



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ERIC XAVIER DOS SANTOS

A LIBERAÇÃO DE 6-NITRODOPAMINA MODULA A REATIVIDADE VASCULAR  
DOS ANÉIS AÓRTICOS DE *PANTHEROPHIS GUTTATUS*

RELEASE OF 6-NITRODOPAMINE MODULATES VASCULAR REACTIVITY OF  
*PANTHEROPHIS GUTTATUS* AORTIC RINGS

CAMPINAS

2023

ERIC XAVIER DOS SANTOS

A LIBERAÇÃO DE 6-NITRODOPAMINA MODULA A REATIVIDADE VASCULAR  
DOS ANÉIS AÓRTICOS DE *PANTHEROPHIS GUTTATUS*

RELEASE OF 6-NITRODOPAMINE MODULATES VASCULAR REACTIVITY OF  
PANTHEROPHIS GUTTATUS AORTIC RINGS

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

ORIENTADOR: PROFESSOR DR. GILBERTO DE NUCCI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO  
ALUNO ERIC XAVIER DOS SANTOS, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. GILBERTO DENUCCI.

CAMPINAS

2023

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

Santos, Eric Xavier dos, 1988-  
Sa59L A liberação de 6-nitrodopamina modula a reatividade vascular dos anéis  
aórticos de *Pantherophis guttatus* / Eric Xavier dos Santos. – Campinas, SP :  
[s.n.], 2023.

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

1. Dopamina. 2. Óxido nítrico. 3. L761. 4. ODQ. I. De Nucci, Gilberto,  
1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of  
*Pantherophis guttatus* aortic rings

**Palavras-chave em inglês:**

Dopamine  
Nitric oxide  
L761  
ODQ

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Gilberto De Nucci [Orientador]  
Fabio Husemann Menezes  
José Carlos Cogo

**Data de defesa:** 02-03-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9327-702x>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3332735762254923>

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE  
MESTRADO/DOUTORADO**

**NOME DO ALUNO – ERIC XAVIER DOS SANTOS**

**ORIENTADOR: GILBERTO DE NUCCI**

**MEMBROS TITULARES:**

- 1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI**
- 2. PROF. DR. JOSÉ CARLOS COGO**
- 3. PROF. DR. FABIO HUSSEMAN MENEZES**

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

**Data de Defesa: 02/03/2023**



## **DEDICATÓRIA**

**Dedico a presente dissertação de Mestrado *In memoriam* ao meu avô e grande amigo, Sr. Ivo Xavier dos Santos, que sempre me direccionou para o caminho honrado, ao estudo e ao progresso moral e intelectual.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus pela oportunidade de estar vivo; a Jesus Cristo, pelo seu amor e exemplo a ser seguido, por ter abençoado e tornado este trabalho concretizado. Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela orientação, pela confiança e apoio para realização deste trabalho e sonho de carreira acadêmica. Muito obrigado pela orientação! Agradeço a minha amiga e companheira, Maria Elena Sousa dos Santos, por ter me acompanhado e ter me direcionado sempre ao lado correto, e a sua filha, Karina Sousa Medeiros, que, além de amiga, é uma irmã para mim. Agradeço ao meu avô, Ivo Xavier dos Santos, pelo incentivo para nunca parar de estudar e se atualizar, além da educação para uma vida digna e honrada, a qual levarei para a vida: eterna gratidão. Agradeço, também, a minha amiga Julia Sthefany dos Santos Xavier, por entrar nesta jornada acadêmica comigo e pela ajuda a mim fornecida durante esta jornada, assim como para a vida. Agradeço aos meus amigos de laboratório, José Brito Junior e Antônio Tiago Lima, por compartilharem suas experiências acadêmicas e profissionais. E concluo agradecendo aos docentes do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pelos ensinamentos e direcionamento.

## EPÍGRAFE

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

## RESUMO

Santos Eric Xavier dos and De Nucci Gilberto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

A 6-nitrodopamina (6-ND) é uma nova catecolamina liberada em vasos de cordão umbilical humano e em anéis aórticos de *Chelonoidis carbonaria* (Jabuti). Sua produção e liberação podem ser inibidas por meio do tratamento dos vasos arteriais com inibidor da síntese do óxido nítrico (NO), o L-NAME, ou pela remoção mecânica do endotélio. A 6-nitrodopamina é um vasodilatador, atuando como antagonista seletivo de receptor D2-like dopaminérgico. O presente estudo identificou que a liberação de 6-ND ocorre de forma basal no endotélio intacto e no endotélio desnudado em anéis aórticos de *Pantherophis guttatus*. Esta liberação foi quantificada pelo método de espectrometria de massas LC-MS-MS. Este estudo identificou, ainda, a interação da 6-ND com outras catecolaminas, utilizando a técnica de banho de órgãos. Esta técnica consiste na suspensão vertical entre dois ganchos metálicos dos anéis aórticos em que a parte inferior do ganho é ligada à base e a outra parte é conectada a transdutores isométricos; o tecido fica submerso em 10ml de uma solução tampão de Krebs-Henselet. Os anéis aórticos foram avaliados de duas formas: uma delas com endotélio intacto e na outra foi retirado o endotélio de forma mecânica. Foi identificado que os anéis aórticos que tiveram o endotélio intacto apresentaram liberação basal da 6-ND, entretanto, após a incubação prévia de L-NAME (100  $\mu$ M), a liberação foi significativamente reduzida. Os anéis aórticos com endotélio foram pré-contraídos com endotelina (3nM) e, após, foram submetidos a uma curva dose resposta com: 6-ND (10pM-1 $\mu$ M) e com L-761,626 (10pM-1 $\mu$ M), conhecido como um antagonista dopaminérgico de receptor D2; as duas drogas induziram um relaxamento dependente da concentração administrada, foi evidenciado que, mesmo com a incubação de L-NAME, este relaxamento não foi alterado. Entretanto, quando foi removido o endotélio, observou-se uma redução significativa do relaxamento do anel aórtico. Foi identificado que a curva produzida pelo efeito da incubação de 6-ND (0.1-1  $\mu$ M) produziu um significativo desvio à direita nas curvas de concentração-resposta com dopamina em anéis aórticos com endotélio intacto, que foi pré-tratado com L-NAME (pA2 7.01); no

entanto, as contrações induzidas por noradrenalina e adrenalina não foram afetadas pela pré-incubação com 6-ND (1  $\mu$ M). O estudo também induziu, por estímulos de campo elétrico (EFS), a contração dos anéis aórticos. Identificamos que as contrações induzidas pelo EFS dos anéis aórticos pré-tratados de L-NAME foram, significativamente, inibidas pela incubação com 6-ND (1  $\mu$ M). O resultado do presente estudo identificou que o endotélio dos anéis aórticos de *Pantherophis guttatus* libera a 6-ND; esse achado representa um novo mecanismo pelo qual o NO pode modular a reatividade vascular independentemente da produção de cGMP.

Palavras Chave: DOPAMINA; ÓXIDO NÍTRICO; L-761; ODQ

## ABSTRACT

Santos Eric Xavier dos and De Nucci Gilberto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

6-Nitrodopamine (6-ND) is a novel catecholamine that is released from human umbilical cord vessels and *Chelonoidis carbonaria* aortic rings. The synthesis/release of 6-ND is inhibited by either pre-incubation of the vessels with the nitric oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME or by mechanical removal of the endothelium. 6-ND causes powerful vasorelaxation, acting as a potent and selective dopamine D<sub>2</sub>-like receptor antagonist. Basal release of 6-ND from *Pantherophis guttatus* endothelium intact and denuded aortic rings was quantified by LC-MS/MS. In order to evaluate the interaction of 6-ND with other catecholamines, aortic rings were suspended vertically between two metal hooks in 10-mL organ baths containing Krebs-Henseleit's solution and attached to isometric transducers. Endothelium intact aortic rings presented basal release of 6-ND, which was significantly reduced by previous incubation with L-NAME (100  $\mu$ M). In endothelin-1 (3 nM) pre-contracted endothelium intact aortic rings, 6-ND (10 pM–1  $\mu$ M) and the dopamine D<sub>2</sub>-receptor antagonist L-761,626 (10 pM–1  $\mu$ M) induced concentration-dependent relaxations, which were not affected by incubation with L-NAME but greatly reduced in endothelium-removed aortic rings. 6-ND (0.1–1  $\mu$ M) produced significant rightward shifts of the concentration-response curves to dopamine in L-NAME pre-treated endothelium-intact (pA<sub>2</sub> 7.01) rings. Contractions induced by noradrenaline and adrenaline were not affected by pre-incubation with 6-ND (1  $\mu$ M). The EFS-induced contractions of L-NAME pre-treated endothelium-intact aortic rings were significantly inhibited by incubation with 6-ND (1  $\mu$ M). The results indicate that 6-ND released from *Pantherophis guttatus* aortic rings is coupled to NO release and represents a new mechanism by which NO can modulate vascular reactivity independently of cGMP production.

## Sumário

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                           | 13 |
| 1.1 Revisão geral das catecolaminas .....                                                                     | 13 |
| 1.1.2 Biossíntese de catecolaminas .....                                                                      | 13 |
| 1.1.3. Metabolismo e estoque de catecolaminas.....                                                            | 14 |
| 1.1.4 Vias alternativas de síntese de catecolaminas .....                                                     | 15 |
| 1.2 Dopamina .....                                                                                            | 16 |
| 1.3 A 6- Nitrodopamina .....                                                                                  | 18 |
| 1.4 Endotélio .....                                                                                           | 19 |
| 1.5 Óxido nítrico e a regulação do tônus vascular.....                                                        | 20 |
| 1.5.1 Óxido nítrico em não mamíferos.....                                                                     | 20 |
| 1.6 Circulação sanguínea .....                                                                                | 21 |
| 1.7 Circulação sanguínea de serpentes .....                                                                   | 21 |
| 1.8 Justificativa e relevância .....                                                                          | 22 |
| 2.OBJETIVOS .....                                                                                             | 24 |
| 2.1 Objetivo Geral.....                                                                                       | 24 |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                                                               | 24 |
| 3. MATERIAL E MÉTODO .....                                                                                    | 25 |
| 3.1 Isolamento do tecido.....                                                                                 | 25 |
| 3.2 Determinação das concentrações de catecolamina no KHS por espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS) ..... | 25 |
| 3.3 Preparações do anel aórtico e gravações de tensão isométrica .....                                        | 27 |
| 3.4 Curvas de concentração-resposta à dopamina, noradrenalina e adrenalina                                    | 27 |
| 3.5 Contrações de aorta induzidas por estimulação de campo elétrico (EFS)                                     | 27 |
| 3.6 Efeito de 6-ND em anéis aórticos pré-contraídos .....                                                     | 28 |
| 3.7 Imuno-histoquímica para proteína S-100 e Calretinina .....                                                | 28 |
| 3.8 Drogas e Soluções .....                                                                                   | 29 |
| 3.9 Análise de dados .....                                                                                    | 30 |
| 4. RESULTADOS .....                                                                                           | 31 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                                                            | 41 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                                                                             | 44 |
| 7. REFERÊNCIAS.....                                                                                           | 45 |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 8. ANEXOS .....                  | 50 |
| 8.1 APROVAÇÃO DO CEUA.....       | 50 |
| 8.2 AUTORIZAÇÃO DA REVISTA ..... | 54 |



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Revisão geral das catecolaminas

As catecolaminas apresentam funções de neurotransmissores e funções hormonais. Estas substâncias estão no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico. Possuem várias funções, as quais dependem dos receptores disponíveis nos órgãos alvo<sup>1</sup>. São conhecidas como as responsáveis pelos mecanismos de “fugir ou lutar”; elas podem ativar os processos fisiológicos e comportamentais, facilitando, assim, a superação ao estresse e, também, de sobrevivência<sup>2</sup>, mas as catecolaminas exercem, também, a regulação das atividades orgânicas (como hormônios e neurotransmissores) em situações que não são de perigo iminente descritas, também, como “luta ou fuga”. As principais catecolaminas são: dopamina (DA), noradrenalina (NOR)/Norepinefrina e Noradrenalina/Norepinefrina<sup>1,2</sup>.

#### 1.1.2 Biossíntese de catecolaminas

As três catecolaminas, anteriormente descritas, são moléculas ativas que atuam como hormônios e/ou neurotransmissores fundamentais para homeostase orgânica do sistema nervoso (SN). São compostas quimicamente pela união de um Catecol (anel benzênico e duas hidroxilas) e uma amina (NH<sub>2</sub>)<sup>2 3</sup>. Sua biossíntese é regulada pelos níveis plasmáticos de Tirosina, que é hidroxilada pela Tirosina Hidroxilase, obtendo, assim, a L-DOPA<sup>4</sup>. Após esse processo, a dopa descarboxilase (DDC), associada à vitamina B6, age na dopa formando a dopamina. A dopamina é liberada na corrente sanguínea e/ou pode ser armazenada nas vesículas sinápticas<sup>4</sup>. Quando armazenadas nas vesículas sinápticas, a DOPA pode ser hidroxilada em noradrenalina (NOR). Estes processos de biossíntese de catecolaminas ocorrem, principalmente, em nervos adrenérgicos ou medula adrenal <sup>1,5</sup>.

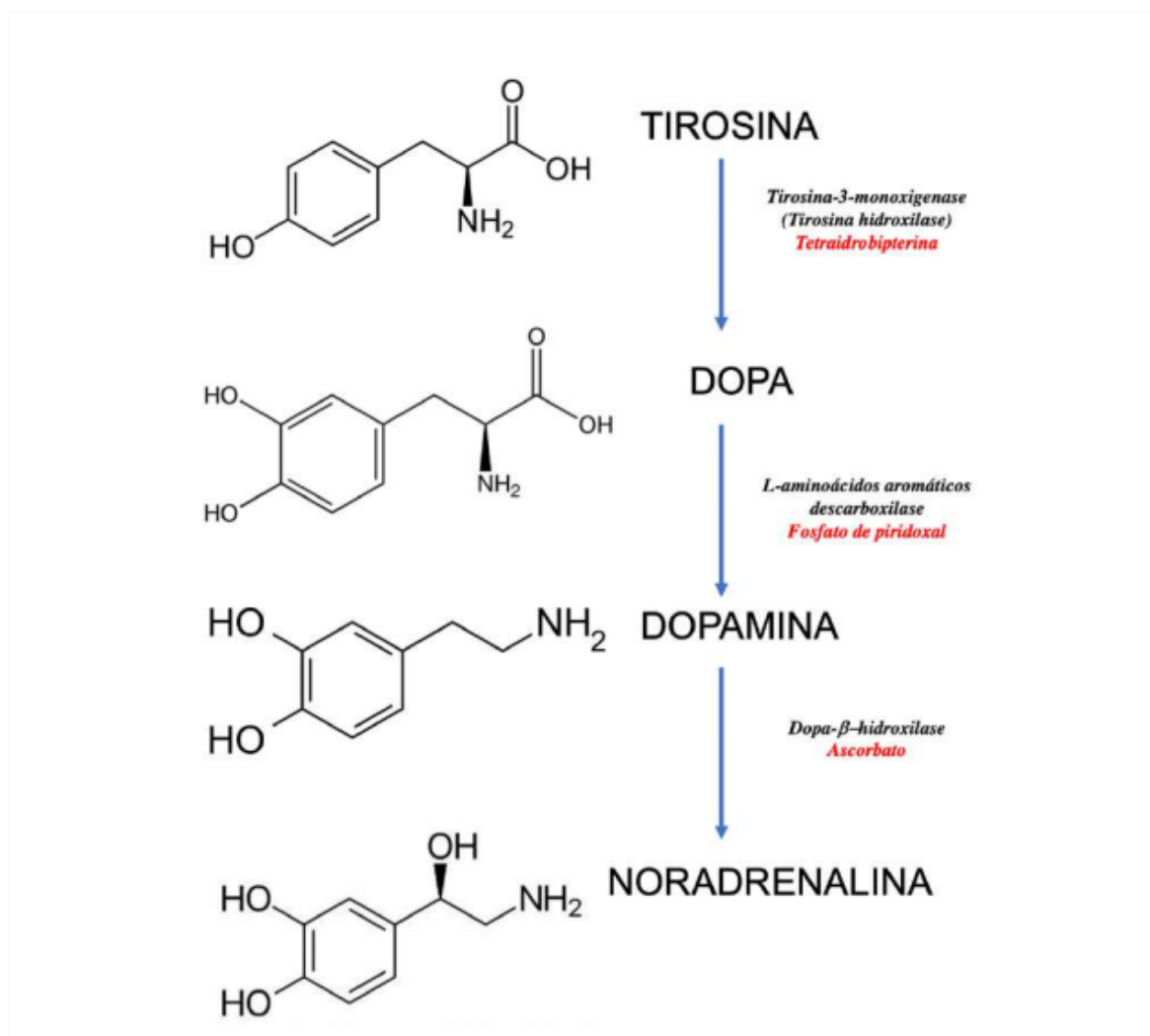


Figura 1. Representação da Síntese de Catecolaminas

### 1.1.3. Metabolismo e estoque de catecolaminas

O neurônio gera e propaga o potencial de ação por meio do seu axônio; após esse processo, a transmissão deste sinal se dá por meio de uma sinapse que libera neurotransmissores, disparando um impulso e/ou uma reação em outro neurônio. Os neurotransmissores permitem que um neurônio se comunique com o outro através de uma ligante ao receptor do outro neurônio<sup>3</sup>. Os neurônios que liberam os neurotransmissores são denominados pré-sinápticos, já os que recebem os neurotransmissores são chamados de neurônios pós-sinápticos<sup>4</sup>.

A neurotransmissão mediada pela noradrenalina ocorre quando há uma despolarização do neurônio simpático pós-ganglionar. O processo inicia-se por meio da abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem neuronal, resultando, assim, um potencial de ação que são conduzidos ao longo do axônio. Quando a despolarização

atinge o terminal nervoso, ocorre uma abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e, conseqüentemente, a entrada do cálcio para o interior da célula completando o ciclo na função das vesículas com a membrana plasmática pré-sináptica e liberação de Noradrenalina<sup>3</sup>. Essas são estocadas nas vesículas simpáticas, quando liberadas na fenda sináptica. Dentro da fenda sináptica, a noradrenalina se liga aos seus respectivos receptores. Na membrana pré-sináptica na presença do transportador de noradrenalina responsável pela regulação dos níveis de noradrenalina dentro da fenda sináptica<sup>4</sup>. Este transportador atua como um transmissor dependente de sódio e cloreto, que permite a entrada dos neurotransmissores direcionando pela energia eletroquímica do gradiente intracelular de sódio. Dentro do citosol do neurônio, as catecolaminas podem também ser desintegradas e oxidadas pela Monoamina Oxidase ( MAO)<sup>4,5</sup>, a principal característica deste transporte é a sua dependência de sódio, usando como o gradiente Hidrogênio e Adenosina trifosfato <sup>4</sup>.

O estoque de catecolaminas pelas vesículas é, principalmente, controlado pelo gradiente de concentração desses neurotransmissores no citosol e força eletroquímica do meio externo para interno da vesícula<sup>6</sup>.

#### **1.1.4 Vias alternativas de síntese de catecolaminas**

Além da via anteriormente descrita, há a descrição na literatura da liberação de catecolaminas reportadas em outros tecidos. Em revisão da literatura, há vários estudos que relatam a síntese de Tirosina Hidroxilase, Dopamina  $\beta$ -hidroxilase e Feniletanolamina N-Metiltransferase no coração durante a embriogênese<sup>7,8,9,10</sup>. Em um estudo com ratos, foi encontrada a síntese de catecolamina de forma basal. Em um outro estudo realizado em adipócitos de artéria mesentérica de rato, foi descrita uma produção basal de noradrenalina e adrenalina<sup>11</sup>.

No sistema imunológico, as catecolaminas são descritas como importantes substâncias que desempenham funções primordiais na modulação de anticorpos e citocinas<sup>12</sup>. Há relatos que há produção de catecolaminas no sistema imunológico como síntese basal, dependendo do tipo celular. Em células T, há maior produção de dopamina, enquanto nas células B, há maior síntese e liberação de noradrenalina e adrenalina<sup>6</sup>.

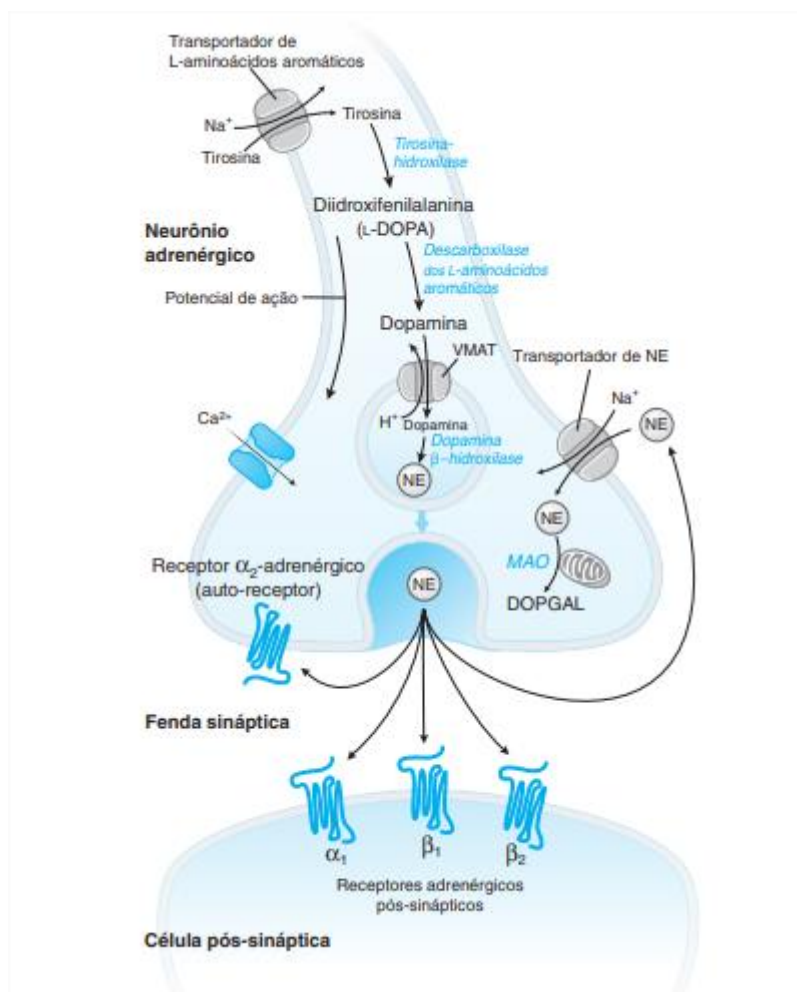


Figura 2. Biossíntese de catecolaminas por neurônios pós-ganglionares na vasculatura. VMAT=transportador de monoamina vesicular; DA= dopamina; NE= noradrenalina; COMT= Catecol O-Metiltransferase; MAO= monoamino oxidases.

## 1.2 Dopamina

A dopamina, é uma catecolamina endógena percursora na produção de noradrenalina. A sintetização da dopamina foi realizada pela primeira vez em 1910 pelo pesquisador e Químico Barger e pelo farmacologista Henry Dale<sup>13,14</sup>.

Esta catecolamina é considerada como uma das mais importantes mediadoras cardiovasculares, sendo caracterizada como um modulador e mediador vascular, sendo responsável pela manutenção da pressão arterial através do sistema dopaminérgico periférico. Esse efeito é descrito em um estudo realizado em 1944 pelos pesquisadores Holtz e Credner, os autores descreveram que a dopamina versus epirefrina e norepinefrina, produziu um efeito vasopressor em cobaias (coelhos estudados). Em 1963 experimentos realizados por McDonald et al utilizando

como amostra seres humanos voluntários saldáveis trouxe como resultado a diminuição da resistência vascular renal<sup>13,14</sup>.

Os receptores de dopamina são relatados em diversos órgãos e regiões do corpo tais como: vasos sanguíneos, néfron, sistema nervoso. Sua ação/efeito biológico são mediados através de cinco principais receptores dopamina : D1, D2, D3, D4 e D5 tendo sua classificação em duas principais famílias D1-like (D1 e D5) e D2-like (D2, D3 e D4) estes receptores estão acoplados à proteína G, com base na estimulação (Gs) e inibição (Gi) da adenilato ciclase<sup>13</sup>.

A dopamina desempenha uma importante função na Hipertensão arterial, este efeito foi evidenciado em 1973 pelos pesquisadores Toda e Goldberg , que estudaram as renais e as artérias mesentéricas isoladas de caninos, contraídas com cloreto de potássio (KCl; 10-30mM) no qual obteve como resultado um relaxamento vascular ocasionado pela infusão de concentrações 1-30  $\mu$ M. Os receptores que estimulam a adenilato ciclase, os receptores dopaminérgicos D1-like estão acoplados à proteína Gs, a qual estimula a adenilato ciclase<sup>12,13,14</sup>. A adenilato ciclase catalisa a conversão de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato (AMP) cíclico, o qual se liga à proteína quinase A (PKA) para desinibir/ativar as subunidades catalíticas. As primeira evidencias dos receptores de dopamina da família D1 foram catalogadas através da estimulação da adenilato ciclase pela dopamina, levando ao acúmulo de AMP cíclico na retina de rato . Os inibidores dos receptores de adenilato ciclase, são os receptores dopaminérgicos D2-like os quais são mediados pela ativação das proteínas G heterotriméricas G i/o, inativando/reduzindo a adenilato ciclase<sup>12,14</sup>. Os receptores da família D2-like são responsáveis pela inibição da adenilato ciclase no qual age em oposição aos receptores da família D1-like, diminuindo a fosforilação de substratos de PKA. A primeira via de sinalização identificada para receptores do tipo D2 foi a inibição de acumulação de AMP cíclico em adenomas hipofisários secretores de prolactina humana<sup>13,14</sup>. A dopamina também é um neurotransmissor bem conhecidos no sistema nervoso central, além de um modulador importante da pressão arterial, do equilíbrio de sódio, das funções renal e adrenal, sendo assim relevante para a Hipertensão arterial e ou para a continuidade da hipertensão<sup>14</sup>.

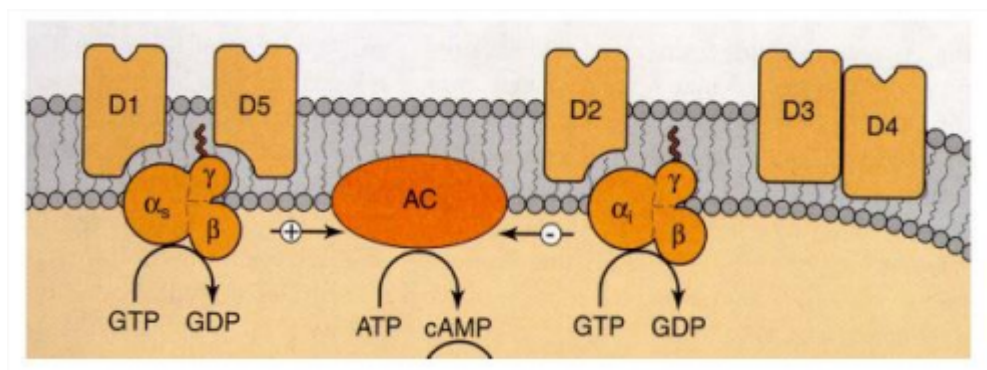


Figura 3. Modulação da adenilato ciclase (AC) mediada por receptores dopaminérgicos. (GDP: guanosina difosfato, GTP: guanosina trifosfato)

### 1.3 A 6- Nitrodopamina

A 6-nitrodopamina (6-ND) é uma catecolamina derivada a partir da nitração da Dopamina, sua função vem sendo estudada, mas até onde conhecemos a mesma atua no organismo de diversas espécies como um mediador endógeno do Sistema Cardiovascular. A 6 ND demonstrou ter atividades biológicas de inibição da captação neuronal de norepinefrina, atividade da sintase do óxido nítrico e capacidade contrátil nos adrenoreceptores vasculares<sup>14,15</sup>. Esta catecolamina, foi recentemente identificada a partir de tecidos vasculares, como vasos umbilicais humanos , e sua liberação provou ser substancialmente reduzida quando o endotélio foi removido mecanicamente desses vasos, acreditasse que o endotélio tem a relação entre síntese ou liberação de 6 ND, quando ela age como agente inotrópico positivo pode ser considerada cem vezes mais potente que a dopamina, noradrenalina, e adrenalina<sup>14,15</sup>. A liberação basal de 6-ND foi detectada em anéis aórticos de *Chelonoidis carbonarius* , bem como em ratos e vasos humanos Deferentes , cordão umbilical humano<sup>16</sup>.

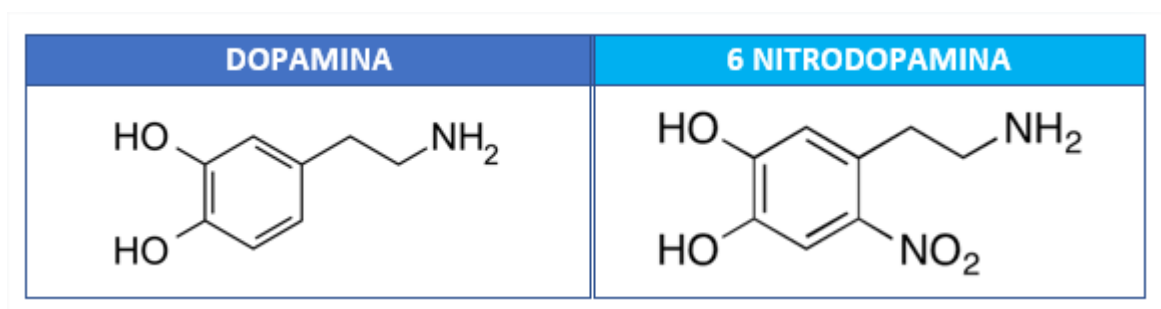


FIGURA 3. Comparação da molécula de dopamina vs molécula de 6 Nitrodopamina

## 1.4 Endotélio

Durante anos, o endotélio foi conhecido como uma barreira entre a corrente sanguínea e a musculatura lisa vascular. Somente nos anos 80, estudos realizados com artéria de coelho indicaram que o endotélio teria um papel importante na vasodilatação<sup>13,14,15</sup>. Estes estudos demonstraram que o relaxamento da musculatura lisa vascular poderia ser induzido por acetilcolina dependente do endotélio, percebeu-se que o relaxamento dependeria de uma substância até então desconhecida, nomeada, pelo pesquisador, como fator relaxante derivado do endotélio<sup>14, 15</sup>. Após a publicação deste estudo, o endotélio se tornou um alvo de novos estudos vasculares; posteriormente, vários estudos foram realizados para descobrir a fisiologia e fisiopatologia do endotélio. Um estudo realizado por Mey e Vanhoute, ainda na década de 80, indicou, pela primeira vez, que o endotélio não tinha somente a função de vasodilatação, mas, também, de vasoconstrição<sup>16, 17</sup>. Após a descoberta da função endotelial na vasodilatação, os estudos foram aprofundados e percebeu-se que o endotélio também libera substâncias vasoconstritoras, como os peptídeos vasoconstrictores: angiotensina II, endotelina I, responsáveis pela homeostase e liberação de metabólitos contráteis do ácido raquidônico<sup>18,19</sup>.

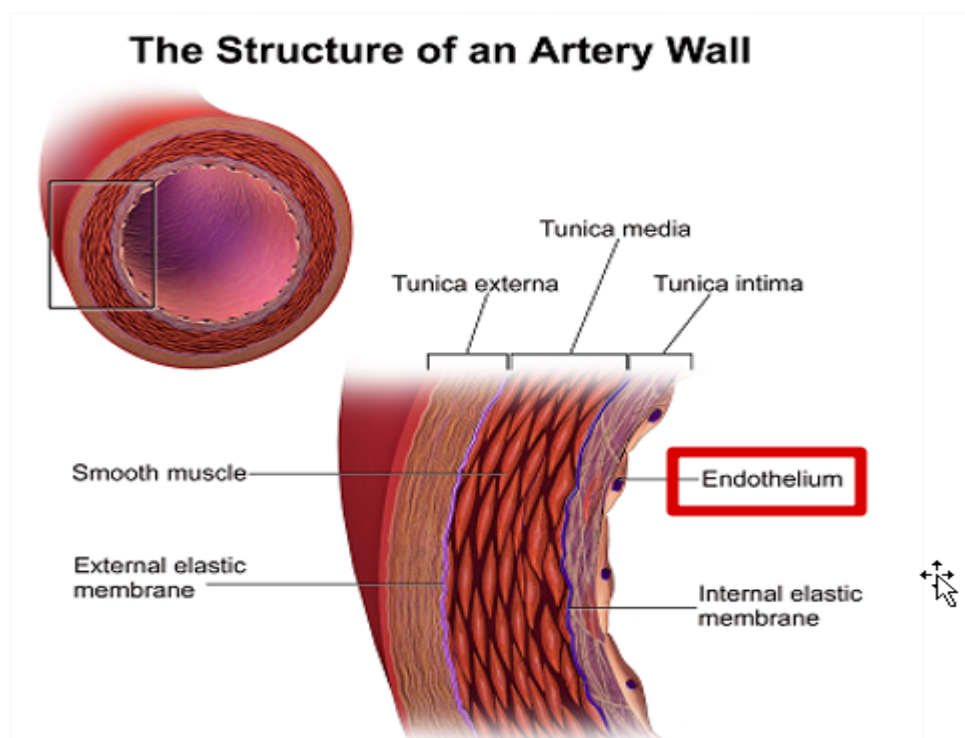


Figura 4. Estrutura de uma artéria evidenciando o endotélio.

## **1.5 Óxido nítrico e a regulação do tônus vascular**

Consultando a literatura, há relatos de estudos realizados no final da década de 70, que indicaram o papel dos nitratos orgânicos como agente responsável pela vasodilatação em mamíferos<sup>16,20</sup>. Esta vasodilatação ocorreria após os nitratos orgânicos ativarem a enzima Guanilato Ciclase solúvel<sup>21, 22</sup>. Após esse achado, na década de 80, conforme anteriormente relatado, um estudo realizado em artéria de coelho evidenciou 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, mas nomeado como fator relaxante derivado do endotélio<sup>16,23</sup>. Somente no final da década de 80 que o fator relaxante do endotélio foi associado à produção de óxido nítrico, que é um gás identificado como neurotransmissor<sup>24</sup>.

O óxido nítrico é produzido através da enzima óxido nítrico encontrada no endotélio e no sistema nervoso<sup>24,25</sup>. Sua classificação endotelial e neural são constitutivas devido serem produzidas continuamente e ativadas na presença de cálcio. Existe, ainda, a forma induzível que é expressa e não é cálcio dependente<sup>26</sup>. A isoforma endotelial conhecida como NOS-3 desempenha uma função importantíssima na produção de óxido nítrico no músculo liso vascular. Este dado pode ser elucidado pelo estudo realizado com camundongos de laboratório, que demonstrou que a NOS-3 é 30%<sup>24</sup> superior quando comparada com animais selvagens. O óxido nítrico, ao interagir com seu alvo endógeno, causa o relaxamento das células do músculo<sup>24,25</sup>.

### **1.5.1 Óxido nítrico em não mamíferos**

Há poucos estudos sobre a função do óxido nítrico na modulação dos vasos em vertebrados não mamíferos<sup>26, 27</sup>. Há descrito que o óxido nítrico está presente em peixes teleósteos<sup>26</sup>, mas em outras espécies não há conhecimento consolidado, seja pela dificuldade de preservar o endotélio nos estudos devido ao baixo lúmen dos vasos, ou devido os vasos dos peixes de várias espécies não liberarem a substância<sup>26,27</sup>. O óxido nítrico tem sido reportado como importante mediador envolvido no relaxamento de músculo liso vascular em aves, répteis e anfíbios<sup>26,28</sup>. Estudos realizados por ensaio e análise de imuno-histoquímica demonstram a



presença de óxido nítrico neuronal em nervos contendo receptores nítricos localizados na região perivascular de peixes e anfíbios, indicando a participação do óxido nítrico no controle do tônus vascular<sup>29,30</sup>.

Quando comparamos mamíferos com outros animais, os estudos relataram que, ao contrário do observado em mamífero, que a liberação do NO encontra-se em nervos parassimpáticos, os vasos de peixes são inervados apenas por nervos simpáticos, deste modo há a indicação que, nos peixes, o mesmo terminal nervoso que libera peptídeos vasodilatadores também libera agentes vasoconstritores<sup>29,30</sup>.

## **1.6 Circulação sanguínea**

Os mamíferos e as aves são animais endotérmicos (regulam a temperatura corporal); estes evoluíram com a base ancestral dos répteis. É sabido que ambos têm um consumo elevado de oxigênio; deste modo, para manter a homeostase orgânica, os animais endotérmicos desenvolveram ao longo do tempo um complexo sistema de controle de nutrientes e regulação da resistência vascular<sup>31,32</sup>. Os répteis, em geral, apresentam coração com três câmaras, diferente dos mamíferos, conforme a figura abaixo<sup>32</sup>:

## **1.7 Circulação sanguínea de serpentes**

O coração dos répteis tem três cavidades em geral. Acredita-se que não há diferenças entre as pressões nos ventrículos. Pode não haver diferença entre as pressões nos ventrículos e as pressões pulmonares e sistêmicas, isso se deve a mistura dos tipos de sangue (venoso e arterial) que passam pelo coração, embora em proporção menor do que nos anfíbios<sup>31,32,33</sup>. Deste modo, as pressões tendem a ter o mesmo valor. Assim, a frequência cardíaca em répteis tende a ser baixa, e a regulação da pressão arterial, nestes animais, ocorre em grande maioria pela regulação local do tônus vascular<sup>32</sup>. Podemos então considerar que a circulação dos répteis é dupla e incompleta, em razão disso os animais pertencentes a esse grupo são pecilotérmicos, isto é, adaptam a temperatura do corpo a temperatura do ambiente. Quando os animais estão em ambiente terrestre, as oscilações de temperatura são maiores do que no ambiente aquático, eles utilizam as fontes externas de calor para manter a temperatura do corpo próximo à do ambiente, por isso é comum ver répteis expostos ao sol durante o dia<sup>31,32</sup>. Quando os apresentam

aumento de temperatura, procuram locais com a temperatura mais amenas como lagos, rios ou sombras <sup>31,32</sup>

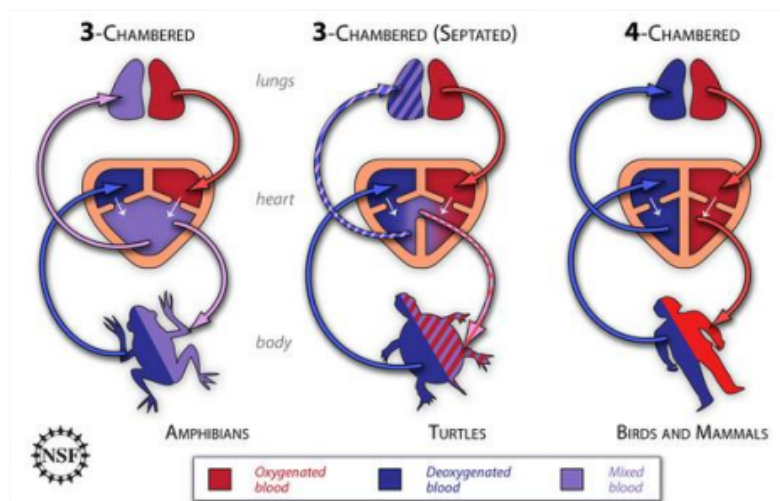


Figura 5. Representação comparativa da disposição de câmaras cardíacas em anfíbios (tricavitários), répteis (com exceção de crocodilianos; tricavitários septados) e mamíferos (tetracavitários).

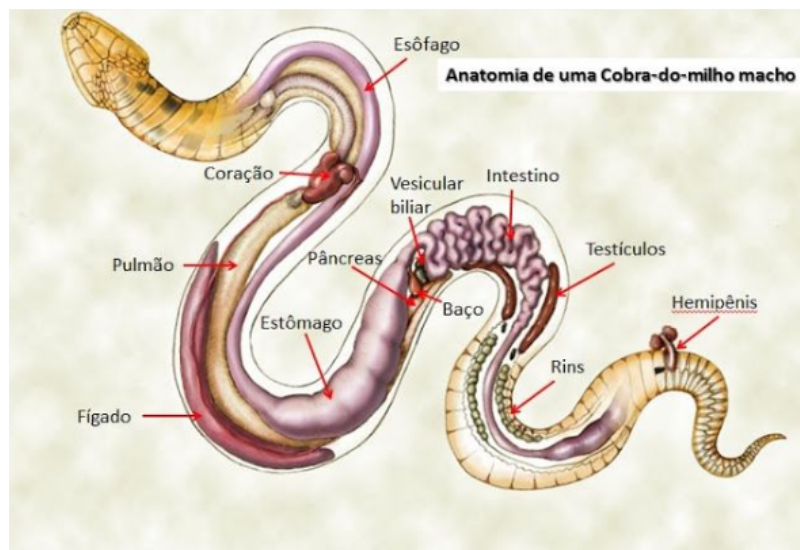


Figura 6. Anatomia de *Pantherophis guttatus*

## 1.8 Justificativa e relevância

Conforme descrito anteriormente, a regulação pressórica em répteis ocorre, na maioria das vezes, parte devido ao controle local da resistência vascular periférica. Acredita-se que esta regulação deve ser mediada óxido nítrico, pelo fato dele ser um

importante mediador endógeno, que é envolvido na regulação local da musculatura lisa vascular em mamíferos. Um estudo realizado com jabuti pitanga e com cobra dos milharais <sup>33</sup> evidenciou que a via NO-GCs-GMPc está envolvida no controle do tônus de aortas e de corpos cavernosos desses répteis, assim como encontrou como resultado a existência de canais de sódio resistentes TTX em tecidos de *P. guttatus*<sup>33</sup>. O referido estudo observou um relaxamento por estímulo de campo elétrico tendo resposta frequência-dependente, este não foi abolido após a adição de L-NAME (100 µM). O estudo levanta a hipótese possível para explicar a relação evento-causa, propondo a hipótese de que a modulação não seria neuronal e, sim, do endotélio. Neste estudo, foi investigada a natureza do mediador liberado de 6-nitrodopamina pelo endotélio da aorta de *P. guttatus*. por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS) e caracterizado farmacologicamente o mecanismo de relaxamento do NO <sup>33,34</sup>.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Investigar a ação *in vitro* da 6-nitrodopamina liberada pelo endotélio em anéis aórtico de *Pantherophis guttatus*

### 2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a liberação da 6-nitrodopamina por LC-MS/MS;
- Avaliar o papel do endotélio como fonte de 6-nitrodopamina na contração induzida por EFS;
- Caracterizar o mecanismo farmacológico das contrações induzidas por catecolaminas em anéis aórtico de *Pantherophis guttatus*;
- Identificar a função vasodilatadora da 6-nitrodopamina em anéis aórticos pré-contraídos;
- Identificar por imuno-histoquímica a presença de marcadores neuronais (S-100 e Calretinina).

### 3. MATERIAL E MÉTODO

Para realização do presente estudo de experimento animal foram utilizados animais da espécie *Pantherophis guttatus* de ambos os sexos, com peso médio variando entre 400-700 g. O estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (CEUA/UNICAMP: 5266-1/2019), seguindo as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Os animais foram obtidos no Parque Ecológico do Tietê (São Paulo, SP) e centro de reabilitação de animais silvestres (CRAS-Univap; São José dos Campos, SP).

#### 3.1 Isolamento do tecido

Os animais foram anestesiados com dois anestésicos a Cetamina na dose 70mg/kg e o Midazolam 2 mg/kg ambas administradas via intramuscular, após o efeito anestésico os animais foram eutanasiados por exsanguinação. Posteriormente a eutanásia foi iniciado a dissecação do segmento da aorta, sendo retirado do corpo do animal e colocado em imersão de solução Krebs-Henseleit's (KHS) oxigenada (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico), o PH da solução foi de 7.4 aquecido a 27°C (Campos et al., 2018a).

#### 3.2 Determinação das concentrações de catecolamina no KHS por espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS)

Após o acondicionamento inicial do tecido do mesmo animal, eles foram separados em quatro porções de tamanho aproximado de 15mm; duas destas porções do vaso tiveram o endotélio preservado e as outras duas porções tiveram o endotélio removido de forma mecânica esfregando suavemente os vasos com fórceps. Todas as quatro porções da mesma cobra foram emersas em banho de órgão de contendo 5 mL da solução de KHS oxigenado e adicionado ácido ascórbico (3 mM) a 27 °C por 30 minutos. Os anéis aórticos intactos do endotélio foram incubados na ausência e na presença do inibidor de oxido nítrico N(gama)-nitro-L-arginina metil (L-NAME, 100 µM). Uma alíquota contendo 2ml de KHS foi transferida para tubo Eppendorf e depois este foi levado o freezer a uma temperatura de -20

°C até a análise por **espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida** (LC-MS / MS).

O método utilizado para a quantificação de 6-ND foi o LC-MS/MS, ele foi modificado para permitir a medição das quatro catecolaminas (6-ND, dopamina, noradrenalina e adrenalina) em uma única análise cromatográfica, conforme proposto por Britto-Júnior et al <sup>14</sup>.

As catecolaminas foram extraídas a partir de 1 mL de KHS na fase sólida. O KHS foi adicionado a 50 µL dos padrões internos (100 ng/mL de 6-nitrodopamina-d4, dopamina-d3, noradrenalina-d6 e adrenalina-d6). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos. Os cartuchos Estrato-X™ 33 mm Poliméricos Reversed SPE foram pré-condicionados com 1 mL de metanol e, em seguida, equilibrados com 2 mL de água desionizada. As amostras foram injetadas no cartucho, e o cartucho foi posteriormente lavado 3 vezes com água deionizada. As amostras foram então eluídas com 0,9 mL de metanol/água (90/10, v/v) com ácido fórmico de 0,1%. O eluato foi evaporado sob o fluxo N<sub>2</sub> a 50°C. O resíduo foi dissolvido com 100 µL de acetonitrilo/água (50/50, v/v) com ácido fórmico de 0,1% e transferido para frascos prontos para injeção.

O sistema LC-MS/MS consistia no Sistema LC ADVp Liquid 5 Chromatograph Shimadzu System (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa quadrupole de 8060 triplos (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) operando no modo de ionização positiva de eletrospray. As amostras foram injetadas no sistema por meio de um autoinjeter SIL-30AC, a uma temperatura de 8°C. A separação cromatográfica foi realizada à temperatura ambiente usando uma coluna GIST-HP C18 (150 mm × coluna de 3,0 mm, 3 mm) (Shimadzu, Duisburg, Alemanha). Uma fase móvel de 75% A composta por água deionizada com ácido fórmico de 0,1% (v/v) e 25% de fase B móvel consistindo de aceto nitrilo /água (90/10, v/v) com ácido fórmico de 0,1% a uma vazão de 0,35 mL/min. O eletro spray foi configurado para monitoramento de reação múltipla (MRM) para monitorar as transições 199,10 > 181,95 para 6-nitrodopamina, 203,10 > 186,00 para 6-nitrodopamina-d4, 154,00 > 91,15 para dopamina, 157,00 > 93,00 para dopamina d3, 170,10 > 107,10 para noradrenalina, 176,10 > 158,10 para noradrenalina-d6, 184,20 > 107,00 para adrenalina, e 190,00 > 171,95 para adrenalina-d6. O volume de injeção foi 3 µL de cada amostra. O tempo total de execução foi de 3,5 min. A

validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes de validação de métodos bioanalíticos da United States Food and Drug Administration.

### **3.3 Preparações do anel aórtico e gravações de tensão isométrica**

Após o acondicionamento inicial do tecido do mesmo animal, as artérias foram cortadas em anéis medindo aproximadamente 3 mm, estes anéis foram suspensos verticalmente entre dois ganchos metálicos, um dos ganchos fixados dentro do banho de órgãos e o outro conectado ao transdutor. O tecido fica imerso em 10ml KHS (banhos de órgãos) a solução de KHS é gasificada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub>: 5% de CO<sub>2</sub>, mantendo uma temperatura de 27°C e o pH 7,4. O tecido verticalmente suspenso (conforme abordado) é avaliado pelo registo da força isométrica usando um software Power Lab 400TM.

Após o preparo do tecido no banho de órgãos, os anéis aórticos permanecem incubados por 1h antes de iniciar o experimento. Decorrido o tempo de estabilização os anéis foram pré-contraídos com cloreto de potássio (KCl, 80 mM), para testar a viabilidade do tecido. A integridade do endotélio nos anéis aórticos foi avaliada como relaxamento induzido por acetilcolina na concentração de 1  $\mu$ M<sup>14,15</sup>

### **3.4 Curvas de concentração-resposta à dopamina, noradrenalina e adrenalina**

Curvas cumulativas de concentração-resposta à dopamina (1 nM-1 mM), noradrenalina (1 nM-300  $\mu$ M) e adrenalina (1 nM-300  $\mu$ M) foram realizadas em anéis aórticos endotélio-intactos na ausência e na presença de L-NAME (100  $\mu$ M, 30 min). Nas preparações pré-tratadas com L-NAME, as curvas cumulativas de concentração-resposta à dopamina (1 nM-1 mM) foram realizadas na ausência e a presença de 6-ND (0,1, 0,3 e 1  $\mu$ M) ou do receptor adrenérgico seletivo  $\alpha$ 1 antagonista de receptor (10, 30 e 100 nM). Curvas cumulativas de concentração-resposta à noradrenalina (1 nM-300  $\mu$ M) e adrenalina (1 nM-300  $\mu$ M) foram realizadas em anéis aórticos intactos endotélio tratados com L-NAME (100  $\mu$ M, 30 min) na ausência e na presença de 6-ND (1  $\mu$ M) ou prazosin (10, 30 e 100 nM).

### **3.5 Contrações de aorta induzidas por estimulação de campo elétrico (EFS)**

Os anéis aórticos intactos de Endotélio foram submetidos ao EFS a 60 V para 30 s, a 8-16 Hz em pulsos de onda quadrada (0,3 ms de largura de pulso, 0,1 ms de atraso), usando um estimulador Grass S88 (Astro-Medical, RI, USA). As contrações induzidas pelo EFS dos anéis aórticos foram realizadas na presença ou não de L-NAME (100  $\mu$ M) ou do inibidor solúvel de guanilato cyclase ODQ (100  $\mu$ M). Anéis aórticos pré-tratados com L-NAME (100  $\mu$ M) também foram submetidos à EFS na presença de 6-ND (1  $\mu$ M). O cloreto de potássio (KCl, 80 mM) foi adicionado no início e no final dos protocolos experimentais para avaliar a reatividade tecidual após a EFS <sup>33,34</sup>.

### 3.6 Efeito de 6-ND em anéis aórticos pré-contraídos

Em anéis de aórtico com endotélio intacto e desnudado e em endotélio intacto pré-tratado com L-NAME (100  $\mu$ M), os preparativos foram pré-contratados com endotelina-1 (ET-1; 3 nM). Após a obtenção de uma contração sustentada, curvas cumulativas de concentração-resposta para 6-ND (10 pM – 1  $\mu$ M) ou para antagonista seletivo de dopamina D2-receptor L-741.626 (10 pM – 1  $\mu$ M) foram realizados <sup>33,34</sup>

### 3.7 Imuno-histoquímica para proteína S-100 e Calretinina

Após a eutanásia, foram *coletadas amostras do Gutatus de Pantherophis intacta* (n= 3), fixadas em formalina tamponada 10% neutra por 24 h a 24 °C, desidratadas, embutidas em cera de parafina e seccionadas a 4-5  $\mu$ m. Posteriormente, essas seções foram manchadas para proteína S-100 (um marcador de tecido neural; ou calretinina (marcador neural/neuronal; <sup>35</sup> para investigar a presença de fibras nervosas dentro das paredes aórticas usando os seguintes anticorpos primários: (1) anti-S-100 (anticorpo monoclonal de coelho, Cat.# MAB0791, 1:200) ,que reage com proteína bovina, humana, rato e rato S100; Millipore, EUA) e anti-calretinina (anticorpo monoclonal do rato; Cat.# IS627; à 1:200), que reage com calretina humana; DAKO/Agilent, EUA). A imunohistoquímica foi realizada manualmente. Resumidamente, as seções foram desparafinadas em xileno e rehidratadas em uma série de banhos de etanol de increasing concentração. Eles foram então incubados em tampão citrato no pH 6.0 em um conjunto de vapor para 20 min



(aproximadamente 95°C). As seções foram então incubadas por 2 h em temperatura ambiente (25°C) com os anticorpos primários acima mencionados. Posteriormente, essas seções foram incubadas com o NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra/Leica Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, e usando diaminobenzidina (DAB líquido, DakoCytomation, Carpinteria, USA) como um cromogen (que torna um precipitado marrom no local de ligação de anticorpos). As seções foram contra-manchadas com a hematoxilina de Harris e enseada escurregou em Entellan. Os controles negativos consistiam em omissão do anticorpo primário e incubação com os diluentes de anticorpos primários, bem como com o sistema de desetecção. Isso foi realizado para todos os ensaios imunohistoquímicos para identificar qualquer coloração de fundo. As seções cerebrais *Pantherophis guttatus* (n = 3) foram utilizadas como controles positivos para a presença de ambos os antígenos (ou seja, proteína S-100 221 e calretinina). Além disso, seções fixas de parafina de um astrócitoma pilocítico humano e um cólon humano normal contendo gânglios mientéricos e fibras nervosas foram usados como controles positivos adicionais para a presença de S-100 e calretinina, respectivamente. Todos os slides foram examinados e fotomicrografados usando um microscópio trinocular Olympus CX43 (Olympus, EUA) acoplado a uma câmera digital Nikon Coolpix 3.3MP CCD (Nikon, Japão). A positividade foi avaliada por um médico experiente, patologista PhD (AAS), que ficou cego à presença/ausência do anticorpo primário na amostra em exame (o observador não sabia se uma amostra de teste ou um controle de omissão estava sendo avaliado). A cegueira foi alcançada cobrindo as etiquetas de slides com um adesivo removível de oclusão.

### 3.8 Drogas e Soluções

As drogas foram obtidas conforme:

Dopamina, N gama-nitro-L-arginine metil ester cloridrato (L-NAME), ácido ascórbico e prazosin foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, Missouri, EUA). Adrenalina, endotelina-1 (humana, suína), L-741.626, noradrenalina e 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-1( ODQ) foram compradas da Cayman Chemical Co (Michigan, EUA). Nitrodopamina-d4 foram adquiridas da Toronto Research Chemicals (Ontário, CA). Cloridrato de dopamina-d3, cloridrato DL-noradrenalina-d6 e cloridrato de adrenalina-d6 foram adquiridos dos Isótopos CDN

(Quebec, CA). Os cartuchos de SPE Poliméricas Strata-X™ de 33 mm foram comprados das colunas Phenomenex (Califórnia, EUA) e GIST-HP C18, fro Shimadzu (Duisburg, Alemanha). Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), monobásico de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e glicose foram adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). A composição do KHS foi em mM: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 e dextrose 5.6.

### 3.9 Análise de dados

A análise dos dados para determinar o pEC<sub>50</sub> foi realizada usando software GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 6.0, San Diego, CA, USA). Todos os dados de concentração-resposta foram avaliados para um ajuste a uma função logística na forma:  $E = E_{max} / [1 + (10^c / 10^x)^n] + F$ , onde E representa o aumento da resposta contraída induzida pelo agonista, E max é o efeito agonista máximo, c é o logaritmo de concentração do agonista que produz 50% de E max, x é o logaritmo da concentração da droga; o termo exponencial, n, é um parâmetro de encaixe de curva que define a inclinação da linha concentração-resposta, e F é a resposta observada na ausência de droga adicionada. Os valores de pA<sub>2</sub> foram calculados pela equação;  $pA_2 = \log(\text{concentração antagonista } 8) - \log(CR-1) - \log(\text{concentração antagonista})$ .

Os dados são expressos como  $\pm$  erro padrão da média (SEM) do número de experimentos. Nos experimentos farmacológicos, o número de experimentos expressos como x/y, onde x representa o número de aortas (animais) e y o número de anéis empregados no experimento. As contrações foram quantificadas em milli-Newtons (mN). Um anel foi usado como resposta de controle e o outro anel foi incubado com um antagonista/inibidor.

#### 4. RESULTADOS

O resultado do presente estudo foi publicado na revista internacional “*Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*”, sob o nome: “Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of *Pantherophis guttatus* aortic rings”. Os autores do artigo publicado foram: Lima AT, Dos Santos EX, Britto-Júnior J, de Souza VB, Schenka AA, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, Antunes E, De Nucci G. A publicação foi realizada em formato *on-line*, em 10 de agosto de 2022.

Conforme descrito, a publicação na íntegra:



Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpc](http://www.elsevier.com/locate/cbpc)Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of *Pantherophis guttatus* aortic rings

Antonio Tiago Lima<sup>a</sup>, Eric Xavier dos Santos<sup>a</sup>, José Britto-Júnior<sup>a,\*</sup>, Valéria B. de Souza<sup>a</sup>,  
André A. Schenka<sup>a</sup>, Rafael Campos<sup>b,c</sup>, Manoel Odorico Moraes<sup>c</sup>, Maria Elisabete A. Moraes<sup>c</sup>,  
Edson Antunes<sup>a</sup>, Gilberto De Nucci<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil<sup>b</sup> Superior Institute of Biomedical Sciences, Ceará State University (UECE), Fortaleza, Brazil<sup>c</sup> Clinical Pharmacology Unit, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil<sup>d</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

Edited by Martin Grosell

## Keywords:

Dopamine  
Nitric oxide  
L-761,626  
ODQ  
LC-MS/MS

## ABSTRACT

6-Nitrodopamine (6-ND) is a novel catecholamine that is released from human umbilical cord vessels and *Chelonoidis carbonaria* aortic rings. The synthesis/release of 6-ND is inhibited by either pre-incubation of the vessels with the nitric oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME or by mechanical removal of the endothelium. 6-ND causes powerful vasorelaxation, acting as a potent and selective dopamine D<sub>2</sub>-like receptor antagonist.

Basal release of 6-ND from *Pantherophis guttatus* endothelium intact and denuded aortic rings was quantified by LC-MS/MS. In order to evaluate the interaction of 6-ND with other catecholamines, aortic rings were suspended vertically between two metal hooks in 10-mL organ baths containing Krebs-Henseleit's solution and attached to isometric transducers.

Endothelium intact aortic rings presented basal release of 6-ND, which was significantly reduced by previous incubation with L-NAME (100 μM). In endothelin-1 (3 nM) pre-contracted endothelium intact aortic rings, 6-ND (10 pM–1 μM) and the dopamine D<sub>2</sub>-receptor antagonist L-761,626 (10 pM–1 μM) induced concentration-dependent relaxations, which were not affected by incubation with L-NAME but greatly reduced in endothelium-removed aortic rings.

6-ND (0.1–1 μM) produced significant rightward shifts of the concentration-response curves to dopamine in L-NAME pre-treated endothelium-intact (pA<sub>2</sub> 7.01) rings. Contractions induced by noradrenaline and adrenaline were not affected by pre-incubation with 6-ND (1 μM). The EFS-induced contractions of L-NAME pre-treated endothelium-intact aortic rings were significantly inhibited by incubation with 6-ND (1 μM).

The results indicate that 6-ND released from *Pantherophis guttatus* aortic rings is coupled to NO release and represents a new mechanism by which NO can modulate vascular reactivity independently of cGMP production.

## 1. Introduction

Electrical field stimulation (EFS) produces frequency-dependent contractions in *Pantherophis guttatus* aortic rings, which are abolished by the mechanical removal of the endothelium (Campos et al., 2018a). Since the EFS-induced contractions are antagonized by the α<sub>1</sub> and α<sub>2</sub>-adrenergic antagonist phentolamine (Gould and Reddy, 1976) and are insensitive to pre-treatment with the sodium channel blocker tetrodotoxin (Narahashi et al., 1967), these results indicated that endothelium-

derived catecholamines are responsible for the EFS-induced contractions. Similar results were obtained with the aorta from the venomous snakes *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* (Campos et al., 2018b).

Human umbilical arteries and vein release both catecholamines dopamine (Britto-Júnior et al., 2020) and 6-nitrodopamine (6-ND; Britto-Júnior et al., 2021a), which are also dependent of the integrity of the endothelium. Similar results were reported for aortic rings obtained from the tortoise *Chelonoidis carbonarius*, where the release of 6-ND was

\* Corresponding author at: University of Campinas (Unicamp), Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, 13083-887 Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: [josebrittojr@dac.unicamp.br](mailto:josebrittojr@dac.unicamp.br) (J. Britto-Júnior).

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109471>

Received 26 June 2022; Received in revised form 10 September 2022; Accepted 15 September 2022

Available online 17 September 2022

1532-0456/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

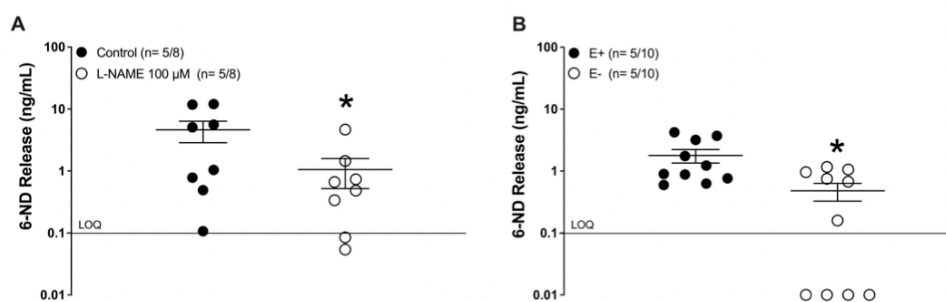


Fig. 1. Basal release of 6-nitrodopamine (6-ND) from aortic rings of *Pantherophis guttatus*. The basal release of 6-ND was measured by LC-MS/MS following a 30 min-period incubation in Krebs-Henseleit's solution. Treatment with L-NAME (100  $\mu$ M; panel A) or mechanical removal of endothelium (E-; panel B) reduced the 6-ND basal release from the aortic rings. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* indicates  $p < 0.05$ . In panel A, it was employed 5 aortas and 16 rings and in panel B, 5 aortas and 20 rings. Unpaired t-test was applied in Panels A and B.

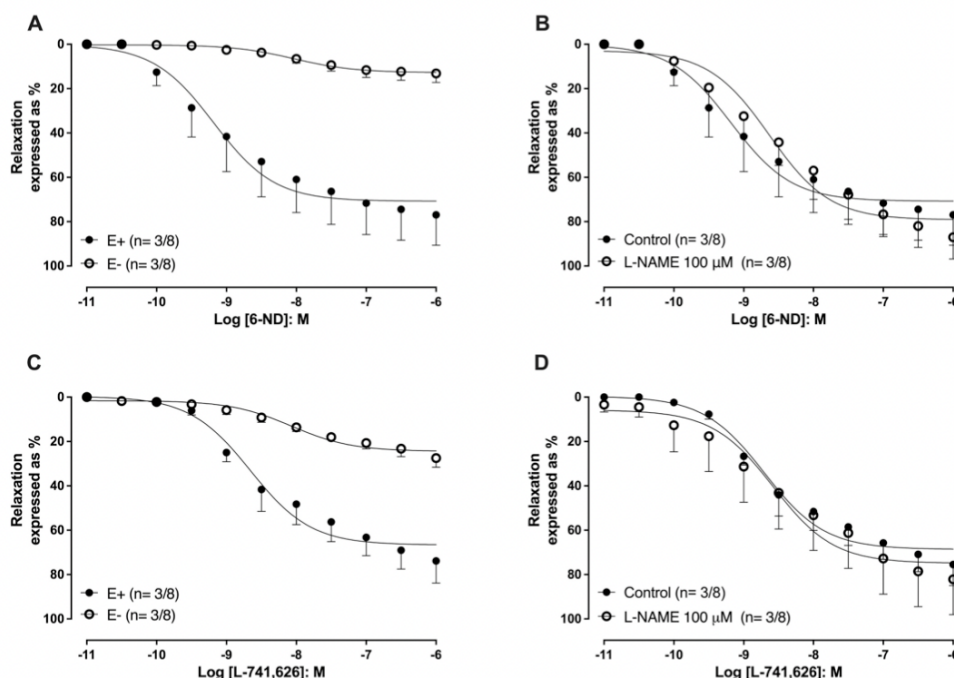


Fig. 2. Relaxations induced by 6-ND and L-741,626. In endothelin-1 pre-contracted (3 nM) *Pantherophis guttatus* aortic rings 6-nitrodopamine (6-ND, panel A–B) and L-742,626 (panel C–D) caused concentration-dependent relaxations of *Pantherophis guttatus* aortic rings. The relaxations were abolished by endothelium removal (E-; panel A–C) but not affected by incubation with L-NAME (panel B–D). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. In panel A, it was employed 3 aortas and 16 rings; in panel B, 3 aortas and 16 rings; in panel C, 3 aortas and 16 rings and in panel D, 3 aortas and 16 rings. Unpaired t-test was applied in Panels A–D.

decreased by either mechanical endothelium removal or pre-treatment with the nitric oxide (NO) synthase inhibitor  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; Britto-Júnior et al., 2022). In both human and tortoise vessels, this novel catecholamine 6-ND causes a powerful vasorelaxation, acting as a potent and selective dopamine  $D_2$ -like receptor antagonist (Britto-Júnior et al., 2021a, Britto-Júnior et al., 2022).

The above findings that the vasculature endothelium releases both dopamine and 6-ND, and that they have antagonistic action in the

smooth muscle tonus, open the exciting possibility that this dynamic balance may be a crucial mechanism for local blood flow control (Quigg et al., 1989). Although the sympathetic nervous system has been implicated in the control of the microcirculation resistance (Awad et al., 2016), there is hardly any morphological evidence of the presence of sympathetic nerve terminals in the microcirculation.

Considering all the vertebrates, snakes show remarkable adaptations involving the cardiovascular system and gravity (Lillywhite et al.,



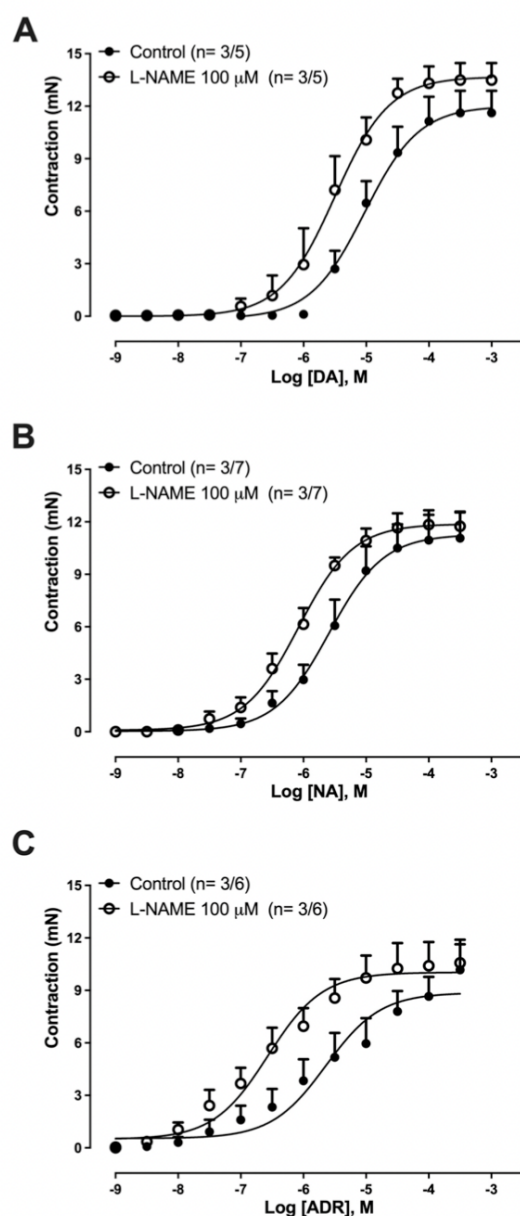


Fig. 3. Effect of L-NAME on the contractions induced by dopamine, noradrenaline and adrenaline. Pre-incubation with the NO synthesis inhibitor L-NAME (100  $\mu$ M) caused significant leftward shifts of the concentration-response curves dopamine (DA, panel A), noradrenaline (NA, panel B) and adrenaline (ADR, panel C). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. In panel A, it was employed 3 aortas and 10 rings; in panel B, 3 aortas and 14 rings and in panel C, 3 aortas and 12 rings. Unpaired *t*-test was applied in Panels A–C.

2012); a corn snake may crawl straight up the trunk of a tree in search of eggs (Lillywhite, 1988). Since *Pantherophis guttatus* aorta releases classical catecholamines, it was investigated here whether 6-ND is also released and its potential interactions with dopamine, noradrenaline and adrenaline in this tissue.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

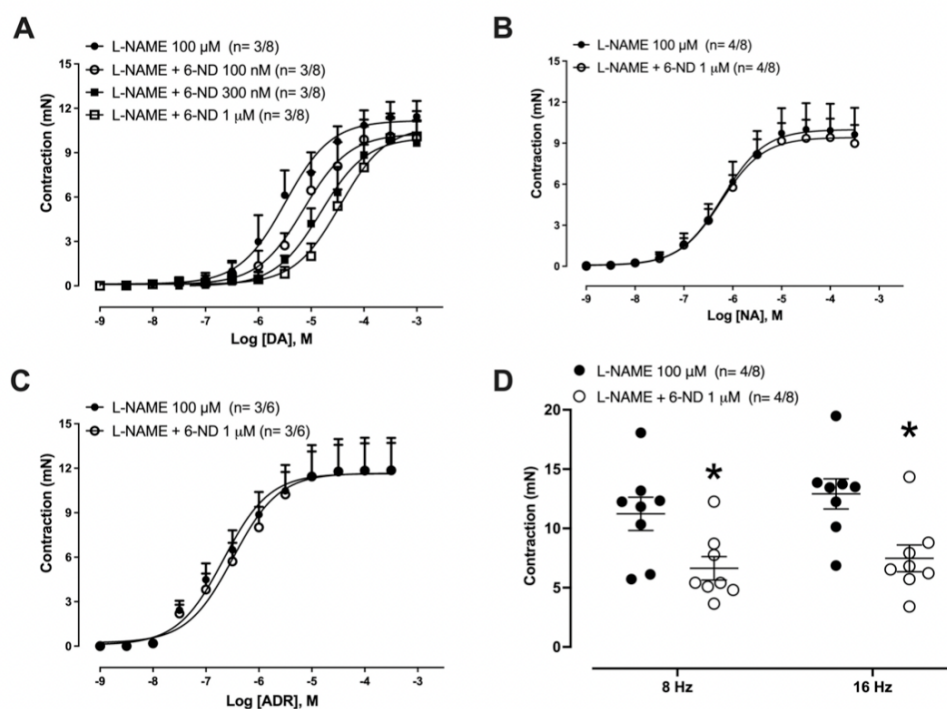
All experimental procedures using *Pantherophis guttatus* of either sex (weight varied from 400 to 700 g) was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/UNICAMP: 5266-1/2019) and followed the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020). The animals were obtained from Parque Ecológico do Tietê (São Paulo, SP, Brazil) and Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS-Univap; São José dos Campos, SP, Brazil).

### 2.2. Basal release of 6-nitrodopamine, dopamine, noradrenaline and adrenaline from *Pantherophis guttatus* aortic rings

The snakes were anesthetized with ketamine (70 mg/kg, IM) after sedation with midazolam (2 mg/kg, IM), after which the animals were euthanized by exsanguination. A segment of aorta was removed and immediately placed in oxygenated (95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>) Krebs-Henseleit's (KHS; pH 7.4) at 27 °C (Campos et al., 2018b). Subsequently, two aortic rings per animal (15-mm diameter) with intact endothelium and another two rings with denuded endothelium from the same snake were suspended in 5-mL organ bath containing oxygenated KHS and ascorbic acid (3 mM) at 27 °C for 30 min. The removal of endothelial cells was done mechanically by gently rubbing the vessels with forceps. The endothelium-intact aortic rings were incubated in the absence and in the presence of the NO synthesis inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100  $\mu$ M). A 2 mL KHS aliquot was transferred to an Eppendorf tube and stored at –20 °C until analysis.

### 2.3. Determination of catecholamine concentrations in KHS by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The LC-MS/MS method for quantification of 6-ND (Campos et al., 2020) was modified to allow the measurement of the four catecholamines (6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline) in a single chromatographic run (Britto-Júnior et al., 2021b). The extraction of the catecholamines from 1 mL of KHS was performed by solid phase extraction. Briefly, to 1 mL of KHS was added 50  $\mu$ L of the internal standards (100 ng/mL of 6-nitrodopamine-d<sub>4</sub>, dopamine-d<sub>3</sub>, noradrenaline-d<sub>6</sub>, and adrenaline-d<sub>6</sub>). The samples were homogenized for 10 s. The Strata™-X 33 mm Polymeric Reversed Solid Phase Extraction (SPE) cartridges were pre-conditioned with 1 mL of methanol and then balanced with 2 mL of deionized water. The samples were injected into the cartridge, and the cartridge was subsequently washed 3 times with deionized water. The samples were then eluted with 0.9 mL methanol/water (90/10, v/v) with 0.1 % formic acid. The eluate was evaporated under N<sub>2</sub> flow at 50 °C. The residue was dissolved with 100  $\mu$ L of acetonitrile/water (50/50, v/v) with 0.1 % formic acid and transferred to vials ready for injection. The LC-MS/MS system consisted of LC ADVp Liquid Chromatograph Shimadzu System (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) coupled to an 8060 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) operating in electrospray positive-ionization mode. Samples were injected into the system by means of a SIL-30AC autoinjector, at a temperature of 8 °C. The chromatography separation was performed at room temperature using a GIST-HP C<sub>18</sub> column (150 mm  $\times$  3.0 mm, 3 mm) column (Shimadzu, Duisburg, Germany). A 75 % mobile phase A consisting of deionized water with 0.1 % formic acid (v/v) and 25 % mobile phase B consisting of acetonitrile/water (90/10, v/v) with 0.1 % formic acid at a flow rate



**Fig. 4.** Effect of 6-ND on the contractions induced by dopamine, noradrenaline, adrenaline and EFS. Endothelium-intact aortic rings were initially pre-treated with L-NAME (100 μM). Pre-incubation with 6-ND (0.1 to 1 μM) caused significant rightward shifts in the concentration-response to dopamine (DA, panel A), without modifying the responses to noradrenaline (NA, panel B) and adrenaline (Panel C). The EFS (8 and 16 Hz)-induced contractions were significantly reduced by pre-incubation with 6-ND (panel D). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* indicates  $p < 0.05$ . In panel A, it was employed 3 aortas and 32 rings; in panel B, 4 aortas and 16 rings; in panel C, 3 aortas and 12 rings and in panel D, 4 aortas and 16 rings. ANOVA followed by the Newman-Keuls post-test was applied in Panel A whereas the unpaired t-test was applied in Panels B–D.

of 0.35 mL/min were used. The electrospray was configured for multiple reaction monitoring (MRM) to monitor the transitions 199.10 > 181.95 for 6-nitrodopamine, 203.10 > 186.00 for 6-nitrodopamine- $d_4$ , 154.00 > 91.15 for dopamine, 157.00 > 93.00 for dopamine- $d_3$ , 170.10 > 107.10 for noradrenaline, 176.10 > 158.10 for noradrenaline- $d_6$ , 184.20 > 107.00 for adrenaline, and 190.00 > 171.95 for adrenaline- $d_6$ . The injection volume was 3 μL of each sample. The total run-time was 3.5 min. The method validation was carried out according to the United States Food and Drug Administration (FDA, 2001) bioanalytical method validation guidelines.

#### 2.4. Aortic ring preparations and isometric tension recordings

The aortic rings (3 mm) were suspended vertically between two metal hooks in 10-mL organ baths containing KHS, gassed with a mixture of 95 %  $O_2$ : 5 %  $CO_2$  (pH 7.4) at 27 °C. Isometric force was recorded using a PowerLab 400TM data acquisition system (Software Chart, version 7.0, AD Instrument, MA, USA). The tissues were allowed to equilibrate for 1 h before starting the experiments, after which the rings were pre-contracted with potassium chloride (KCl, 80 mM). The integrity of the endothelium in the aortic rings was evaluated through acetylcholine-induced relaxation (ACh, 1 μM; Mónica et al., 2012; Filogonio et al., 2020).

#### 2.5. Concentration-response curves to dopamine, noradrenaline and adrenaline

Cumulative concentration-response curves to dopamine (1 nM–1 mM), noradrenaline (1 nM–300 μM) and adrenaline (1 nM–300 μM) were performed in endothelium-intact aortic rings in the absence and the presence of L-NAME (100 μM, 30 min). In the L-NAME pre-treated preparations, the cumulative concentration-response curves to dopamine (1 nM–1 mM) were carried out in the absence and the presence of either 6-ND (0.1, 0.3 and 1 μM) or the selective  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist prazosin (10, 30 and 100 nM). Cumulative concentration-response curves to noradrenaline (1 nM–300 μM) and adrenaline (1 nM–300 μM) were performed in endothelium-intact aortic rings treated with L-NAME (100 μM, 30 min) in the absence and the presence of either 6-ND (1 μM) or prazosin (10, 30 and 100 nM).

#### 2.6. Electrical-field stimulation (EFS)-induced aorta contractions

Endothelium-intact aortic rings were submitted to EFS at 60 V for 30 s, at 8–16 Hz in square-wave pulses (0.3 ms pulse width, 0.1 ms delay), using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical, RI, USA). The EFS-induced contractions of aortic rings were performed in the presence or not of either L-NAME (100 μM) or the soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ (100 μM).

Aortic rings pretreated with L-NAME (100 μM) were also submitted

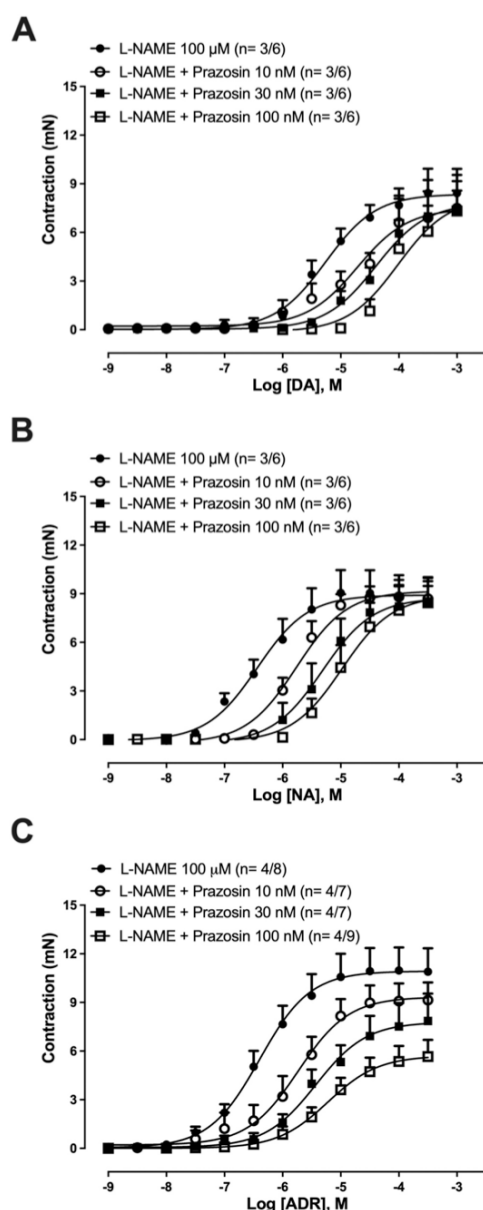


Fig. 5. Effect of prazosin on the contractions induced by dopamine, noradrenaline and adrenaline. Endothelium-intact aortic rings were initially pre-treated with L-NAME (100  $\mu$ M). The selective  $\alpha_1$ -adrenergic antagonist prazosin (10, 30 and 100 nM) produced concentration-dependent rightward shifts on the concentration-response curves to dopamine (DA, panel A), noradrenaline (NA, panel B) and adrenaline (ADR, panel C). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. In panel A, it was employed 3 aortas and 24 rings; in panel B, 3 aortas and 24 rings and in panel C, 4 aortas and 31 rings. ANOVA followed by the Newman-Keuls post-test was applied in Panels A–C.

to EFS in the presence of 6-ND (1  $\mu$ M). Potassium chloride (KCl, 80 mM) was added at the beginning and at the end of the experimental protocols to evaluate the tissue reactivity after EFS (Campos et al., 2020; Britto-Júnior et al., 2021a).

## 2.7. Effect of 6-ND in pre-contracted aortic rings

In aortic rings with intact and denuded endothelium and in endothelium-intact pre-treated with L-NAME (100  $\mu$ M), the preparations were pre-contracted with endothelin-1 (ET-1; 3 nM). After a sustained contraction was obtained, cumulative concentration-response curves to either 6-ND (10 pM–1  $\mu$ M) or the selective dopamine  $D_2$ -receptor antagonist L-741,626 (10 pM–1  $\mu$ M; Bowery et al., 1996) were performed.

## 2.8. Immunohistochemistry for S-100 protein and calretinin

Following euthanasia, samples of the *Pantherophis guttatus* intact aorta (n = 3) were collected, fixed in 10 % neutral buffered formalin for 24 h at 24  $^{\circ}$ C, dehydrated, embedded in paraffin wax and sectioned at 4–5  $\mu$ m. Subsequently, these sections were stained for S-100 protein (a neural tissue marker; Bao et al., 2011) or calretinin (a neural/neuronal marker; Morona et al., 2011) to investigate the presence of nerve fibers within the aortic walls using the following primary antibodies: (1) anti-S-100 (rabbit monoclonal antibody, Cat.# MAB0791, at 1:200, which reacts with bovine, human, rat and mouse S100 protein; Millipore, USA) and (2) anti-calretinin (mouse monoclonal antibody; Cat.# IS627; at 1:200, which reacts with human calretinin; DAKO/Agilent, USA). Immunohistochemistry was performed manually. Briefly, the sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of ethanol baths of increasing concentration. They were then incubated in citrate buffer at pH 6.0 in a steamer set for 20 min (at approximately 95  $^{\circ}$ C). The sections were then incubated for 2 h at room temperature (25  $^{\circ}$ C) with the above-mentioned primary antibodies. Subsequently, these sections were incubated with the NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra/Leica Biosystems), following the manufacturer's instructions, and using diaminobenzidine (liquid DAB, DakoCytomation, Carpinteria, USA) as a chromogen (which renders a brown precipitate at the antibody binding site). Finally, the sections were counter-stained with Harris' hematoxylin and cover-slipped in Entellan. Negative controls consisted of omission of the primary antibody and incubation with the primary antibody diluents, as well as with the detection system. This was performed for all the immunohistochemical assays to identify any background staining. Formalin-fixed, paraffin-embedded *Pantherophis guttatus* brain sections (n = 3) were used as positive controls for the presence of both antigens (i.e., S-100 protein and calretinin). Furthermore, formalin-fixed, paraffin-embedded sections of a human pilocytic astrocytoma and a normal human colon containing myenteric ganglia and nerve fibers were used as additional positive controls for the presence of S-100 and calretinin, respectively. All slides were examined and photomicrographed using an Olympus CX43 trinocular microscope (Olympus, USA) coupled to a Nikon Coolpix 3.3MP CCD digital camera (Nikon, Japan). Positivity was assessed by an experienced MD, PhD pathologist (AAS), who was blind to the presence/absence of the primary antibody on the sample under examination (the observer did not know whether a test sample or an omission control was being assessed). Blinding was achieved by covering the slide labels with a removable occluding sticker.

## 2.9. Drugs and solutions

Dopamine, N<sup>6</sup>-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), ascorbic acid and prazosin were obtained from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, Missouri, USA). Adrenaline, endothelin-1 (human, porcine), L-741,626, noradrenaline and 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) were purchased from Cayman Chemical



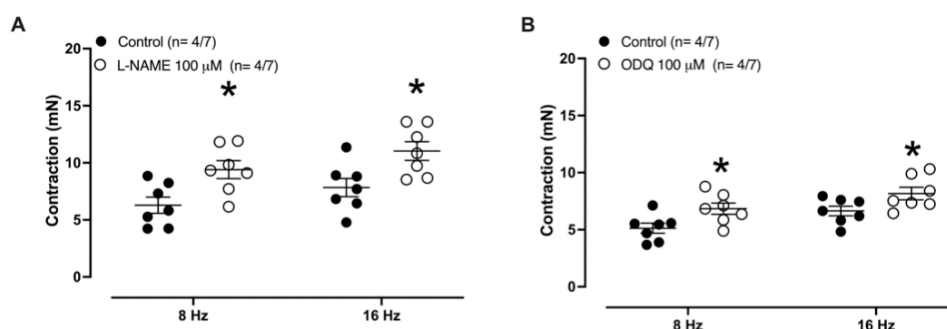


Fig. 6. Effects of L-NAME and ODQ on EFS-induced contractions. The EFS (8 and 16 Hz)-induced contractions were significantly increased by pre-incubation with L-NAME (100  $\mu$ M; Panel A) or ODQ (100  $\mu$ M, panel B). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* indicates  $p < 0.05$ . In panel A, it was employed 4 aortas and 14 rings and in panel B, 4 aortas and 14 rings. Unpaired t-test was applied in Panels A and B.

Co (Michigan, USA). 6-Nitrodopamine and 6-nitrodopamine- $d_4$  were acquired from Toronto Research Chemicals (Ontario, CA). Dopamine- $d_3$  hydrochloride, DL-noradrenaline- $d_6$  hydrochloride and adrenaline- $d_6$  hydrochloride were acquired from CDN Isotopes (Quebec, CA). Strata<sup>TM</sup>-X 33 mm Polymeric Reversed SPE cartridges were bought from Phenomenex (California, USA) and GIST-HP  $C_{18}$  columns were obtained from Shimadzu (Duisburg, Germany). Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), calcium chloride ( $CaCl_2$ ), magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ), sodium bicarbonate ( $NaHCO_3$ ), potassium phosphate monobasic ( $KH_2PO_4$ ) and glucose were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The composition of the KHS was in mM: NaCl 118, KCl 4.7,  $CaCl_2$  2.5,  $MgSO_4$  1.2,  $NaHCO_3$  25,  $KH_2PO_4$  1.2 and dextrose 5.6.

#### 2.10. Data analysis

Nonlinear regression analysis to determine the  $pEC_{50}$  was carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, version 9.4, San Diego, CA, USA) with the constraint that  $F = 0$ . All concentration–response data were evaluated for a fit to a logistics function in the form:  $E = E_{max} / ([1 + (10c / 10 \times n)] + F)$ , where  $E$  represents the increase in response contractile induced by the agonist,  $E_{max}$  is the effect agonist maximum,  $c$  is the logarithm of concentration of the agonist that produces 50 % of  $E_{max}$ ,  $x$  is the logarithm of the concentration of the drug; the exponential term,  $n$ , is a curve fitting parameter that defines the slope of the concentration–response line, and  $F$  is the response observed in the absence of added drug. The  $pA_2$  values were calculated from the intercept on the concentration axis and by application of the equation;  $pA_2 = \log(\text{antagonist concentration}) - \log(CR-1) - \log(\text{antagonist concentration})$  (Arunlakshana and Schild, 1959). In addition, standard ANOVA, followed by the Newman–Keuls post-test, were used when more than two groups were involved. A  $p$  value of  $< 0.05$  was considered statistically significant. The values of  $pEC_{50}$  data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) of  $n$  experiments. Values of  $E_{max}$  were expressed in milli-Newtons (mN).

In the pharmacological experiments, the number of experiments in expressed as  $x/y$ , where  $x$  represents the number of aortas (animals) and  $y$  the number of rings employed in the experiment. One ring was used as the control response and the other ring was incubated with an antagonist/inhibitor. Student's two-tail unpaired  $t$ -test was employed and the differences between groups and  $p < 0.05$  were considered significant. For  $E_{max}$  and  $pEC_{50}$  analysis, unpaired Student's  $t$ -test was used.

### 3. Results

#### 3.1. Basal release of 6-ND from *Pantherophis guttatus* aortic rings

Levels of 6-ND were quantified by LC-MS/MS in the KHS bathing *Pantherophis guttatus* aortic rings (Fig. 1). Pre-treatment of the rings with L-NAME (100  $\mu$ M, 30 min) reduced by 77 % ( $p < 0.05$ ) the 6-ND release ( $4.61 \pm 1.75$  and  $1.06 \pm 0.54$  ng/mL, for control and L-NAME aortic rings, respectively,  $p = 0.0365$ ; Fig. 1A). The 6-ND release was also significantly decreased by mechanical removal of the endothelium ( $1.79 \pm 0.43$  and  $0.48 \pm 0.15$  ng/mL for endothelium-intact and denuded aortic rings, respectively,  $p = 0.0058$ ; Fig. 1B). The basal release of dopamine, noradrenaline, and adrenaline was below the limit of quantitation (LOQ; 0.1 ng/mL, data not shown).

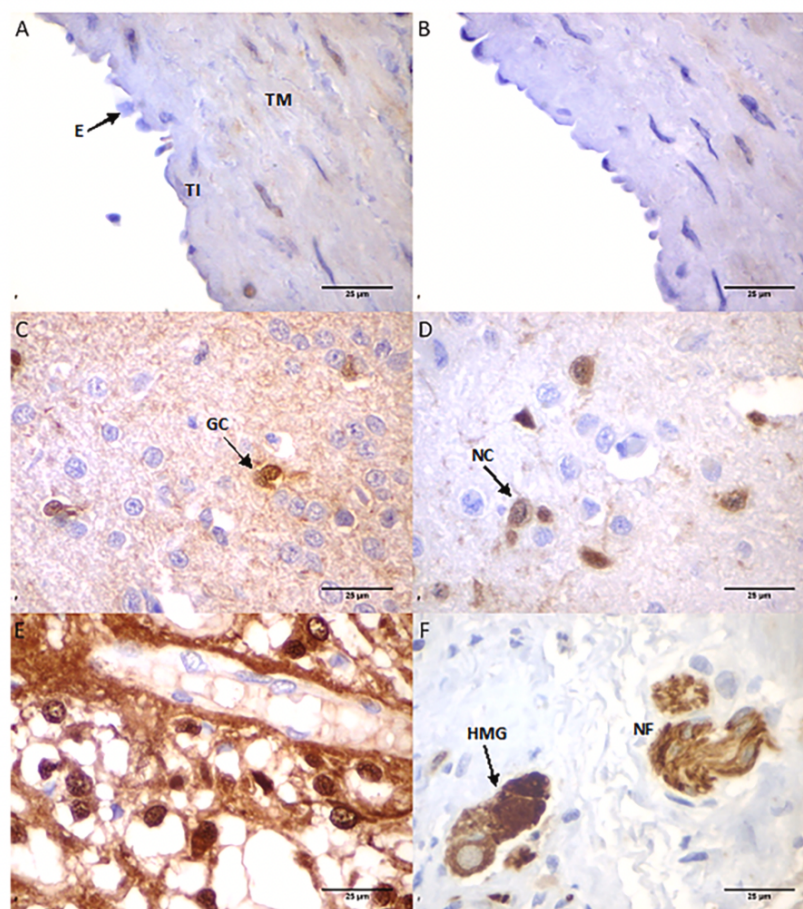
#### 3.2. Relaxing effects of 6-ND and L-741,626 on pre-contracted *Pantherophis guttatus* aortic rings

In endothelin-1 (3 nM) pre-contracted aortic rings, incubation with 6-ND (10  $\mu$ M–1  $\mu$ M) produced concentration-dependent relaxations with  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  values of  $9.18 \pm 0.25$  and  $76.91 \pm 13.75$  %, respectively ( $n = 3/8$ ; Fig. 2A and B). The relaxations were nearly absent in endothelium-denuded aortic rings (Fig. 2A), but unaffected by pre-incubation with L-NAME (Fig. 2B).

In another set of endothelin-1 (3 nM) pre-contracted aortic rings, incubation with the selective dopamine  $D_2$ -receptor antagonist L-741,626 (10  $\mu$ M–1  $\mu$ M) produced concentration-dependent relaxations ( $pEC_{50}$   $8.66 \pm 0.15$ ;  $E_{max}$   $73.87 \pm 10.03$  %;  $n = 3/8$ ; Fig. 2C and D). Similar to 6-ND, the relaxations induced by L-741,626 were greatly reduced by endothelium removal (Fig. 2C), but unaffected by incubation with L-NAME (Fig. 2D).

#### 3.3. Contractile effects of 6-ND, dopamine, noradrenaline, and adrenaline on *Pantherophis guttatus* aortic rings

Incubation with 6-nitrodopamine (1 nM–1  $\mu$ M) caused no contractions in *Pantherophis guttatus* aortic rings (data not shown;  $n = 5/10$ ). Dopamine (1 nM–1 mM), noradrenaline (1 nM–300  $\mu$ M) and adrenaline (1 nM–300  $\mu$ M) caused concentration-dependent aortic contractions (Fig. 3A–C). Pre-incubation with L-NAME (100  $\mu$ M) provoked significant leftward shifts ( $p < 0.05$ ) of the concentration–response curves to dopamine ( $pEC_{50}$   $5.02 \pm 0.09$  and  $5.50 \pm 0.10$  for control and L-NAME, respectively,  $n = 3/5$ ; Fig. 3A), noradrenaline ( $pEC_{50}$   $5.59 \pm 0.13$  and  $6.08 \pm 0.08$  for control and L-NAME, respectively,  $n = 3/7$ ; Fig. 3B) and adrenaline ( $pEC_{50}$   $5.67 \pm 0.17$  and  $6.59 \pm 0.14$  for control and L-NAME, respectively,  $n = 3/6$ ; Fig. 3C). Incubation with 6-nitrodopamine (1



**Fig. 7.** Detection of S-100 protein and calretinin (neural/neuronal markers) by immunohistochemistry: (panel A) absence of S-100 protein in *Pantherophis guttatus* aorta (both tunica intima (TI) and tunica media (TM) are devoid of any positivity); (panel B) absence of calretinin in *Pantherophis guttatus* aorta (both in tunica intima (TI) and tunica media (TM) are negative); (panel C) S-100 protein positivity in *Pantherophis guttatus* central nervous system glial cells and neuropil (positive control); (panel D) calretinin positivity in *Pantherophis guttatus* central nervous system neurons (positive control); (panel E) S-100 protein positivity in a human pilocytic astrocytoma (positive control); (panel F) calretinin positivity in normal human myenteric ganglia (HMG) and nerve fibers (NF) (large bowel) – positive control. Immunoperoxidase, 400 $\times$  (original magnification); scale bars = 25  $\mu$ m. E: endothelial cells; GC: glial cells; NC: neuron cells.

nM–1  $\mu$ M) caused no contractions in *Pantherophis guttatus* aortic rings pre-treated with L-NAME (data not shown;  $n = 5/10$ ).

### 3.4. Inhibitory effects of 6-ND on the contractions induced by dopamine and EFS in *Pantherophis guttatus* aortic rings

In L-NAME pre-treated aortic rings, 6-ND (0.1–1  $\mu$ M, 30 min) produced a significant rightward shift of the dopamine concentration-response curves ( $pA_2$   $7.01 \pm 0.57$ ,  $n = 3/8$ ,  $p = 0.0121$ ; Fig. 4A). In contrast to dopamine, 6-ND (1  $\mu$ M, 30 min) had no significant effect on noradrenaline- ( $pEC_{50}$   $6.21 \pm 0.18$  and  $6.23 \pm 0.15$  for control and 6-ND respectively;  $n = 4/8$ ,  $p = 0.4798$ ; Fig. 4B) and adrenaline-induced contractions ( $pEC_{50}$   $6.67 \pm 0.17$  and  $6.50 \pm 0.15$  for control and 6-ND respectively;  $n = 3/6$ ,  $p = 0.2230$ ; Fig. 4C). In L-NAME pre-treated aortic rings, the EFS (8 and 16 Hz)-induced contractions were

significantly inhibited by pre-incubation (30 min) with 6-ND (1  $\mu$ M;  $11.23 \pm 1.40$  and  $6.64 \pm 0.99$  mN for 8 Hz and  $12.90 \pm 1.27$  and  $7.47 \pm 1.13$  mN for 16 Hz for control and 6-ND, respectively;  $n = 4/8$ ; Fig. 4D).

### 3.5. Effect of prazosin on the contractions induced by dopamine, noradrenaline, and adrenaline in *Pantherophis guttatus* aortic rings

In endothelium-intact aortic rings pre-treated with L-NAME, prior incubation (30 min) with the selective  $\alpha_1$ -adrenergic antagonist prazosin (10, 30 and 100 nM) produced significant concentration-dependent rightward shifts of the concentration-response curves to dopamine ( $pA_2$   $8.66 \pm 0.31$ ,  $n = 3/5$ ,  $p = 0.0019$ ; Fig. 5A), noradrenaline ( $pA_2$   $8.65 \pm 0.24$ ,  $n = 3/6$ ;  $p = 0.0001$ ; Fig. 5B) and adrenaline ( $pA_2$   $8.69 \pm 0.23$ ,  $n = 4/7$ ,  $p = 0.0003$ ; Fig. 5C).



### 3.6. EFS-induced contractions of *Pantherophis guttatus* aortic rings: effects of pre-incubation with L-NAME and ODQ

Electric-field stimulation (EFS) at 8 Hz and 16 Hz caused frequency-dependent contractions of the *Pantherophis guttatus* aortic rings. Pre-treatment with L-NAME (100  $\mu$ M; 30 min) significantly augmented the EFS-induced aortic contractions ( $6.28 \pm 0.71$  and  $9.41 \pm 0.79$  mN for 8 Hz; and  $7.83 \pm 0.79$  and  $11.08 \pm 0.82$  16 Hz;  $p < 0.05$ ; for control and L-NAME, respectively;  $n = 4/7$ ; Fig. 6A). Pre-treatment with ODQ (100  $\mu$ M; 30 min) also significantly increased the EFS-induced aortic contractions ( $5.13 \pm 0.44$  and  $6.83 \pm 0.49$  mN for 8 Hz; and  $6.63 \pm 0.42$  and  $8.16 \pm 0.55$  mN for 16 Hz; for control and ODQ, respectively;  $p < 0.05$ ;  $n = 4/7$ ; Fig. 6B). It is interesting that the increase caused by L-NAME was significantly ( $p < 0.05$ ) higher ( $3.31 \pm 0.74$  mN) than that caused by ODQ pre-treatment ( $1.67 \pm 0.50$  mN).

### 3.7. Immunohistochemistry

Immunoreactivity for both S-100 protein and calretinin were consistently negative in *Pantherophis guttatus* aorta samples ( $n = 3$ ; Fig. 7A and B). As positive controls, immunoreactivity for both S-100 protein and calretinin was detected in sections of central nervous system of *Pantherophis guttatus* (Fig. 7C and D), human pilocytic astrocytoma (Fig. 7E) and human myenteric ganglia/nerve fibers (Fig. 7F).

## 4. Discussion

Our results clearly indicate that 6-ND is the major catecholamine released by endothelium of *Pantherophis guttatus* aortic rings. Incubation with L-NAME and mechanical endothelium removal substantially reduced the 6-ND release (73 %–77 %) in a similar way to human umbilical vessels (75 %–90 %; Britto-Júnior et al., 2021a) and *Chelonoidis carbonarius* aorta (55 %–65 %; Campos et al., 2021; Britto-Júnior et al., 2022). However, L-NAME and endothelium removal did not abolish the 6-ND release, suggesting an extra-endothelium source for 6-ND synthesis/release. This secondary source of 6-ND is not composed of nerve terminals since human umbilical cord vessels (Reilly and Russell, 1997; Britto-Júnior et al., 2020), *Chelonoidis carbonarius* aorta (Campos et al., 2020) and *Pantherophis guttatus* aorta do not contain nerve terminals, as demonstrated here by the absence of immunoreactivity for the neuronal markers S-100 (Bao et al., 2011) and calretinin (Morona et al., 2011).

The finding that both 6-ND and L-741,626 (selective dopamine D<sub>2</sub>-receptor antagonist) are potent vasodilators in *Pantherophis guttatus* aortic rings independent of NO release, but sensitive to endothelium removal, further supports the concept of endothelium-derived dopamine as one of the major modulators of vascular reactivity (Britto-Júnior et al., 2020). Although there is no evidence yet that dopamine receptors are expressed in *Pantherophis guttatus* aorta, dopaminergic receptors in mammalian vascular beds have been characterized *in vitro* by radioligand-receptor binding and autoradiographic techniques. The localization of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors have been demonstrated in the smooth muscle of rat cerebral, mesenteric and renal arteries (Amenta et al., 1990). Oral administration of the non-ergot selective dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist pramipexole (Schneider and Mierau, 1987) to healthy male volunteers caused significant increases in both blood pressure and heart rate (Farha et al., 2014). As observed in both human umbilical arteries and vein, 6-ND act as a very potent and highly selective dopamine D<sub>2</sub>-like receptor antagonist (Britto-Júnior et al., 2021a) since in contrast to other alpha-adrenergic antagonists such as prazosin (Bogoso et al., 1988) and phentolamine (Owens et al., 1989), 6-ND only blocks dopamine-induced vasoconstriction.

The significant reduction of EFS-induced contractions by 6-ND confirms that endothelium-derived dopamine is a major mediator responsible for the contraction. Thus, the balance between dopamine and 6-ND constitutes an important mechanism for the control of local blood flow. Another important finding is that the increase in EFS-induced

contractions caused by L-NAME is significantly higher than that caused by ODQ (Schrammel et al., 1996). The vasodilation caused by NO is supposed to be due to stimulation of soluble guanylate cyclase (Arnold et al., 1977) and increase in cGMP production (Murad et al., 1986). This increased potentiation of EFS-induced contractions caused by L-NAME indicates that inhibition of 6-ND synthesis/release rather than inhibition of soluble guanylate cyclase constitutes the major mechanism by which NO causes vascular smooth muscle relaxation. This novel concept is further supported by the evidence that ODQ administration to rats affected neither mean arterial blood pressure nor heart rate, although *ex-vivo* inhibition of soluble guanylate cyclase was confirmed (Cechova and Pajewski, 2004).

In summary, our data show that 6-ND is the major catecholamine released by endothelium of *Pantherophis guttatus* aortic rings and exerts potent vasorelaxant activity by acting as a selective dopamine D<sub>2</sub>-like receptor antagonist. Synthesis of 6-ND by the endothelium could be the major mechanism by which NO controls vascular smooth muscle reactivity.

## Declaration of competing interest

The authors declare no competing or financial interests.

## Data availability

No data was used for the research described in the article.

## Acknowledgment

ATL thanks FAPESP for PhD fellowship (2021/13593-6). JJB thanks CAPES for PhD fellowship (001). VBS thanks FAPESP for post-doctoral fellowship (2021/13726-6). RC thanks CAPES for post-doctoral fellowship (88887.358153/2019-00). EA thanks FAPESP (2017/15175-1). GDN thanks FAPESP (2019/16805-4) and CNPq (303839/2019-8).

## References

- Amenta, F., Collier, W.L., Ricci, A., 1990. Autoradiographic localization of vascular dopamine receptors. *Am. J. Hypertens.* 3 (6 Pt 2), 34S–36S. <https://doi.org/10.1093/ajh/3.6.34S>. PMID: 2200435.
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., Murad, F., 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (8), 3203–3207. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3203>.
- Arunlakshana, O., Schild, H.O., 1959. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 14 (1), 48–58. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1959.tb00928.x>.
- Awad, M., Czer, L.S., Hou, M., Golshani, S.S., Goltche, M., De Robertis, M., Kittleson, M., Patel, J., Azarbal, B., Kransdorf, E., Esmailian, F., Trento, A., Kobashigawa, J.A., 2016. Early denervation and later reinnervation of the heart following cardiac transplantation: a review. *J. Am. Heart Assoc.* 5 (5), e004070 <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004070>, 11.
- Bao, H.J., Liu, Y., Qin, J.H., Xu, C.S., Hei, N.N., Jaber, J.R., Chen, Q.S., 2011. An immunohistochemical study of S-100 protein in the intestinal tract of chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Res. Vet. Sci.* 91, e16–e24. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.015>.
- Bogoso, K.P., Arnt, J., Boeck, V., Christensen, A.V., Hyttel, J., Jensen, K.G., 1988. Antihypertensive activity in a series of 1-piperazino-3-phenylindans with potent 5-HT<sub>2</sub>-antagonistic activity, 1988 Dec. *J. Med. Chem.* 31 (12), 2247–2256. <https://doi.org/10.1021/jm00120a003>. PMID: 2903929.
- Bowery, B.J., Razaque, Z., Emms, F., Patel, S., Freedman, S., Bristow, L., Kulagowski, J., Seabrook, G.R., 1996. Antagonism of the effects of (+)-PD 128907 on midbrain dopamine neurons in rat brain slices by a selective D<sub>2</sub> receptor antagonist L-741,626. *Br. J. Pharmacol.* 119 (7), 1491–1497. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb16063.x>.
- Britto-Júnior, J., Campos, R., Peixoto, M., Lima, A.T., Jacintho, F.F., Mônica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2022. 6-nitrodopamine acts as an endogenous selective dopamine receptor antagonist in *Chelonoidis carbonarius* aorta. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 1532–0456. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109403>.
- Britto-Júnior, J., Coelho-Silva, W.C., Murari, G.F., Serpellone Nash, C.E., Mônica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., Murari, G.F., 2021a. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci.* 276, 119425 <https://doi.org/10.1016/j.lifs.2021.119425>. PMID: 33781827.

- Britto-Júnior, J., Pinheiro, D.H.A., Justo, A.F.O., Figueiredo Murari, G.M., Campos, R., Mariano, F.V., de Souza, V.B., Schenka, A.A., Mônica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2020. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacol. Res. Perspect.* 8 (4), e00612 <https://doi.org/10.1002/prp2.612>.
- Britto-Júnior, J., Ximenes, L., Ribeiro, A., Pregonesi, A., Campos, R., Kiguti, L., Mônica, F. Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2021b. 6-nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 15 (911), 174544 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174544>. Indicar a letra para 2021.
- Campos, R., Jacintho, F.F., Britto-Júnior, J., Mônica, F.Z., Justo, A.F.O., Pupo, A.S., Moreno, R.A., Souza, V.B., Schenka, A.A., Antunes, E., De Nucci, G., 2020. Endothelium modulates electrical field stimulation-induced contractions of chelonoidis carbonaria aortic rings. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 233, 108763 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108763>.
- Campos, R., Justo, A.F.O., Mônica, F.Z., Cogo, J.C., Moreno, R.A., de Souza, V.B., Schenka, A.A., De Nucci, G., 2018b. Electrical field-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae are caused by endothelium-derived catecholamine. *PLoS One* 10 (13), e0203573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573>.
- Campos, R., Mônica, F.Z., Justo, A.F.O., Cogo, J.C., Oliveira, E.T., Moreno, R.A., Antunes, E., De Nucci, G., 2018. Electrical field stimulation-induced contractions on *Pantherophis guttatus* corpora cavernosa and aortae. *PLoS One* 13 (4), e0196123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196123>. PMID: 29672643; PMCID: PMC5908133.
- Campos, R., Pinheiro, D.H.A., Britto-Júnior, J., Castro, H.A., Mendes, G.D., Moraes, M.O., Moraes, M.E.A., Lopes-Martins, R.A.B., Antunes, N.J., De Nucci, G., 2021. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from chelonoidis carbonaria aortae in vitro. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 22 (1173), 122668 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122668>.
- Cechova, S., Pajewski, T.N., 2004. The soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, dose-dependently reduces the threshold for isoflurane anesthesia in rats. *Anesth. Analg.* 99 (3), 752–757. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000132695.77191.F3>.
- Farha, K., Baljé-Volkers, C., Tamminga, W., Den Daas, I., Van Os, S., 2014. Dopamine D2R agonist-induced cardiovascular effects in healthy male subjects: potential implications in clinical settings. *ISRN Neurol.* 22 (2014), 956353 <https://doi.org/10.1155/2014/956353>.
- Filogonio, R., Sartori, M.R., Morgensen, S., Tavares, D., Campos, R., Abe, A.S., Taylor, E. W., Rodrigues, G.J., De Nucci, G., Simonsen, U., Leite, C.A.C., Wang, T., 2020. Cholinergic regulation along the pulmonary arterial tree of the south american rattlesnake: vascular reactivity, muscarinic receptors, and vagal innervation. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 1 (319), 2. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00310.2019>. R156–R170.
- Gould, L., Reddy, C.V., 1976. Phentolamine. *Am. Heart J.* 92 (3), 397–402. [https://doi.org/10.1016/s0002-8703\(76\)80121-4](https://doi.org/10.1016/s0002-8703(76)80121-4).
- Lillywhite, H.B., Albert, J.S., Sheehy, C.M., Seymour, R.S., 2012. Gravity and the evolution of cardiopulmonary morphology in snakes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 161 (2), 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.10.029>.
- Lillywhite, H.B., 1988. Snakes, blood circulation and gravity. *Sci. Am.* 259 (6), 92–99.
- Morona, R., López, J.M., González, A., 2011. Localization of calbindin-d28k and calretinin in the brain of *dermophis mexicanus* (amphibia: gymnophiona) and its bearing on the interpretation of newly recognized neuroanatomical regions. *Brain Behav. Evol.* 77 (4), 231–269. <https://doi.org/10.1159/000329521>.
- Narahashi, T., Moore, J.W., Poston, R.N., 1967. Tetrodotoxin derivatives: chemical structure and blockage of nerve membrane conductance. *Science* 19 (156), 3777. <https://doi.org/10.1126/science.156.3777.976>.
- Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D., Mayer, B., 1996. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 50 (1), 1–5.
- Reilly, F.D., Russell, P.T., 1997. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anat. Rec.* 188 (3), 277–286. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880302>.
- Schneider, C.S., Mierau, J., 1987. Dopamine autoreceptor agonists: resolution and pharmacological activity of 2,6-diaminotetrahydrobenzothiazole and an aminothiazole analogue of apomorphine. *J. Med. Chem.* 30 (3), 494–498. <https://doi.org/10.1021/jm00386a009>.
- Mônica, F.Z., Rojas-Moscote, J., Porto, M., Schenka, A.A., Antunes, E., Cogo, J.C., De Nucci, G., 2012. Immunohistochemical and functional characterization of nitric oxide signaling pathway in isolated aorta from *Crotalus durissus terrificus*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 155 (3), 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.11.003>.
- Murad, F., Waldman, S.A., Fiscus, R.R., Rapoport, R.M., 1986. Regulation of cyclic GMP synthesis and the interactions with calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8 (S8) <https://doi.org/10.1097/00005344-198600088-00012>. S57–60.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H., 2020. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 14 (18), e3000410 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>, 7.
- Owens, M.J., Morgan, W.N., Plott, S.J., Nemeroff, C.B., 1989. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites, 1997 Dec. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283 (3), 1305–1322. PMID: 9400006.
- Quigg, R.J., Rocco, M.B., Gauthier, D.F., Creager, M.A., Hartley, L.H., Colucci, W.S., 1989. Mechanism of the attenuated peak heart rate response to exercise after orthotopic cardiac transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 14 (2), 338–344. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90183-6](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90183-6).
- United States Food and Drug Administration (FDA), 2001. Bioanalytical Method Validation Guidelines.

## 5. DISCUSSÃO

Conforme os resultados do presente estudo, podemos afirmar que a nitrodopamina é a principal catecolamina liberada pelo endotélio arterial aórtico da serpente *Pantherophis guttatus*. Por meio do pré-tratamento realizado em banho de órgãos com L-NAME e após a remoção mecânica do endotélio arterial, apresentou como resultado uma redução da liberação de 6-ND. A redução encontrada foi de 73%–77%. Comparando com a literatura, encontramos um achado semelhante em um estudo realizado por Britto-Júnior, utilizando experimentos com vasos de cordão umbilical humano<sup>33</sup> o referido estudo teve como resultado uma redução da 75%–90% da liberação de 6-ND<sup>33-35</sup>; outro resultado semelhante foi encontrado pelo mesmo pesquisador, que utilizou novo experimento com aorta de *Chelonoidis carbonarius*, onde foi encontrada uma redução de 55%–65% na liberação de 6 nitrodopamina<sup>35</sup>. Entretanto, a remoção do endotélio e o tratamento com L-NAME não aboliram a liberação completa da liberação da 6-ND. Deste modo, podemos sugerir a hipótese que existe uma fonte extra endotelial para a síntese de 6-ND. A hipótese levantada não é composta por terminais nervosos desde os vasos do cordão umbilical humano; a afirmação também é evidenciada por outro experimento com aorta de *Chelonoidis carbonarius*<sup>34</sup>, esses estudos evidenciam que os vasos investigados não liberam a 6-ND.

O presente trabalho encontrou um resultado semelhante após a utilização do método imuno-histoquímica realizado com os anéis aórticos de *Pantherophis guttatus*, tendo como resultado que o vaso estudado não contém terminais nervosos, como demonstrado, aqui, pela ausência de imunorreatividade para os marcadores neuronais S-100 e Calretinina, este método foi descrito por Bao et al., 2011; e também por Morona et al., 2011<sup>37, 38</sup>. Evidenciamos, também, como resultado, a observação tanto o 6-ND quanto o L-741.626 (conhecido como antagonista seletivo do receptor D2 da dopamina)<sup>38</sup>, não são potentes vasodilatadores em aorta de *Pantherophis G.*, sua atuação independe da liberação de NO, mas suas ações foram sensíveis à remoção do endotélio. Estes achados sustentam a hipótese que a dopamina, derivada do endotélio, é um dos principais moduladores da reatividade vascular (Britto-Júnior et al., 2020)<sup>39, 40</sup>. Em revisão literária, não encontramos evidências de que os receptores de dopamina fossem encontrados nos vasos arteriais de *Pantherophis guttatus*; entretanto, há relatos que os receptores

dopaminérgicos existem em leitos vasculares de mamíferos, os receptores D1 e D2 têm sido caracterizados *in vitro* por ligação radioligante-receptor e técnicas autorradiográficas<sup>41</sup>. Sua localização foi descrita e demonstrada em músculo liso das artérias cerebrais, mesentéricas e renais de ratos<sup>40</sup>. A administração oral do agonista do receptor de dopamina D2 seletivo não para pramipexol em voluntários do sexo masculino sem comorbidades conhecidas causou aumentos relevante na pressão arterial e na frequência cardíaca<sup>41,42</sup>. Como observado por Britto-Junior, em 2021, em experimentação com veias e artérias de cordões umbilicais humanos, a 6-nitrodopamina seria um potente e seletivo antagonista do receptor D2 dopaminérgico<sup>39</sup> uma vez que, em contraste com outros antagonistas alfa-adrenérgicos, como a Prazosina e a Fentolamina, o 6-ND bloqueou apenas a vasoconstrição induzida pela dopamina<sup>42,43</sup>.

Encontramos uma redução significativa das contrações induzidas pela EFS pelo 6-ND, confirmando que a dopamina derivada do endotélio é um dos principais mediadores responsáveis pela contração. Deste modo, o equilíbrio entre dopamina e 6-ND constitui um mecanismo para o controle do fluxo sanguíneo local.

As contrações causadas pelo L-NAME são significativamente maiores do que as causadas pelo ODQ<sup>44</sup>. A suposição seria a de que a vasodilatação é causada pelo óxido nítrico é ocasionada pela estimulação da guanilato ciclase solúvel e ao aumento da produção de GMPc<sup>45</sup>.

O aumento das contrações induzidas pela EFS é causado pelo tratamento com L-NAME e pela inibição da produção e liberação de 6-ND; e não é causado pela inibição da Guanilato Ciclase solúvel; constituindo, assim, o principal mecanismo pelo qual o óxido nítrico causa relaxamento vascular do músculo liso. Este novo conceito é ainda fundamentado pela evidência de que a administração de ODQ em experimentos de ratos não afetou nem a pressão arterial média nem a frequência cardíaca, embora a inibição da Guanilato Ciclase solúvel tenha sido confirmada. Em síntese, os dados encontrados em nosso experimento evidenciam que a 6-ND é a principal catecolamina liberada pelo endotélio dos anéis aórticos de *Pantherophis guttatus* exercendo, assim, uma potente atividade vasodilatadora, e atua como um antagonista seletivo do receptor D2 da dopamina. A produção de 6-ND pelo endotélio pode ser o principal mecanismo pelo qual o NO controla a reatividade do músculo liso vascular.

Conforme descrito anteriormente, a regulação pressórica em répteis ocorre, na maioria das vezes, parte devido ao controle local da resistência vascular periférica, com o presente estudo verificamos que a regulação pressórica se deve mediada por óxido nítrico, sendo este um mediador endógeno envolvido na modulação vascular da serpente estudada<sup>37</sup>.

O estudo realizado por Campos et al levantou a hipótese que a modulação dos vasos de *Pantherophis guttatus*, não seria neuronal e sim endotelial, evidenciamos no presente estudo que esta atividade de modulação endotelial esta associada ao endotélio e também a 6 nitrodopamina e a via do óxido nítrico<sup>33,37</sup>.

Conforme já citado a 6 ND demonstra um grande potencial nas atividades biológicas tais como de inibição da captação neuronal de norepinefrina; atividade da sintase do óxido nítrico; e capacidade contrátil nos adrenoreceptores vasculares; agente inotrópico positivo, com potencial superior cerca de cem vezes mais potente que a dopamina, noradrenalina, e adrenalina<sup>15</sup>.

Futuros estudos pré-clínicos serão necessários para conhecer sua farmacodinâmica sua farmacocinética, após estes termos as condições de iniciar os estudos pós clínicos. Entretanto acreditamos que a molécula tem um grande potencial para uso farmacológico, como as catecolaminas já conhecidas, e amplamente utilizadas na clinica médica, principalmente em ambientes de urgência e emergência e também nos ambientes de terapia intensiva, conforme dito com os estudos já realizados que a potencia da 6 ND é superior as catecolaminas já conhecidas, deste modo poderemos no futuro dispor de um novo fármaco com menos efeitos adversos/ colaterais, por exemplo, quando comparado as drogas já conhecidas. Também acreditamos, que ao seguir a linha de pesquisa conheceremos e evidenciaremos melhor a função endotelial. Atualmente é sabido que existe a disfunção endotelial, provocada por patologias como o Diabetes e picos pressóricos ocasionam uma serie de problemas orgânicos, entretanto não é totalmente compreendido os fatores fisiopatológicos. Deste modo podemos correlacionar a liberação de 6-Nitrodopamina pelo endotélio, e a modulação vascular da serpente estudada, seria na população humana da mesma forma? Seria um potencial fármaco de tratamento para a disfunção endotelial? Um novo hipotensor com uma molécula sintetizada organicamente? Todos são questionamentos e hipóteses que serão futuramente exploradas. Deste modo abre vários vieses para futuros estudos.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho evidenciou que a 6-ND é liberada pelo endotélio dos anéis aórticos de *Pantherophis guttatus*, esta nova catecolamina descrita causa uma potente vasodilatação e atuando como um antagonista seletivo do receptor dopaminérgico do tipo D2-like. Sua produção endotelial pode ser o principal mecanismo de controle do óxido nítrico na modulação muscular lisa vascular, ou seja, a síntese 6-ND pelo endotélio pode ser o principal mecanismo pelo qual o NO controla a reatividade do músculo liso vascular.



## 7. REFERÊNCIAS

1. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic Systems in Stress : Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev* 2009;89:535–606. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>.
2. Cannon WB, Paz D de La. Emotional Stimulation of Adrenal Secretion. *Am J Physiol* 1910;904:64–70. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1911.28.1.64>.
3. Amenta, F., Collier, W.L., Ricci, A., 1990. Autoradiographic localization of vascular dopamine receptors. *Am. J. Hypertens.* 3 (6 Pt 2), 34S–36S. <https://doi.org/10.1093/ajh/3.6.34s>. PMID: 2200435.
4. Goldstein DS. Noradrenergic Neurotransmission. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00006-8>.
5. Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *J Nutr* 2018;137:1539S-1547S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1539s>.
6. Hudecova S, Vlcek M, Lejavova K, Kvetnansky R, Vargovic P, Krizanova O, et al. Catecholamine production is differently regulated in splenic T and B-cells following stress exposure. *Immunobiology* 2012;218:780–9. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.08.279>.
7. Huang MH, Friend DS, Sunday ME, Singh K, Haley K, Austen KF, et al. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest* 1996;98:1298–303. <https://doi.org/10.1172/JCI118916>.
8. Ebert SN, Rong Q, Boe S, Pfeifer K. Catecholamine-synthesizing cells in the embryonic mouse heart. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:317–24. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.008>.
9. Ebert SN, Baden JM, Mathers LH, Siddall BJ, Wong DL. Expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in the embryonic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1653–8. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0155>.
10. Ebert SN, Thompson RP. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: Association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* 2001;88:117–24. <https://doi.org/10.1161/01.RES.88.1.117>. 62
11. Tillinger A, Novakova M, Pavlovicova M, Lacinova L, Zatovicova M, Pastorekova S, et al. Modulation by 6-hydroxydopamine of expression of the phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) gene in the rat heart during

- immobilization stress. Stress 2006;9:207–13.  
<https://doi.org/10.1080/10253890601069385>.
12. Vargovic P, Ukropec J, Laukova M, Cleary S, Manz B, Pacak K, et al. Adipocytes as a new source of catecholamine production. FEBS Lett 2011;585:2279–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.06.001>.
  13. Kvetnansky R, Ukropec J, Laukova M, Manz B, Pacak K, Vargovic P. Stress stimulates production of catecholamines in rat adipocytes. Cell Mol Neurobiol 2012;32:801–13. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9822-6>.
  14. MANNELLI, M. et al. Dopamine and sympathoadrenal activity in man. Clinical and Experimental Hypertension, v. 19, n. 1-2, p. 163-179, 1997. ISSN 1064- 1963.
  15. Tsunoda, M.; Uchino, E.; Imai, K.; Hayakawa, K.; Funatsu, T. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using highperformance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. J. Chromatogr. A 2007
  16. Britto-Júnior, J.; Coelho-Silva, W.C.; Murari, G.F.; Nachi, C.E.; Mónica, F.Z.; Antunes, E.; De Nucci, G. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. Life Sci. 2021, 276, 119425. [CrossRef] [PubMed]
  17. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium in Pharmacology Review. Br J Pharmacol 2009;157:527–36.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00240.x>.
  18. Ruviaro AR, Barbosa P de PM, Alexandre EC, Justo AFO, Antunes E, Macedo GA. Aglycone-rich extracts from citrus by-products induced endothelium-independent relaxation in isolated arteries. Biocatal Agric Biotechnol 2020;23:101481. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101481>.
  19. Furchgott RF, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373–6. [19] Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327:524–6.  
<https://doi.org/10.1038/327524a0>.
  20. De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous Behavior of the Canine Arterial and Venous Wall Importance of the Endothelium. Circ Res 1982;51:439–47.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.51.4.439>.
  21. De Mey JG, Vanhoutte PM. Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery. J Physiol 1983;335:65–74.

22. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005;144:449–58. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706042>.
23. Bharadwaj LA, Prasad K. Mechanism of superoxide anion-induced modulation of vascular tone. *Int J Angiol* 2002;11:23–9. <https://doi.org/10.1007/s00547-001-0049-5>.
24. Warner TD, Mitchell JA, De Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:S85–8. <https://doi.org/10.1097/00005344-198900135-00021>.
25. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 524-526, 1987.
26. 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.
27. 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. 90
28. 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.
29. 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.
30. Donald JA, Broughton BRS. Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves *Comp Biochemi Physiol, A* 142;188–197, 2005.
31. 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.

32. 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.
33. 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.
34. Page RDM. Extracting species trees from complex gene trees: reconciled trees and vertebrate phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 14, 89–106, 2000.
35. 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.
36. Campos, R., Justo, A.F.O., Monica, F.Z., Cogo, J.C., Moreno, R.A., de Souza, V.B., Schenka, A.A., De Nucci, G., 2018b. Electrical field-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae are caused by endothelium-derived catecholamine. *PLoS One* 10 (13), e0203573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203573>.
37. Campos, R., Monica, F.Z., Justo, A.F.O., Cogo, J.C., Oliveira, E.T., Moreno, R.A., Antunes, E., De Nucci, G., 2018. Electrical field stimulation-induced contractions on *Pantherophis guttatus corpora cavernosa* and aortae. *PLoS One* 13 (4), e0196123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196123>. PMID: 29672643; PMCID: PMC5908133.
38. Campos, R., Jacintho, F.F., Britto-Júnior, J., Monica, F.Z., Justo, A.F.O., Pupo, A.S., Moreno, R.A., Souza, V.B., Schenka, A.A., Antunes, E., De Nucci, G., 2020. Endothelium modulates electrical field stimulation-induced contractions of *Chelonoidis carbonaria* aortic rings. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 233, 108763 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108763>.
39. Reilly, F.D., Russell, P.T., 1997. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anat. Rec.* 188 (3), 277–286. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880302>.
40. Campos, R., Pinheiro, D.H.A., Britto-Júnior, J., Castro, H.A., Mendes, G.D., Moraes, M.O., Moraes, M.E.A., Lopes-Martins, R.A.B., Antunes, N.J., De Nucci, G., 2021. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-

- MS/MS for the assessment of its basal release from chelonoidis carbonaria aortae in vitro. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 22 (1173), 122668 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122668>.
41. Bao, H.J., Liu, Y., Qin, J.H., Xu, C.S., Hei, N.N., Jaber, J.R., Chen, Q.S., 2011. An immunohistochemical study of S-100 protein in the intestinal tract of chinese softshelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Res. Vet. Sci.* 91, e16–e24. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.015>.
  42. Britto-Júnior, J., Campos, R., Peixoto, M., Lima, A.T., Jacintho, F.F., Monica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2022. 6-nitrodopamine acts as an endogenous selective dopamine receptor antagonist in *Chelonoidis carbonaria* aorta. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 1532-0456. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109403>.
  43. Britto-Júnior, J., Pinheiro, D.H.A., Justo, A.F.O., Figueiredo Murari, G.M., Campos, R., Mariano, F.V., de Souza, V.B., Schenka, A.A., Monica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2020. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacol. Res. Perspect.* 8 (4), e00612 <https://doi.org/10.1002/prp2.612>.
  44. Farha, K., Balj'e-Volkers, C., Tamminga, W., Den Daas, I., Van Os, S., 2014. Dopamine D2R agonist-induced cardiovascular effects in healthy male subjects: potential implications in clinical settings. *ISRN Neurol.* 22 (2014), 956353 <https://doi.org/10.1155/2014/956353>.
  45. Owens, M.J., Morgan, W.N., Plott, S.J., Nemeroff, C.B., 1989. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites, 1997 Dec *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283 (3), 1305–1322. PMID: 9400006.
  46. Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D., Mayer, B., 1996. Characterization of 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 50 (1), 1–5.
  47. Murad, F., Waldman, S.A., Fiscus, R.R., Rapoport, R.M., 1986. Regulation of cyclic GMP synthesis and the interactions with calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8 (S8) <https://doi.org/10.1097/00005344-198600088-00012>. S57–60.
  48. Cechova, S., Pajewski, T.N., 2004. The soluble guanylyl cyclase inhibitor ODC, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, dose-dependently reduces the threshold for isoflurane anesthesia in rats. *Anesth. Analg.* 99 (3), 752–757. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000132695.77191.F3>.

## 8. ANEXOS

### 8.1 APROVAÇÃO DO CEUA

INTRANET IB

<https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/certific...>


#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Caracterização farmacológica de corpos cavernosos e anéis de aortas isolados de *Pantherophis guttatus*, registrada com o nº 5266-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto De Nucci e Felipe Fernandes Jacintho, Rafael Campos, que envolve a produção, manutenção 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, 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), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 29/05/2019.

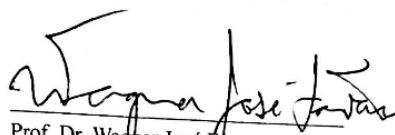
|                                                  |                                           |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Finalidade:                                      | ( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica      |
| Vigência do projeto:                             | 13/05/2019 a 24/05/2029                   |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 29/05/2019 a 24/05/2029                   |
| Espécie / linhagem/ raça:                        | Réptil** / <i>Pantherophis guttatus</i>   |
| No. de animais:                                  | 10                                        |
| Idade/Peso:                                      | 2.00 Anos / 900.00 Gramas                 |
| Sexo:                                            | 10 Machos                                 |
| Espécie / linhagem/ raça:                        | Réptil** / <i>Pantherophis guttatus</i>   |
| No. de animais:                                  | 10                                        |
| Idade/Peso:                                      | 2.00 Anos / 900.00 Gramas                 |
| Sexo:                                            | 10 Machos                                 |
| Espécie / linhagem/ raça:                        | Réptil** / <i>Pantherophis guttatus</i>   |
| No. de animais:                                  | 10                                        |
| Idade/Peso:                                      | 2.00 Anos / 900.00 Gramas                 |
| Sexo:                                            | 10 Machos                                 |
| Espécie / linhagem/ raça:                        | Réptil** / <i>Pantherophis guttatus</i>   |
| No. de animais:                                  | 10                                        |
| Idade/Peso:                                      | 2.00 Anos / 900.00 Gramas                 |
| Sexo:                                            | 10 Machos                                 |
| Origem:                                          | Parque Ecológico do Tietê (São Paulo, SP) |
| Biotério onde serão mantidos os animais:         | Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP     |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

29/05/2019 14:49

<https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/certific...>

Campinas, 29 de maio de 2019.

  
Prof. Dr. Wagner José Favaro  
Presidente

  
Rosângela dos Santos  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



CERTIFICADO CEUA nº 102/2022



Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp



CEUA/Unicamp

---

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização farmacológica de corpos cavernosos e anéis de aortas isolados de *Pantherophis guttatus***", (protocolo CEUA/UNICAMP nº **5266-1/2019**), de responsabilidade do **Prof. Dr. Gilberto De Nucci**, teve aprovada a inclusão dos novos executores: **ERIC XAVIER DOS SANTOS e GILBERTO QUIRINO DOS SANTOS JUNIOR.**

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP, aprovado em reunião do dia 29/05/2019.

Campinas, 04 de maio de 2022.

---

Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Presidente da CEUA/UNICAMP

---

Rosangela dos Santos  
Secretária Executiva CEUA/UNICAMP

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

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



---

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 06/05/2022, às 19:31 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

---

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 05/05/2022, às 14:16 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

---



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:  
[sigad.unicamp.br/verifica](http://sigad.unicamp.br/verifica), informando o código verificador:  
**C1270D71 309E42CD 9C2751C2 C0669FB2**



## 8.2 AUTORIZAÇÃO DA REVISTA

### Terms and Conditions of Sale and Purchase

These Terms and Conditions of Sale and Purchase ("Terms") set forth the terms and conditions governing the purchase of products and services from Elsevier B.V. and/or its affiliated Elsevier company Elsevier Ltd ("Elsevier") through its web site at <https://authors.elsevier.com> ("Site"). By submitting an order for such products or services, you agree to be bound by these Purchase Terms.

#### Address

Elsevier B.V. Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, registered at the Chamber of Commerce Amsterdam, nr. 33158992

#### Contract Formation

If you wish to purchase any of the products or services offered on this Site, you must submit a completed order form. You will be required to select your products, services or digital content for purchase and complete your delivery and payment details. Once these have been completed, you will have a further chance to check (and correct if necessary) these details prior to submission of your order, and you should print out this page and a copy of these Terms for your future reference.

If we accept your order, you will be sent a confirmation email giving you an order reference number ("Email Confirmation"). Once we have sent this E-mail Confirmation, you will not be able to amend or cancel your order (subject to any right to cancel as described below).

We may correct any error in any unconfirmed order, marketing literature or other document or information issued by us or placed on this Site without any liability.

#### Right to Cancel

Save as set out below, consumers in the European Union have the right to cancel the purchase until fourteen (14) days after date of delivery of the product or date the service was purchased by sending written notice of cancellation by email to the Site's customer service department. A model cancellation form is available below for your use but you are not obliged to use this method of cancellation.

This right of cancellation applies to all products and services offered on the Site except:

- (a) audio, video, and software products that have been unsealed from their packaging;
- (b) digital content not on a tangible medium (e.g. eBooks) once the item has been downloaded;
- (c) newspapers, periodicals and magazines which are not supplied under subscription contracts;
- (d) services for which performance has completed; and
- (e) offprints, colour figures, print on demand services and other products made or services provided to your specification or clearly bespoke to you.

If you cancel the purchase on this basis, we will reimburse to you all payments received from you, including the costs of delivery (except for the additional costs arising if you choose a type of delivery other than the least expensive type of standard delivery offered by us). We may make a deduction from the reimbursement for loss in value of any goods supplied, if the loss is the result of unnecessary handling by you.

#### Returns

You must return the goods without undue delay and in any event no later than 14 days from the date of notification of cancellation. We will then make the reimbursement without undue delay, and no later than-

- (a) 14 days after the day we receive back from you any goods supplied, or
- (b) (if earlier) 14 days after the day you provide evidence that you have returned the goods, or
- (c) If there were no (physical) goods supplied, 14 days after the day on which we are informed about your decision to cancel the purchase.

We will make the reimbursement using the same means of payment as you used for the initial transaction, unless you have expressly agreed otherwise; in any event, you will not incur any fees as a result of the reimbursement.

Whether these rights of cancellation apply or not, you will be responsible for and will pay the cost of returning the items to us by the same method as it was delivered. The items will be returned at your risk.

#### Prices (including taxes and delivery) and Payment

The currency and price of products and services offered on this Site shall be that quoted on the Site on the date you place your order. While we make every effort to ensure that prices quoted on the Site are accurate, if there has been an inadvertent error, the correct price will be stated in the E-mail Confirmation and you will have the opportunity to withdraw from the order at that stage if the correct price is higher than that quoted and you are not happy with that higher price.

All prices are exclusive of the cost of postage, packaging and delivery and any applicable Value Added Tax or other sales tax, which will be separately stated on the Site and/or the Email Confirmation.

#### Delivery/Performance

Where applicable, products ordered will be delivered to the shipping address stated in your order, subject to any geographical restrictions stated on the Site. However, the time and method of delivery of products or performance of services will be at our discretion, unless otherwise specified and accepted as part of the order. Time for delivery or performance shall not be of the essence.

If the items delivered to you do not include all of the items that you ordered in any particular order or include incorrect items, you must inform us in writing as soon as possible. In any event, our liability is limited to the price of the items not delivered or the cost of replacing such items.

### Consumer Protection

If you are a consumer, your statutory rights as a consumer are not affected by these Purchase Terms, and nothing in these Purchase Terms shall exclude or limit our liability arising by virtue of consumer protection legislation, or our liability for fraud or for death or personal injury caused by our negligence, or any other liability to the extent that we cannot so exclude or limit such liability as a matter of law.

### Complaints

If you have any questions, comments or complaints regarding these Purchase Terms or your order, please contact our Customer Services Department which is located at:

Author Support  
Elsevier Ltd  
The Boulevard  
Langford Lane  
Kidlington  
Oxford  
OX5 1GB  
United Kingdom

[Contact us](#) via our Support Center

<https://service.elsevier.com>

Phone: +44 1865 84 3577

### Model Cancellation Form

To: [Author Support](#)

Subject: Cancellation of order for [article\_reference].

Or, when sending this by post:

Author Support  
Elsevier Ltd  
The Boulevard, Langford Lane  
Kidlington  
Oxford  
OX5 1GB  
United Kingdom

Dear Sir, Madam,

I hereby give notice that I cancel my contract [DELETE AS APPLICABLE: [of sale of the following goods/for the supply of the following service].

Goods/Service:

Ordered on:

Received on:

Name of consumer:

Address of consumer:

Signature of consumer:

Date:

General

In the event of any inconsistency between these Terms and the Terms and Conditions of the Site, these Terms shall prevail.

Last revised: 19<sup>th</sup> January 2022

Copyright © 2022 Elsevier B.V. All rights reserved. [Privacy Policy Terms & Conditions](#)  
[Help](#)