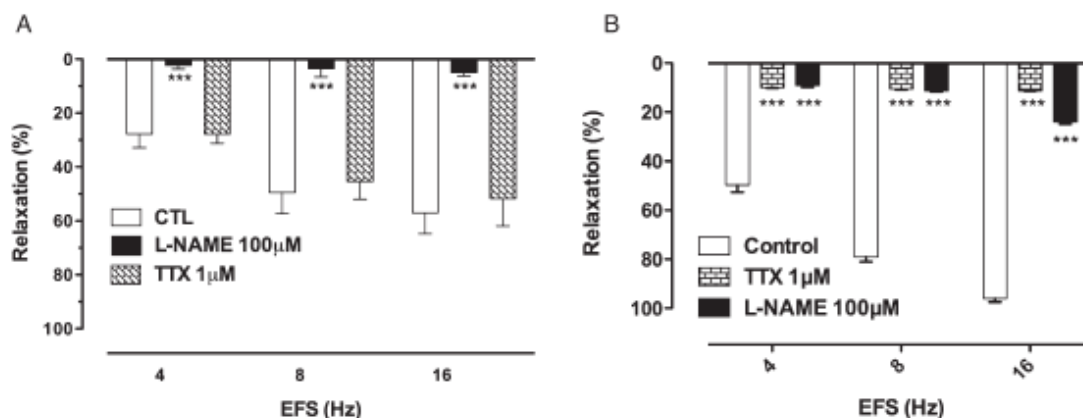


Figura 18: Relaxamento frequência dependente induzido por estimulação de campo elétrico (EFS) **(A)** em hemipenis de *C. d. terrificus* (cascavel) na ausência (control-CTL) e presença do inibidor do óxido nítrico sintase Nw-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 100 μM), o inibidor da guanilato ciclase solúvel 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μM), e o bloqueador de canal de sódio TTX (1 μM). **(B)** Corpo cavernoso de from macaco na ausência (CTL) e na presença de L-NAME (100 μM) e TTX (1 μM). Dados estão representados como média ± erro padrão da média; (n=6). ***p<0,001 comparado com controle. Referência 41.

7.5 Justificativa e relevância

Os répteis foram os primeiros animais a desenvolverem pênis intromitente e com ereção peniana mediada por aumento do fluxo sanguíneo. O óxido nítrico corresponde ao principal mediador endógeno envolvido na ereção de mamíferos e recentemente nosso grupo demonstrou sua participação no relaxamento de corpos cavernosos isolados de cascavel (serpente perçonhenta). Diante desses achados, acreditamos que a via NO-GCs-GMPc também esteja envolvida no relaxamento de corpos cavernosos isolados de répteis mais antigos como serpentes constritoras, lagartos ou até mesmo quelônios (tartarugas) e que esta via foi desenvolvida em corpos cavernosos desses animais e conservada em corpos cavernosos de mamíferos.

Compreender e comparar a fisiologia da ereção utilizando ferramentas farmacológicas consiste em um importante passo no entendimento do processo evolutivo deste evento fisiológico, gerando informações de

possíveis novos alvos farmacológicos no tratamento da disfunção erétil em humanos ou informando que este “novo alvo”, na verdade, sempre esteve presente e envolvido na ereção de vertebrados inferiores.

Serpentes de hábitos constrictors são milhões anos mais antigas evolutivamente que serpentes perçõhentas. Portanto, utilizaremos a serpente *P. guttatus* (*Corn snakes*) como modelo experimental comparando-a com resultados descritos na literatura sobre *C. d. terrifius* (Cascavel) e mamíferos.

8. Objetivo geral

No presente trabalho buscamos caracterizar os mediadores envolvidos na contração e no relaxamento evocado por estímulo de campo elétrico e a presença da via NO-GCs-GMPc em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus* (Corn snake).

8.1 Objetivos específicos

- Averiguar a participação catecolaminérgica na contração evocada por estímulo de campo elétrico em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*.
- Avaliar a sensibilidade à TTX e a dependência do íon sódio na contração evocada por estímulo de campo elétrico em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*.
- Avaliar a presença da via NO-GCs-GMPc através do relaxamento evocados por ferramentas farmacológicas em corpos cavernosos de *P. guttatus* pré-contraídos por fenilefrina (3 μ M).
- Avaliar o envolvimento do óxido nítrico em relaxamento promovido por estímulo de campo elétrico em corpos cavernosos de *P. guttatus* pré-contraídos por fenilefrina (3 μ M).

9. Materiais e Métodos

9.1 Animais de experimentação

Exemplares de *P. guttatus* (Corn Snake) (machos; peso 0,7 Kg a 0,9 Kg) foram obtidos da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Os animais foram sedados com ketamina (50 mg/kg), anestesiados por inalação de isoflurano e eutanasiados por exsanguinação ⁴².

Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob protocolo N° 3949-1.

9.2 Protocolos Funcionais

9.2.1 Isolamento e montagem dos tecidos

Após realizar uma incisão ventral na região inferior à cloaca, os hemipênis invertidos foram expostos, removidos e imediatamente colocados em solução de Krebs-Henseleit (mM); NaCl (117), KCl (4.7), CaCl₂ (2,5), MgSO₄ (1,2) K₂PO₄, NaHCO₃ (25), glicose (11) mantido a 27 °C. Em seguida o músculo esquelético retrator do pênis e os tecidos conectivos foram removidos e os tecidos cavernosos foram dissecados. Os dois lóbulos de cada hemipênis foram separados e depois foram abertos e seccionados em duas tiras. Desta forma, cada animal forneceu quatro segmentos de corpo cavernoso dissecados, com comprimento por volta de 1 cm), 2 segmentos provenientes de cada hemipênis (PCC, sigla em inglês para *Pantherophis corpus cavernosum*).

Corpos cavernosos foram isolados e mantidos em solução nutritiva de Krebs-Henseleit gaseificados por mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e submetidas à tensão de 5 miliNewtons (mN) em banho de órgãos com capacidade de 10 mililitros (mL). As tiras de corpos cavernosos permaneceram em período de estabilização de 60 minutos com sucessivas lavagens a cada 15

minutos e reajuste de tensão. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 5.0, AD Instruments, Austrália).

9.2.2 Caracterização da contração induzida por estimulação de campo elétrico em corpo cavernoso de *P. guttatus*

Os Tecidos foram submetidos a estímulo de campo elétrico (30 V; 0,1 ms de duração, frequência de 4-16 Hz e train de estímulo de 30 segundos) na presença e na ausência de TTX (1 μ M), guanetidina (30 μ M) e fentolamina (10 μ M).

9.2.3 Avaliação do efeito da substituição do equimolar do NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estimulação elétrica.

Segmentos de *Pantherophis* CC foram estimulados eletricamente (30 V; 0,2 milissegundos, 30 segundos,) 4-16 Hz. As estimulações foram realizadas na presença e na ausência da solução de Krebs modificada, na qual o NaCl foi substituído de maneira equimolar por N-metil-D-glucamina (NMDG), com a seguinte composição em (mM): N-metil-D-glucamina (118), KCl (4,7), CaCl_2 (2,5), MgSO_4 (1,2), NaHCO_3 (25), KH_2PO_4 (1,2) e glicose (11) com pH 7.4

9.2.4 Avaliação da presença funcional da via óxido nítrico-guanilato ciclase solúvel

Tiras de *Pantherophis* CC foram pré-contraídas com fenilefrina (3 μ M) e após obtida uma contração sustentada, foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) na presença e na

ausência do inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME; 100 μ M), e do inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ ;10 μ M), respectivamente.

9.2.5 Caracterização do relaxamento evocado por estímulo de campo elétrico

Tiras de *Pantherophis* CC foram pré-contraídas com fenilefrina (3 μ M) e após obtida uma contração sustentada foram submetidas à estímulo de campo elétrico (30 Volts; 0,1 ms de duração, frequência de 4-16 Hz e train de estímulo de 30 segundos) na presença e na ausência de TTX (1 μ M) e L-NAME; (100 μ M).

9.3 Análise dos resultados

As contrações provocadas pelo estímulo elétrico (EFS) foram expressas em seus valores absolutos (mN). Os relaxamentos evocados por agonistas exógenos ou pelos estímulos de campos elétrico foram expressos como percentual da pré-contração induzida por fenilefrina.

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n). Para comparações das variáveis, usou-se o teste “t” de STUDENT pareado ou análise de variância (One-way ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni O programa Prisma (GraphPad Software) foi usado para estas análises. $p < 0,05$ foi aceito como significativo.

10. Resultados

10.1 Caracterização da contração induzida por estímulo de campo elétrico em corpo cavernoso de *P. guttatus*

A estimulação de campo elétrico (EFS) promoveu contrações frequência-dependente em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*. Os tratamentos com fentolamina (10 μ M) e guanetidina (30 μ M) reduziram a amplitude de contração evocada por EFS (**Figura 19**) (n=3 e n=4, respectivamente) ($p<0,05$). Entretanto, não foi observado alteração após a adição da tetrodotoxina (1 μ M) (n=4).

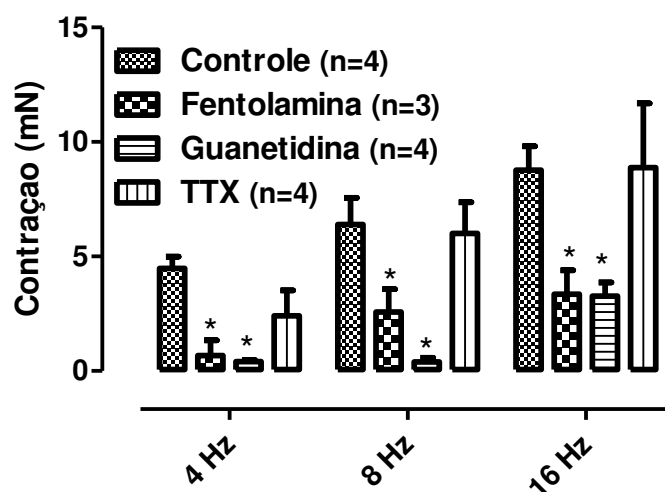


Figura 19: Contrações induzidas por estímulo de campo elétrico (EFS; 30V; 0,1ms; 4-16 Hz) em tiras de corpos cavernosos isoladas de *P. guttatus* na presença e ausência de fentolamina (10 μ M), guanetidina (30 μ M) e tetrodotoxina (1 μ M). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p<0,05$ vs. Controle; teste t Student não pareado.

10.2 Efeito da substituição equimolar do NaCl por N-metil-D-glucamina na contração induzida por estímulo de campo elétrico em corpo cavernoso de *P. guttatus*

A substituição equimolar de NaCl por N-metil-D-glucamina (NMDG) não alterou a resposta contrátil em *Pantherophis* CC, sugerindo não haver relação entre a redução da concentração de sódio e amplitude da contração evocada por estímulo de campo elétrico (EFS) (**Figura 20**) (n=3).

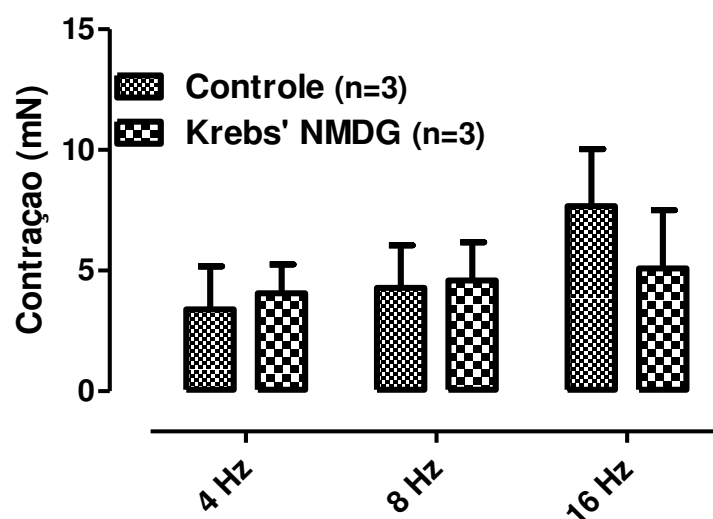


Figura 20: Estímulo de campo elétrico (EFS; 30 V; 0,1 ms; 4-16 Hz) em tiras de corpos cavernosos isolados de *P. guttatus* nutridos por solução de Krebs- Henseleit (modificado através de substituição equimolar de NaCl por NMDG). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

10.3 Avaliação funcional da presença da via óxido nítrico-guanilato ciclase solúvel em corpo cavernoso de *P. guttatus*

Acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) promoveram relaxamento concentração-dependente em *Pantherophis* CC (n=4 e n=3, respectivamente) (**Figura 21A e 21B**). A adição de L-NAME (100 μ M) reduziu a resposta máxima evocada por ACh em aproximadamente 40 % (p<0,05) (n=3).

Em contraste, o pré-tratamento com ODQ (10 μ M) induziu um intenso deslocamento à direita na curva construída na presença de SNP (n=3) (p<0,05).

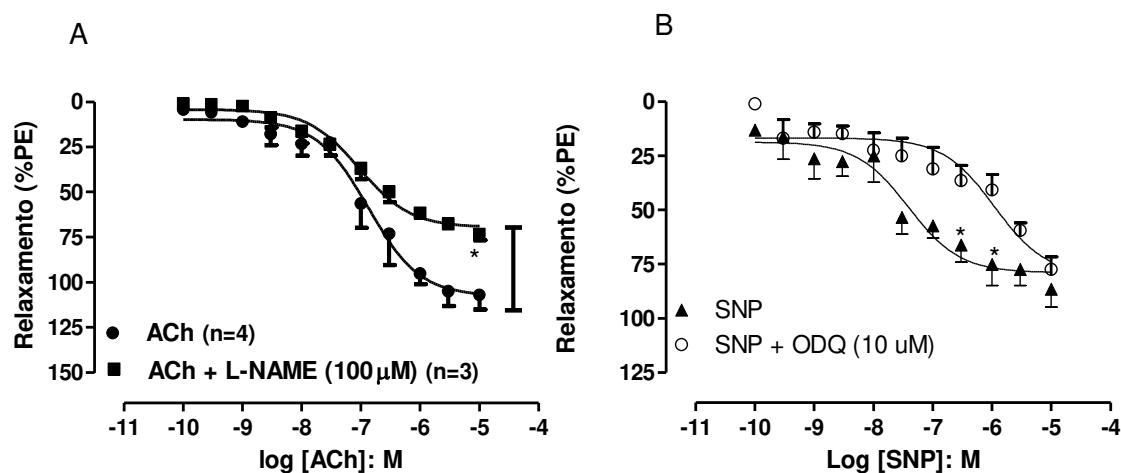


Figura 21: (A). Curvas concentrações- respostas à acetilcolina (ACh) na presença de N- metil ester de L- arginina (L-NAME; 100 μ M) **(B)** e nitroprussiato de sódio (SNP) na presença de 1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ; 10 μ M) em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * p<0,05 vs. ACh; #p<0,05 vs. SNP teste t de Student não pareado

Tabela 18: Valores de potência e eficácia dos agonistas Acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*.

	Potência (pEC ₅₀)	Resposta máxima (%)
ACh	6,8 $\pm$ 0,13	107 $\pm$ 5,4
ACh + L-NAME (100 μ M)	7 $\pm$ 0,09	69,6 $\pm$ 2,6 *
SNP	7,4 $\pm$ 0,20	79 $\pm$ 4,5
SNP + ODQ (10 μ M)	5,9 $\pm$ 0,22 #	80,1 $\pm$ 9,2

10.4 Caracterização do relaxamento evocado por estímulo de campo elétrico em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*

Estímulo de campo elétrico promoveu relaxamento em tiras de corpos cavernosos de *P. guttatus* pré-contráídos com fenilefrina (**Figura 22**). Ambos os tratamentos com TTX (1 μ M) ou com o inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME; 100 μ M) não alteraram a resposta relaxante (n=3 para ambos os grupos).

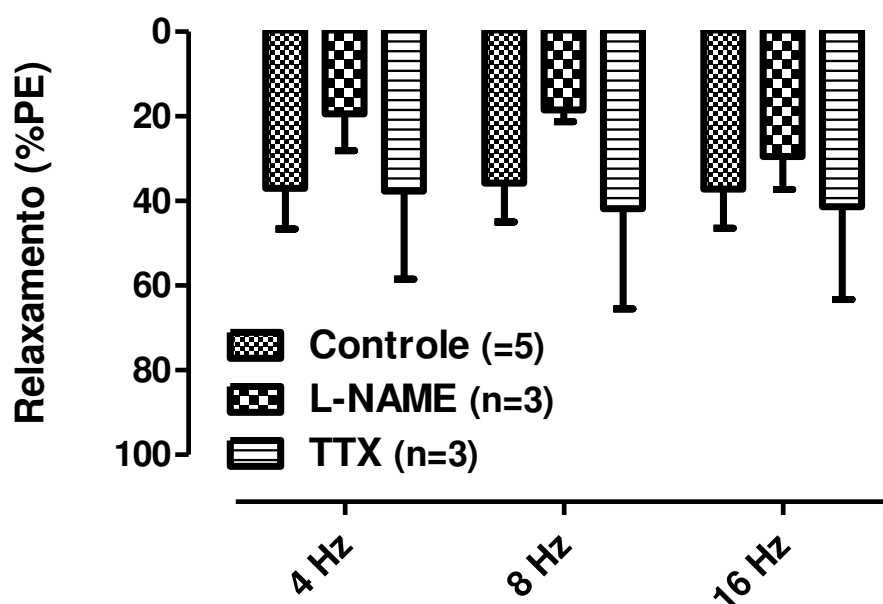


Figura 22: Estímulo de campo elétrico (EFS; 30 V; 0,1 ms; 4-16 Hz) em tiras de corpos cavernosos isolados de *P. guttatus* pré- contraídos por fenilefrina (3 μ M) na presença e ausência de tetrodotoxina (TTX; 1 μ M) e de L-NAME (100 μ M). O relaxamento está expresso como o percentual da contração obtida por fenilefrina e os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média.

11. DISCUSSÃO

Neste segundo capítulo identificamos a presença de um canal de sódio TTX-resistente em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*, bem como caracterizamos a via NO-GCs-GMPc neste tecido.

Identificar os mediadores envolvidos na contração evocada por estímulo de campo elétrico (EFS) é um importante passo no entendimento da fisiologia da ereção e da comparação de forma evolutiva deste processo. Em nosso estudo identificamos que estímulos de campo produziram contrações do tipo frequência-dependente e que esta resposta foi reduzida diante da incubação prévia de guanetidina (um agente simpatolítico) e de fentolamina (antagonista inespecífico alfa adrenérgico), sugerindo uma participação catecolaminérgica na manutenção do tônus cavernosal em Corn snakes. Em mamíferos, a noradrenalina constitui um dos principais agentes mantenedores do estado flácido do pênis ao promover a contração muscular ⁸². Na década de 80 diversos estudos foram realizados em voluntários sadios na tentativa de propor antagonistas adrenérgicos e simpatolíticos no tratamento da disfunção erétil ⁹⁸⁻⁹⁵. A eficácia destes agentes em induzir ereção reforça a participação e importância adrenérgica no controle do estado flácido. Diante destes achados podemos inferir que evolutivamente os mecanismos envolvidos na manutenção do tônus em corpos cavernosos de serpente foram conservados e mantidos em mamíferos.

Assim como observado em anéis de aortas de *P. guttatus* (capítulo 1 desta tese), os corpos cavernosos desta serpente também apresentam canais de sódio TTX-resistentes. Esta insensibilidade à TTX também foi observada em neurônios nitrérgicos de cascavel ⁴¹. Dados ainda não publicados do nosso grupo (**dados ainda não publicados**) sugerem que a contração induzida por EFS cascavéis também é resistente à TTX. As possíveis razões desta insensibilidade foram discutidas no capítulo anterior.

Diante deste resultado surge o questionamento de qual a participação e importância do íon sódio na resposta evocada por campo elétrico. A fim de

responder isto, substituímos de forma equimolar o NaCl presente na solução nutritiva por NMDG. Protocolos similares são comumente usados em ensaios eletrofisiológicos ⁹⁶⁻⁹⁹. O achado de que a contração induzida por EFS foi inalterada na presença de solução modificada, sugere uma resistência ao sódio na contração muscular. É importante ressaltar que ainda permanecem 25 mM de sódio presente na solução oriundo do bicarbonato de sódio, entretanto em dados ainda não publicados (**dados ainda não publicados**) do nosso grupo demonstram que a remoção total NaCl por NMDG reduziu em 60% preparações de corpos cavernosos de coelhos. A resistência ao sódio em preparações de corpo cavernoso de *P. guttatus* sugere que ou o estímulo “neuronal” é desencadeado unicamente por cálcio ou esta mínima concentração de sódio presente no bicarbonato de sódio é suficiente para desencadear o potencial de ação. Fenômeno semelhante foi encontrado em corpos cavernosos isolados de cascavel (**dados ainda não publicados**). Embora seja observada resistência ao íon sódio em cascavel, o canal de sódio dependente de voltagem está presente, visto que a adição de anestésicos locais (ropivacaína e bupivacaína) reduziu a resposta contrátil evocada por EFS.

O óxido nítrico corresponde ao principal mediador endógeno envolvido no relaxamento do corpo cavernoso, e consequentemente na ereção peniana ⁸⁴⁻⁸⁶. A fim de investigar a presença da via NO-GCs-GMPc em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*, buscou-se construir uma curva concentração–resposta a acetilcolina. Acetilcolina foi capaz de induzir relaxamento em tecido isolado, entretanto o tratamento com L-NAME não reduziu resposta completamente conforme observado em corpo cavernoso de cascavel, sugerindo a existência de mecanismo de ação independente da via do NO. Estudo realizado em anéis de aorta isolado de rato demonstrou que o tratamento com indometacina (inibidor inespecífico de ciclooxigenase) é capaz de deslocar para direita e reduzir a resposta máxima da curva à ACh ¹⁰⁰. Em virtude de prostanóides relaxantes serem eficazes em relaxar corpos cavernosos de mamíferos, é possível que eles estejam envolvidos na resposta induzida pela ACh.

A guanilato ciclase solúvel constitui o receptor endógeno do NO ⁴. Esta enzima converte GTP em GMPc, um importante segundo mensageiro envolvido na função erétil. A fim de averiguar aspectos funcionais da sGC, realizamos curvas concentrações respostas a um conhecido doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP). SNP promoveu relaxamento concentração dependente via ativação de SGc com potência superior a observada em CC de cascavel ou de humano ^{41,101}. Diante disso, inferimos que uma importante via de sinalização presente em corpos cavernosos humanos também está presente em *Pantherophis* CC.

Embora seja observado um relaxamento evocado por estímulo de campo elétrico (EFS) com resposta frequência-dependente, este não foi abolido após a adição de L-NAME (100 μ M), sugerindo o não envolvimento nitrérgico neste fenômeno. Em mamíferos e em serpentes (cascavel) foi demonstrado que o relaxamento induzido por EFS é de origem nitrérgica. Uma possível explicação para este evento em *Pantherophis* CC seria a não presença de óxido nítrico de origem neuronal. Provavelmente a origem do óxido nítrico capaz de ativar a sGC seja em grande parte oriunda do endotélio (eNOS). Sabe-se que o aumento do fluxo sanguíneo (shear stress) ao corpo cavernoso é capaz de estimular a eNOS, produzindo NO, relaxando vasos e corpos cavernosos e aumentando ainda mais o fluxo sanguíneo. A ativação de ambas NOS (eNOS e nNOS) participam ativamente tanto no início como na manutenção da ereção peniana em mamíferos ¹⁰².

A adição prévia de agente simpatolítico (guanetidina) e de antagonista muscarínico (atropina) excluiu a participação adrenérgica e colinérgica no relaxamento evocado por EFS. Em virtude deste relaxamento não ser de origem nitrérgica, é provável que este seja induzido por outras fibras NANCs tais como VIP ou CGRP. O achado de que o relaxamento induzido por EFS é tetrodotoxina-resistente não invalida o raciocínio de que o fenômeno seja de origem “neuronal”/ ou mediado por neurotransmissor, visto que em corpos cavernosos de cascavel também se observou fenômeno de resistência à tetrodotoxina, e foi demonstrada origem nitrérgica. Resposta similar aconteceu na contração evocada por EFS em *P Pantherophis* CC no qual também é TTX resistente e é de origem adrenérgica, conforme demonstrada acima.

12. Conclusão parte II

- A contração evocada por estímulo de campo elétrico em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus* é mediada por liberação de catecolamina.
- A contração induzida por estímulo de campo elétrica em em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus* é insensível à presença do íon sódio e apresenta canais de sódio TTX-resistente.
- Assim como observado em mamíferos, a via de sinalização NO-GCs-GMPc está funcionalmente presente em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*.
- Diferente do observado em mamíferos e em cascavel, o óxido nítrico não está envolvido no relaxamento induzido por estímulo de campo elétrico em corpos cavernosos isolados de *P. guttatus*, sugerindo o envolvimento de outras fibras não adrenérgicas não-colinérgicas neste fenômeno.

13. Referências

1. **Page RDM.** Extracting species trees from complex gene trees: reconciled trees and vertebrate phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 14, 89–106, 2000.
2. **Hicks JW.** Cardiac shunting in reptiles: mechanism, regulation, and physiological functions. In: Gans C, Gaunt, AS (Eds.), *Biology of Reptilia, Morphology*, vol. 19. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, NY, pp. 425–483, 1998.
3. <http://www.zina-studio.com/p447740290/h27D351C8#h27d351c8>
4. **Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F** Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 3203–3207, 1977.
5. **Furchgott, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376, 1980.
6. **Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 524-526, 1987.
7. **Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J.** Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation causes relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 843- 850, 1990.
8. **Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH.** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 768-770, 1990.
9. **Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 664-666, 1988.

10. **Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM.** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157(:87-94, 1988.
11. **Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC.** Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 377:239–242, 1995.
12. **Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK** Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase *Proc Natl Acad Sci USA*, 91; 7583-7587, 1991.
- 13 **Twort CH van Breemen C.** Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ Res.* 62: 961-964, 1988.
- 14 **Ishikawa JR Hume and KD Keef** Regulation of Ca^{2+} channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 73;1128-1137, 1993.
15. **Matthew R. L, Lin Li Toshio K** Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.* 21; 5063-5068, 1997.
16. **Donald JA, Broughton BRS.** Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves *Comp Biochemi Physiol, A* 142;188–197, 2005.
17. **Hasegawa K, Nishimura H.** Humoral factor mediates acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation of chicken aorta. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84; 164–169, 1991.
18. **Knight, GE Burnstock G.** The involvement of the endothelium in the relaxation of the leopard frog (*Rana pipiens*) aorta in response to acetylcholine. *Br. J. Pharmacol.* 118; 1518–1522, 1996.
19. **Knight GE, Burnstock G.** Acetylcholine induces relaxation via the release of nitric oxide from endothelial cells of the garter snake (*Thamnophis sirtalis*

parietalis) aorta. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol.* 106; 383–388, 1993.

20. Donald JA, Forgan LG, Melissa S. Cameron The evolution of nitric oxide signalling in vertebrate blood vessels *Comp. Physiol. B.* 185;153–171, (2015).

21. Galli GL, Skovgaard N, Abe AS, Taylor EW, Wang T. The role of nitric oxide in the regulation of the systemic and pulmonary vasculature of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. 201-208, 2005.

22. Broughton BR, Donald JA. Dual mechanisms for nitric oxide control of large arteries in the estuarine crocodile *Crocodylus porosus*. *J Exp Biol.* 210;129-137, 2007.

23. Monica FZ, Rojas-Moscoso, Porto M, Schenka AA, Antunes E, Cogo JC, DeNucci G. Immunohistochemical and functional characterization of nitric oxide signaling pathway in isolated aorta from *Crotalus durissus terrificus*. *Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 155:433-439, 2012.

24. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane *J. Physiol.* 239; 393–434, 1952.

25. Keynes RD, Rojas E. Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J Physiol*, 239; 393-434, 1974.

26. Armstrong CM. Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* 61; 644-683, 1981.

27. Catterall WA. Ion channel voltage sensors: structure, function and pathophysiology. *Neuron Review.* 67; 915- 928, 2010.

28. Catterall WA. 1984. The molecular basis of neuronal excitability. *Science*, 223, 653-661, 1984.

29. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 26, 13–25, 2000a.

- 30. Catterall WA, Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T.** Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49, 124-141, 2007.
- 31. Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA.** Overview of molecular relationship in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews*. 57; 387-395, 2005.
- 32. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Berwald Netter Y.** Nomenclature of voltagegated sodium channels. *Neuron*. 28; 365–368, 2000.
- 33 Fozzard HA, Hanck DA.** Structure and function of voltage-dependent sodium hannel: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol Rev*. 76; 887-926, 1996.
- 34. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG.** International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological. Reviews*. 397-409, .2005.
- 35. Gold MS.** Tetrodotoxin-resistant Na¹ currents and inflammatory .hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96; 7645-7649, 1999.
- 36. Priest BT, Murphy BA, Lindia JA, Diaz C, Abbadie C, Ritter AM, Liberator P, Iyer LM, Kash SF, Kohler MG, Kaczorowski GJ, MacIntyre DE, Martin WJ.** Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV 1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102; 9382-9387, 2005.
- 37. Kistner K, Zimmermann K, Ehnert C, Reeh PW, Leffler A.** The tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel Nav1.8 reduces the potency of local anesthetics in blocking C-fiber nociceptors. *Pflugers. Arch*. 459; 751-763, 2010.
- 38. Geffeney S, Brodie Jr ED, Ruben PC, Brodie ED.** Mechanisms of adaptation in a predator-prey arms race: ttx-resistant sodium channels. *Science*. 29; 1336-1339, 2002.

39. Huey RB, William J. Mood Snake Sodium Channels Resist TTX Arrest *Science*. 297; 2002.
40. Geffeney SL, Fujimoto E, Brodie ED, Brodie Jr ED, Ruben PC. Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator–prey interaction. *Nature*. 434; 759-763, 2005.
41. Capel RO, Mónica FZ, Porto M, Barillas S, Muscará MN, Teixeira SA, Arruda AM, Pissinatti L, Pissinatti A, Schenka AA, Antunes E, Nahoum C, Cogo JC, de Oliveira MA, De Nucci G (2011). Role of a novel tetrodotoxin-resistant sodium channel in the nitrenergic relaxation of corpus cavernosum from the south american rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *J. Sex. Med.* 8; 1616-1625, 2011.
42. Sladky KK, Mans C. Clinical anesthesia in reptiles *J. Exotic. Pet. Med.* 21; 17–31, 2012.
43. West G, Heard D, Caulkett N. Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia. Blackwell, 2014.
44. Tesfamariam B, Weisbrod RM, Cohen RA. Endothelium inhibits responses of rabbit carotid artery to adrenergic nerve stimulation. *Am J Physiol.* 253; 792-928, 1987.
45. Yoshida S, Matsuda Y, Samejima A. Tetrodotoxin-resistant sodium and calcium components of action potentials in dorsal root ganglion cells of the adult mouse. *J. Neurophysiol.* 41; 1096-1106, 1978.
46. Bossu JL, Feltz A. Patch-clamp study of the tetrodotoxin-resistant sodium current in group C sensory neurones. *Neurosci Lett.* 51; 241-246, 1984.
47. Kallen RG1, Sheng ZH, Yang J, Chen LQ, Rogart RB, Barchi RL. Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron*. 4; 233-242, 1990.

- 48. Rogart RB, Cribbs LL, Muglia LK, Kephart DD, Kaiser MW.** Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86; 8170-8174, 1989.
- 49. Roy ML, Narahashi T.** Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons *J. Neurosci.* 72; 2104-2111, 1992.
- 50. Olson, KR, Villa J.** Evidence against nonprostanoid endothelium-derived relaxing factor(s) in trout vessels. *Am. J. Physiol-Regul. Integ. Comp. Physi.* 260; 925-933, 1991.
- 51. Miller VM, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent responses in isolated blood vessels of lower vertebrates. *Blood Vessels.* 23; 225-235, 1986.
- 52. Luscher TF and Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 8; 344-348, 1986
- 53. Korenga R, Ando J, Tsuboi H, Yang WD, Sakuna I Toyooka T.** Laminar flow stimulates ATP- and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198; 213-219, 1994.
- 54. Mathie R.T, Ralevic V, Alexander B, Burnstock G.** Nitric oxide is the mediator of ATP-induced dilatation of the rabbit hepatic arterial vascular bed. *Br.J. Pharmacol.* 103; 1602-1606, 1991.
- 55. Knight GE, Burnstock G** Responses of the aorta of the garter snake parietalis to purines (*Thamnophis sirtalis*) *Br. J. Pharmacol.* 114; 41-48, 1995.
- 56. Li H, Burkhardt C, Heinrich UR, Brausch I, Xia N, Förstermann U.** Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. *Circulation.* 107; 2348-2354, 2003.

57. **Rapoport RM, Murad F.** Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.* 52; 352-357, 1983.
58. **Van de voorde J, Leusen I.** Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. *Eur. J. Pharmacol.* 87; 113-120, 1983.
59. **Crossleyll DA , Sartori MR , Abe AS, Taylor EW.** A role for histamine in cardiovascular regulation in late stage embryos of the red-footed tortoise, *Chelonoidis carbonaria* Spix, 1824 *J. Comp. Physiol. B.* 183; 811–820, 2013.
60. **Kishi F, Nakaya Y, Ito S.** Histamine H₂-receptor-mediated nitric oxide release from porcine endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 32; 177-182, 1998.
61. **Bockman CS, Zeng W.** Histamine receptor type coupled to nitric oxide-induced relaxation of guinea-pig nasal mucosa. *Auton. Autacoid. Pharmacol.*;22; 269-276, 2002.
62. **Rotella DP.** Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. *Nat. Rev. Drug. Disc.* 1; 674-682, 2002.
63. **Landmesser U, Dikalov S, Russ Price S, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG** Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* 111; 1201-1209,2003.
64. **Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM.** Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 105; 1656-1662, 2002.
65. **Koglin M, Stasch JP, Behrends S.** BAY 41-2272 Activates Two Isoforms of Nitric Oxide- Sensitive Guanylyl Cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 292; 1057–1062, 2002.

66. Baracat JS, Teixeira CE, Okuyama CE, Priviero FBM, Faro R, Antunes E, De Nucci G. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur. J. Pharmacol.* 477; 2003, 163–169, 2003.

67. Priviero FBM, Baracat js, Teixeira CE, Claudino MA, de Nucci G, Antunes E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by bay 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin. Exp. pharmacol physiol.* 32; 728–734, 2005.

68. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HHHW, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 5; 755–768, 2006.

CORPO CAVERNOSO

69. Kelly DA. The functional morphology of penile erection: tissue designs for increasing and maintaining stiffness. *Integr Comp Biol.* 42; 216–221, 2002.

70. King AS. Phallus. In: King AS, McLelland J, Eds. *Form and function in birds* Vol 2. London: Academic Press. pp 107–147, 1981.

71. Jones F. The Chelonian type of genitalia. *J. Anato. Physiol.* 49; 393–406, 1915.

72. Radwan D, Kamel E. A histological and immunohistochemical study on human penile cavernosal tissue with viewpoints of venogenic erectile dysfunction. *Egypt. J. Histol.* 34; 93–102, 2011.

73. Goldstein M, Padma-Nathan. The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton. *J. Urol.* 144; 61–77, 1990.

74. Karim S. Macroscopic and Microscopic Anatomy of the Hemipenes of the Snake. *Env Arid Land Agric Sci.* 10; 25–37, 1998.

75. Dowling HG, Savage JM. A guide to the snakes hemipenis – a survey of basic structure and systematic characteristics. *Zoologica.* 45; 17–31, 1960.

76. **Porto M, de Oliveira MA, Pissinatti L, Rodrigues RL1, Rojas-Moscoso JA, CogoJC, Metze K, AntunesE, Nahoum C, Monica FZ, De Nucci G.** The Evolutionary Implications of Hemipenial Morphology of Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Laurent, 1768) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) *PLOS ONE*. 26; e66903, 2013.
77. **Brenot, PH.** *Male Impotence: a historical perspective. Le spirit du temp*, Paris, 1994
78. **Andersson, KE.** Pharmacology of penile erection. *Pharmacol. Rev.* 53, 417-450, 2001.
79. **GROAT, WC. STEERS, WD.** Neuroanatomy and neurophysiology of penile erection. *Contemp. Manag. Impot. Infertility*.1; 3-27, 1988.
80. **TRAISH, AM, KIM, NN, GOLDSTEIN, I, MORELAND, RB.** Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. *J. Androl*.20;671-682, 1999.
81. **ANDERSSON, KE, WAGNER, G.** Physiology of penile erection. *Physiol. Rev.* 75; 191–236, 1995.
82. **BURNETT, AL, LIMING, JIN.** RhoA/Rho-Kinase in erectile tissue: mechanisms of disease and therapeutic insights. *Clinic. Sci.* 110; 153-165, 2006.
83. **SOMLYO, AP, SOMLYO, AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 372; 231-236, 1994.
84. **IGNARRO, LJ, BUSH PA, BUGA, GM, WOOD, KS. FUKUTO, JM, RAJFER, J.** Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,170; 843-850, 1990.
85. **BURNETT, AL, LOWENSTEIN, CJ, BREDT, DS, Chang, TS, Snyder, SH,** Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 257; 401-403, 1992.

86. **ESCRIG, A, GONZALEZ-MORA, JL, MAS, M.** Nitric oxide release in penile corpora cavernosa in a rat model of erection. *J. Physiol.* 516; 261-269, 1999.
87. **BURNETT, AL.** Nitric Oxide regulation of penile erection: Biology and therapeutic implications. *J.Androl.* 23; 20-26, 2002.
88. **OKAMURA, T, AYAJIKI, K, TODA, N.** Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by no and other relaxing factor derived from nerves. *Am. J. Physiol.*274; 1075-1081, 1998.
89. **Katsuki S, Arnold WP, Murad F.** Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J. Cyclic. Nucleotide. Res.*3; 239-47, 1977.
90. **COHEN, G, KIM, M, OGWU, V. A.** Modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J. Neurosci. Method.* 67; 53-56, 1996.
91. **Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT, Burnett, A.L.** Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int. J. Impot. Res.* 16;15-19, 2004.
92. **Garg UC, Hassid A.** Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 83; 1774-7, 1989.
93. **Etter EF, Eto M, Wardle RL, Brautigan DL, Murphy RA.** Activation of myosin light chain phosphatase in intact arterial smooth muscle during nitric oxide-induced relaxation. *J. Biol. Chem.* 276; 34681-34685, 2001.
94. **Christ, G.J, Lue,T.** Physiology and Biochemistry of erections. *Endocrine.* 23; 93–100, 2004.
95. **Brindley GS** .Cavernosal alpha-blockade: a new technique for investigating and treating erectile impotence. *Br. J. Psychiatry.* 143; 332-337, 1983

- 100. Spindler AJ, Noble SJ, Noble D, LeGuennec JY.** The effects of sodium substitution on currents determining the resting potential in guinea-pig ventricular cells. *Exp. Physiol.* 83;121-136, 1998
- 101. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG.** Neurobiology Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance (uptake/chloride ion/PDZ domain). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94, 4155-4160, 1997.
- 102. Kekuda R, Prasad PD, Fei, YJ Torres-Zamorano V, Srish Sinha S, Yang-Feng TL, Leibach FH, Ganapathy V.** Cloning of the Sodium-dependent, Broad-scope, Neutral Amino Acid Transporter Bo from a Human Placental Choriocarcinoma Cell Line. *J Biolog. Chemi.* 271; 18657-18661, 1996
- 103. Denoyer D Perek N Delphine LJ Dubois FF** Evidence that 99mTc-(V)-DMSA uptake is mediated by NaPi cotransporter type III in tumour cell lines *Europ. J. Nucl. Medic. Molec Imag.* 31; 77–84, 2004.
- 104. Vizioli EO, Spadin MD, Corrêa FM, Viaro F, Evora PR, Chies AB.** Acetylcholine-induced aortic relaxation studied in salbutamol treated rats. *J. Smooth. Muscle. Res.*41; 271-81, 2005.
- 105. Leitão Junior AS, Campos RM, Cerqueira JB, Fonteles MC, Santos CF, de Nucci G, Sousa EH, Lopes LG, Gonzaga-Silva LF, Nascimento NR.** Relaxant effect of a metal-based drug in human corpora cavernosa and its mechanism of action. *Int J Impot Res.* 28;28:20-24, 2016.
- 106. Hurt KJ, Sezen SF, Lagoda GF, Musicki B,.Rameau GA Snyder SH, and Burnett AL.** Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109; 16624-16629, 2012.

14. ANEXO



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação ex vivo do trato urogenital, gastrointestinal e vascular de Chelonoidis carbonaria", protocolo nº 3907-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto de Nucci / Rafael de Moraes Campos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 10 de agosto de 2015.

Vigência do projeto: 10/2015-01/2017

Espécie/Linhagem: Chelonoidis carbonaria (Jabutí)

No. de animais: 20

Peso/Idade: 30 anos / 03kg

Sexo: 10 machos / 10 fêmeas

Origem: Parque Ecológico do Tietê

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 10 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da função erétil, vascular, e gastrointestinal de *Elaphe guttata*", protocolo nº 3949-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto de Nucci / Rafael de Moraes Campos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 06 de julho de 2015.

Vigência do projeto: 08/2015-02/2017

Espécie/Linhagem: *Elaphe guttata* (cobra do milho)

No. de animais: 13

Peso/Idade: 02 anos / 250g

Sexo: machos

Origem: UNIVAP

Espécie/Linhagem: *Elaphe guttata* (cobra do milho)

No. de animais: 09

Peso/Idade: 02 anos / 250g

Sexo: fêmeas

Origem: UNIVAP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 06 de julho de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva