

## CARACTERIZAÇÃO FARMACODINÂMICA DE RECEPTORES DE 6-NITRODOPAMINA EM ARTÉRIAS E VEIAS UMBILICAIS HUMANAS

**Palavras-chave:** Endotélio; Fenoldopam; Haloperidol; Artéria umbilical humana; Veia umbilical humana; Óxido nítrico; Nitrocatecolaminas; Sumanriole.

Guilherme Machado de F. Murari – Departamento de Farmacologia - FCM - UNICAMP  
Gilberto De Nucci – Departamento de Farmacologia - FCM - UNICAMP

### OBJETIVOS



Determinar a função fisiológica da **6-nitrodopamina** no controle vascular



Quantificar a liberação **endotelial** in vitro de **6-nitrodopamina** e correlacionar com os níveis de **dopamina**



Caracterizar farmacologicamente os **receptores de 6-nitrodopamina** presentes em vasos sanguíneos de **cordão umbilical humano**



Buscar possíveis **alvos terapêuticos** a partir dos resultados **in vitro**

### INTRODUÇÃO

Os vasos sanguíneos apresentam uma monocamada celular que reveste seu interior chamada de **endotélio**.<sup>1</sup>

O endotélio apresenta função essencial na **regulação do tônus vascular** dos vasos sanguíneos pela liberação de agentes **vasodilatadores**, como óxido nítrico e prostanoídes e agentes **vasoconstritores**, como endotelina e angiotensina.<sup>2, 3,4,5</sup>

O endotélio dos vasos sanguíneos do cordão umbilical humano também é capaz de produzir e liberar **dopamina** (HUCV), conforme detectado anteriormente por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)<sup>6</sup>. A liberação de **outras catecolaminas** (noradrenalina e adrenalina) também foi detectada pelo endotélio da aorta de jabuti (*Chelonoides carbonaria*)<sup>7</sup>.

A **estimulação por campo elétrico** (do inglês, Electrical field stimulation - EFS) consiste em aplicar um campo elétrico uniformemente a um tecido isolado em um pequeno pulso de ondas curtas para induzir a **liberação de mediadores**<sup>8</sup>. A dopamina modula a reatividade vascular de artérias umbilicais humanas (HUA) e veias umbilicais humanas (HUV), já que antagonistas D<sub>2</sub>-like como o Haloperidol inibem as contrações induzidas por EFS<sup>6</sup>.

Nitrocatecolaminas são compostos produzidos a partir da nitração de catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina). A **6-nitrodopamina** (6-ND) é um **novo mediador vascular** que pode ser produzido pela nitração da dopamina induzida por óxido nítrico (NO)<sup>9</sup>. Além disso, a liberação basal de 6-ND já foi detectada em aorta de *C. carbonaria*<sup>7</sup>.

Uma vez que o endotélio de HUCV produz NO e dopamina, neste estudo investigamos a possibilidade de HUCV produzir e liberar 6-ND, assim como, buscamos **caracterizar a ação farmacodinâmica** desse mediador em HUA e HUV.

## MÉTODOS

**População:** gestantes saudáveis com idade entre 18-60 anos submetidas a parto vaginal ou cesariana na Santa Casa de Vinhedo (Vinhedo-SP) e Maternidade de Campinas (Campinas-SP). **TCLE** obtido conforme protocolo aprovado - **CAAE** 06379418.0.0000.5467.

**Banho de tecido isolado:** resumidamente, os anéis (3 mm) de HUA e HUV foram suspensos verticalmente entre dois ganchos de metal em banhos de órgãos de 10 mL contendo KHS, gaseificada continuamente com uma mistura de 95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub> (pH 7,4) 37° C.

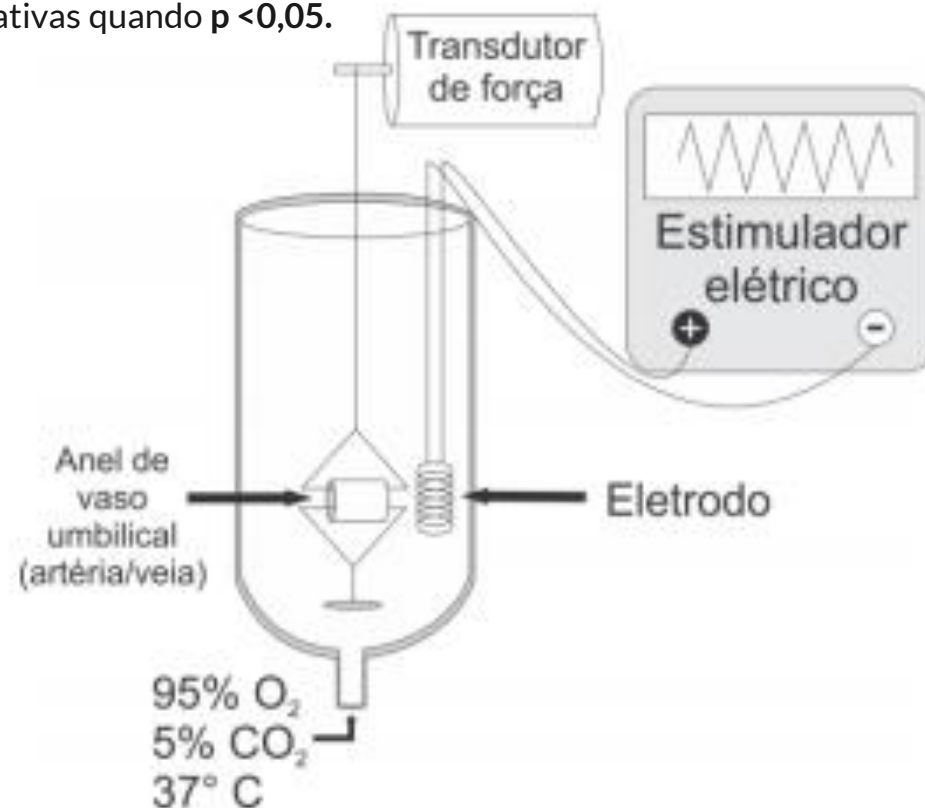
Os tecidos passaram por um período de estabilização de 90 min sob uma tensão de repouso de 10 mN, e a tensão isométrica foi registrada usando um sistema PowerLab (ADInstruments, Sydney, Austrália). Após esse período, os anéis foram pré-contraídos com 5-hidroxitriptamina (5-HT, 1 μM). A integridade do endotélio em ambos HUA e HUV foi avaliada através do relaxamento induzido por ATP (10 μM)<sup>6</sup>.

Curvas de resposta de concentração cumulativa para 6-ND foram realizadas em anéis HUA e HUV intactos com endotélio, na ausência e na presença de L-NAME (100 μM, 30 min) ou o inibidor do sítio-heme da guanilil ciclase solúvel, 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 100 μM, 30 min).

**Ensaio com EFS:** resumidamente anéis HUA e HUV pré-tratados com L-NAME (100 μM, por 30 min) na ausência ou presença de 6-ND (10 μM, por 30 min) foram submetidos a EFS a 60 V por 30 s, a 8-16 Hz em pulsos de onda quadrada, largura de pulso de 0,3 ms e atraso de 0,1 ms, usando um estimulador Grass Estimulador S88 (Astro-Medical, Industrial Park, RI, EUA).

**Estatística:** Todos os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (SEM) de n experimentos. Todos os dados foram analisados através do GraphPad Prism 6.0.. O número de experimentos foi expresso em x/y, onde x representa o número de vasos umbilicais e y o número de anéis empregados nos experimentos.

Para todas as análises, as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



**Figura 1:** representação esquemática de banho de tecido isolado com eletrodos para ensaios de estímulo por campo elétrico (EFS)

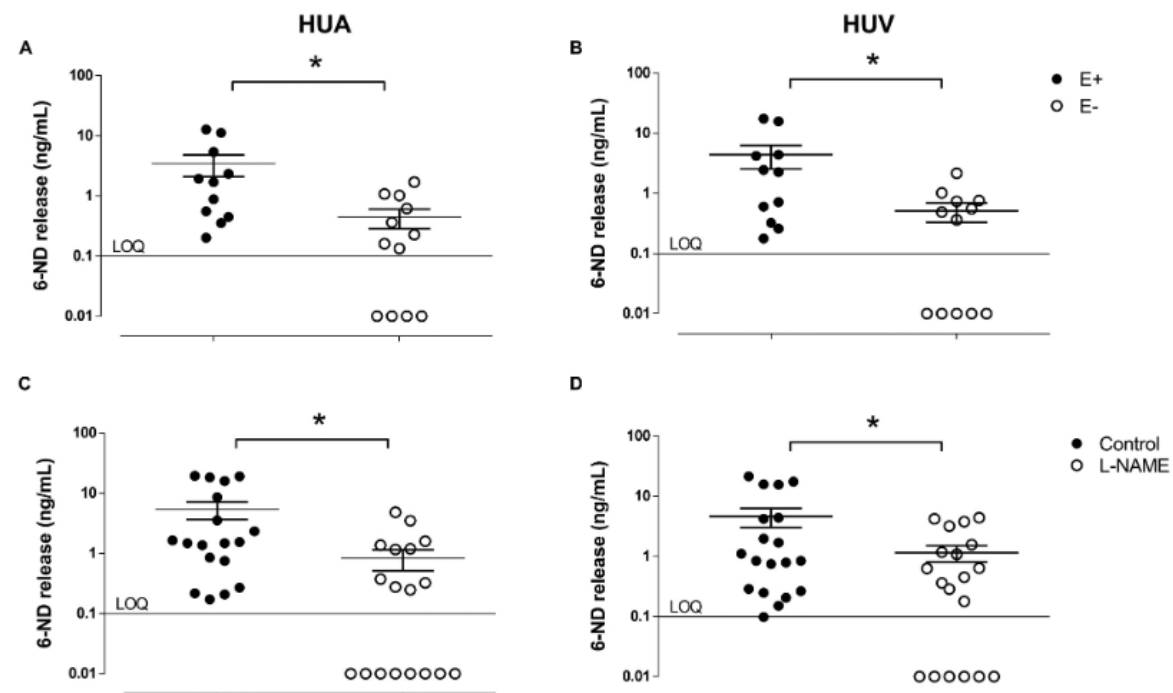
## MÉTODOS

**LC-MS/MS:** foi usada para identificar a liberação de 6-nitrodopamina (6-ND) de anéis de vasos umbilicais humanas (HUCV). Os anéis foram incubados em solução de Krebs-Henseleit (KHS: NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; glicose 5,6 mM) contendo 3 mM de ácido ascórbico e continuamente gaseificados com uma mistura de 95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub> (pH 7,4) a 37° C por 30 min. Para cada espécime, dois anéis de artéria umbilical humana (HUA) e de veia umbilical humana (HUV) com o endotélio intacto e dois anéis de HUA e dois anéis de HUV sem endotélio (cada um medindo 15 mm) foram incubados na presença e na ausência de do inibidor de síntese de NO, N $\omega$ -Nitro-L-arginina (L-NAME, 100  $\mu$ M). Em seguida, uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo e armazenado em -20 °C.

A separação de 6-ND foi realizada em um Shim-pack 150 mm  $\times$  3,0 mm com coluna GIST-HP C18, tamanho de partícula de 3  $\mu$ m (Shimadzu, Duisburg, Alemanha) mantida a 65° C. Uma fase móvel A de 75% consistindo em água desionizada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e uma fase móvel B de 25% consistindo de acetonitrila/água desionizada (90/10, v/v) mais 0,1% de ácido fórmico a um fluxo de 350  $\mu$ L/min em um modo isocrático foram empregadas.

A detecção de 6-ND e do padrão interno (6-ND e 6-nitrodopamina-d4 foram compradas de Toronto Research Chemical – Ontario, Canada) foi realizada por um espectrômetro de massa LCMS-8060 triplo-quadrupolo (MS/MS) (Shimadzu, Kyoto, Japão), operando em modo de ionização positiva. As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). Os íons protonados [M+ H]<sup>+</sup> e seus respectivos produtos de íons foram monitorados em 199,10 > 181,95 para 6-ND e 203,10 > 186,00 para 6-ND-d4.

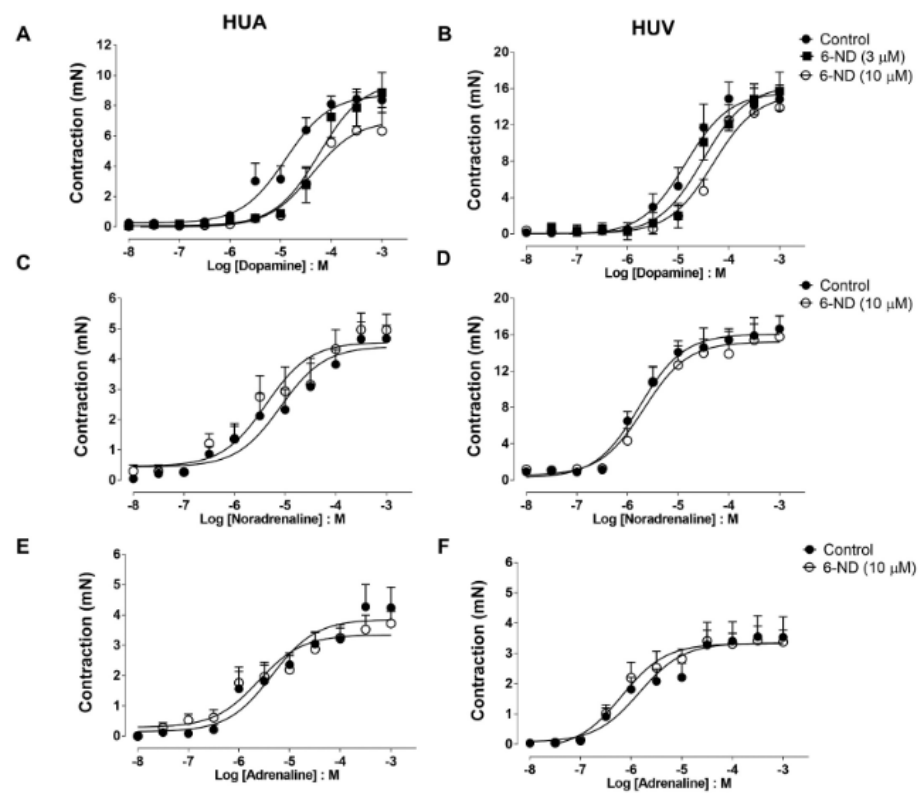
## RESULTADOS



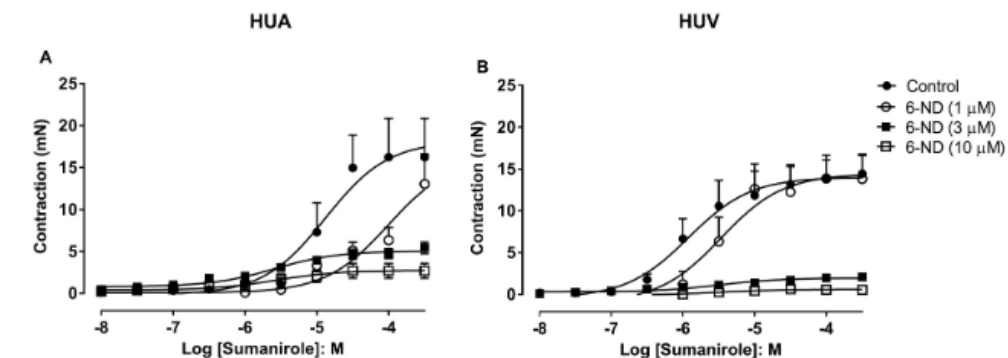
**Figura 2:** liberação basal de 6-ND em veias e artérias umbilicais. A liberação basal de 6-ND é reduzida pela incubação com L-NAME (100  $\mu$ M) e pela remoção do endotélio ( $p < 0.05$ ).

### LC-MS/MS: calibração e limite de quantificação

A curva de calibração de 6-ND foi linear para concentrações de 0,1–10 ng/mL, com um coeficiente de correlação superior a 0,99 (dados não mostrados). O limite de quantificação foi de 0,1 ng/mL; a precisão (expresso como %) para as execuções intra-lote ( $n = 7$ ) e inter-lote ( $n = 21$ ) foram 103,7 e 103,67, respectivamente e a precisão (expressa como % CV) para as execuções intra-lote ( $n = 7$ ) e inter-lote ( $n = 21$ ) foram 12,7 e 14,9, respectivamente – **Figura 2**.



**Figura 3:** curvas concentração-resposta (10nM – 1 mM) a catecolaminas na presença de L-NAME (100 μM) em anéis de HUCV (n=5/8 para cada painel).



**Figura 4:** deslocamento para a direita provocado pela 6-ND nas contrações induzidas por Sumanriole, agonista D2 pleno, em HUA (n=4/8) e HUV (n=4/8).

### Efeito da 6-ND nas contrações induzidas por dopamina, noradrenalina e adrenalina

A adição de 6-ND (0,001–300 μM) sozinha não contraiu os anéis de HUA (n = 5/10) nem de HUV (n = 5/10) na ausência ou presença de L-NAME ou ODQ (dados não mostrados). No entanto, em vasos pré-tratados com L-NAME, 6-ND (10 μM, 30 min) produziu um deslocamento significativo para a direita das curvas de concentração-resposta para dopamina em ambos HUA ( $pEC_{50}$   $4,9 \pm 0,1$ ,  $4,4 \pm 0,2$  e  $4,2 \pm 0,1$ ; n = 5/8) e HUV ( $pEC_{50}$   $4,9 \pm 0,10$ ,  $4,4 \pm 0,2$  e  $4,2 \pm 0,1$ ; n = 5/8), para o controle 3 e 10 μM 6-ND, respectivamente (Fig. 3A, B). Os valores de  $p_{A2}$  para 6-ND foram  $5,96 \pm 0,24$  e  $5,72 \pm 0,13$  para HUA (n = 5/8) e HUV (n = 5/8), respectivamente.

Ao contrário da dopamina, a 6-ND (10 μM, 30 min) não teve efeito nas contrações induzidas por noradrenalina em HUA ( $pEC_{50}$   $5,1 \pm 0,2$  e  $5,37 \pm 0,2$ ;  $E_{max}$   $4,6 \pm 0,4$  e  $4,9 \pm 0,5$  mN para controle e 6-ND respectivamente; n = 4/7) ou HUV ( $pEC_{50}$   $5,75 \pm 0,1$  e  $5,70 \pm 0,2$ ;  $E_{max}$   $16,6 \pm 1,4$  e  $15,8 \pm 2,3$  mN; para controle e 6-ND respectivamente, n = 4/7; Fig. 3C, D).

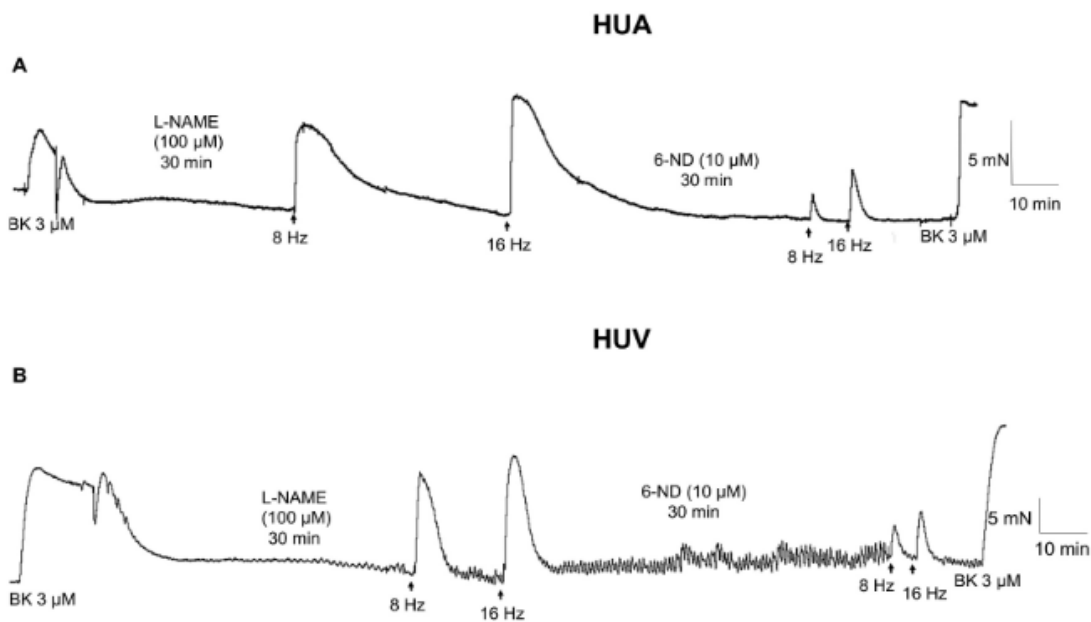
As contrações induzidas pela adrenalina também não foram afetadas por 6-ND (10 μM) em HUA ( $pEC_{50}$   $5,35 \pm 0,23$  e  $5,62 \pm 0,23$ ;  $E_{max}$   $4,2 \pm 0,7$  e  $3,7 \pm 0,4$  mN para controle e 6-ND respectivamente; n = 4/7) ou HUV ( $pEC_{50}$   $5,83 \pm 0,22$  e  $6,18 \pm 0,17$ ;  $E_{max}$   $3,5 \pm 0,7$  e  $3,4 \pm 0,4$  mN para controle e 6-ND respectivamente, n = 4/7; Fig. 3E, F).

### Efeito da 6-ND nas contrações induzidas por Sumanriole

O Sumanriole, agonista seletivo do receptor D2, causou uma contração concentração-dependente de HUA (Fig. 4A) e HUV (Fig. 4B) pré-tratados com L-NAME.

Na preparação de HUA, a pré-incubação com 6-ND a 1 μM causou um deslocamento para a direita da curva de concentração-resposta do sumanriole, enquanto que a 3 e 10 μM, 6-ND reduziu significativamente as contrações ( $E_{max}$   $16,2 \pm 2,1$ ,  $13,0 \pm 3,6$ ,  $3,4 \pm 0,7$  e  $2,7 \pm 0,8$  mN; n = 4/8) para o controle 1, 3 e 10 μM 6-ND, respectivamente (Fig. 4A). Resultados semelhantes foram observados em preparações de HUV (Fig. 4B), onde 6-ND produziu um desvio para a direita na concentração mais baixa (1 μM) e quase aboliu as contrações em 3 e 10 μM ( $E_{max}$   $14,4 \pm 2,3$ ,  $13,8 \pm 2,7$ ,  $2,1 \pm 0,1$  e  $0,5 \pm 0,4$  mN; n = 4/8; para o controle 1, 3 e 10 μM 6-ND).





**Figura 5:** traçado representativo demonstrando uma redução significativa ( $p < 0.05$ ) das contrações induzidas por EFS tanto em HUA como em HUV pela incubação com  $10 \mu\text{M}$  de 6-ND ( $n=5/8$  para cada painel).

A pré-incubação com 6-ND ( $10 \mu\text{M}$ , 30 min) reduziu significativamente as contrações induzidas por EFS em HUA ( $4,8 \pm 0,8$  e  $1,8 \pm 0,5$  mN para 8 Hz e  $4,7 \pm 0,8$  e  $2,7 \pm 0,8$  mN para 16 Hz;  $p < 0,05$ ;  $n = 5/8$ ; para vasos de controle e pré-tratados com 6-ND, respectivamente) assim como em HUV ( $10,6 \pm 1,8$  e  $3,8 \pm 0,8$  mN para 8 Hz e  $12,1 \pm 1,9$  e  $5,8 \pm 0,9$  mN para 16 Hz;  $p < 0,05$ ;  $n = 5/8$ ; para vasos de controle e pré-tratados com 6-ND, respectivamente; **Figura 5**).

## CONCLUSÕES

Demonstrou-se pela **primeira vez em tecido humano a liberação endotelial de 6-nitrodopamina**, um novo mediador vascular que atua **antagonizando receptores dopaminérgicos D2**.

Além disso, a liberação endotelial de 6-nitrodopamina é um novo mecanismo pelo qual o **NO pode modular a reatividade vascular independente da produção de cGMP**.

## PONTOS CHAVE

- 1** A 6-nitrodopamina é liberada pelo endotélio de HUCV
- 2** Em HUA e HUV a 6-ND atua como um antagonista seletivo D2 da dopamina
- 3** A liberação de 6-ND pode ser um novo mecanismo pelo qual o NO modula a reatividade vascular independente da produção de cGMP
- 4** A 6-ND sozinha não contrai HUA ou HUV mesmo na presença de L-NAME

## BIBLIOGRAFIA

1. Bernauer, W., Meyer, P., Zimmerli, W., Daicker, B., & Ruettimann, S. (1992). Failure to control AIDS-related CMV-retinitis with intravenous ganciclovir. *International ophthalmology*, 16(6), 453-7.
2. Yanagisawa, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, v.332, March, 1988.
3. Gimbrone, M.; Alexander, R. Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium. *Science*, v.189, n.4198, p.219-220, 1975.
4. Palmer, R. M.; Ashton, D. S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v.333, n. 6174, 1988.
5. Félétou, M.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, v.93, p.515-524, 1988.
6. Britto-Júnior, J., Pinheiro, D. H., Justo, A. F., Figueiredo Murari, G. M., Campos, R., Mariano, F. V., Souza, V. B., Schenka, A. A., Mónica, F. Z., Antunes, E., & De Nucci, G. (2020). Endothelium-derived dopamine modulates efs-induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(4).
7. Campos, R., Pinheiro, D. H., Britto-Júnior, J., de Castro, H. A., Mendes, G. D., Moraes, M. O., Moraes, M. E., Lopes-Martins, R. Á., Antunes, N. J., E.; 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. *Journal of Chromatography B*, 1173, 122668.
8. Paterson, G., 1965. The response to transmural stimulation of isolated arterial strips and its modification by drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 17, 341-349.
9. M. d'Ischia, C. Costantini, Nitric oxide-induced nitration of catecholamine neurotransmitters: a key to neuronal degeneration? *Bioorg. Med. Chem.* 3 (7) (1995) 923-927.