

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

DAVID HALEN ARAÚJO PINHEIRO

**QUANTIFICAÇÃO DA 6-NITRODOPAMINA EM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA
EM AORTA DE *Chelonoidis carbonaria* (*in vitro*)**

São José dos Campos, SP
2021

David Halen Araújo Pinheiro

**QUANTIFICAÇÃO DA 6-NITRODOPAMINA EM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA
EM AORTA DE *Chelonoidis carbonaria* (in vitro)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

São José dos Campos, SP
2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Pinheiro, David Halen Araújo
Quantificação da 6-nitrodopamina em solução de
Krebs-Henseleit por cromatografia líquida acoplada à
espectrometria de massa em aorta de *Chelonoidis carbonaria* (in
vitro) / David Halen Araújo Pinheiro; orientador, Rodrigo Álvaro
Brandão Lopes Martins Martins. - São José dos Campos, SP, 2021.
1 CD-ROM, 66 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Endotélio vascular. 3.
Espectrometria de Massas em Tandem. 4. Cromatografia Líquida. I.
Martins, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, orient. II.
Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, David Halen Araújo Pinheiro, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 9 de Setembro de 2021.



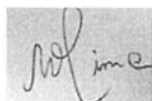
Autor(a) da Obra

DAVID HALEN ARAÚJO PINHEIRO

“QUANTIFICAÇÃO DA 6-NITRODOPAMINA EM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA EM AORTA DE *Chelonoidis carbonária in vitro*”.

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF. DR. MÁRIO OLIVEIRA LIMA



PROF. DR. RODRIGO ALVARO BRANDÃO LOPES MARTINS



PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS - Uninove



Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 23 de agosto 2021.

DEDICATÓRIA

Dedicado esse projeto ao senhor, rei do universo e que estar conosco em todos os momentos.

Aos meus amados pais Valdimir e Francisca, pelo incentivo, carinho e de um amor fortalecedor.

Aos meus amados avós Francisco e Graça, um exemplo de respeito, dedicação e cuidado.

Aos meus irmãos Diego e Daniele, por todo carinho sem medidas.

Ao meu sobrinho/afilhado Benício, um presente Deus para nossa família.

Ao meu primo querido, Rafael Araújo.

Ao meu cunhado Leonardo Mendes, por todo apoio nessa trajetória.

Aos meus primos que sempre estiveram e me apoiaram nas decisões.

Ao meu tio Júlio César (*in memória*).

E a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me tranquilizar em todos os momentos e decisões.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Rodrigo Álvaro e ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, por acreditarem no meu potencial em agregar na equipe e crescer profissionalmente. Obrigado pela confiança.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Labat e ao Prof. Dr. Mário Oliveira pela paciência e disposição em auxiliar e corrigir o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Reabilitação Sensório Motora, em São José dos Campos. Muito obrigado por me receberem tão bem no grupo, Aline Lanzilotti, Bruna, Douglas, Elaine, Natália, Gabriela Souza, Carol, Ary, Élide, Kássila, Profa. Dra. Marcele Florencio, Profa Dra. Fernanda Pupio e ao Prof. Dr. Mário Oliveira.

Agradeço também as minhas amigas, Ana Paula Pinto, Daniele Silva, Dhenise Mikaelly e Francileine Rodrigues que são muito especiais e importantes para mim, obrigado por todo carinho. E a Virna pela compreensão nas suas explicações nos diversos momentos de dúvidas.

Ao Departamento de Farmacologia da UNICAMP, por permitir e viabilizar o desenvolvimento desse projeto de mestrado.

Aos colegas da farmacologia, Glaucia, Edith, Carina, Matheus Leite, Akila, Gabi Passos, Gabi Bertollotto, Guilherme, Carol Lescaco, Ariane, Charles, Britto, Tiago, Amanda, Cidinha, Rafael, Carol Ghezi, Karoline, Rita, Mariana, Natalícia, Sandra, Alberto e Felipe (vocês são irmãos para mim e jamais vou esquecer das nossas rotinas), Elen, Camila, Luiz Kiguti, Weverton, Mateus Carvalho e a todos os funcionários do departamento. Agradeço pelo simples fato de terem traçado meu caminho, às vezes pelo simples gesto de terem mencionado uma única palavra de tranquilidade nos momentos em que eu precisei e por me receberem tão bem.

Ao Dr. Ronilson Moreno pelos conselhos para a vida.

Aos colegas de convivência diária, Guilherme, Felipe, Gabriel, Marcelo, Jane e Neia.

Aos maravilhosos alunos de iniciação científica, Gabriel Stocco e Jaiane Martins, obrigado pelos todos finais de semanas de risadas e de muito trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa, Wesley e Guilherme, obrigado pela parceria todo esse tempo.

À Maria dos Remédios e Amanda Gomes, pessoas que me recepcionaram com muita atenção em São Paulo, obrigado por tudo.

Aos meus amigos que mesmo de longe estão presente na minha vida, Wildson Santos, Barhbara Garcez, Ana Celestina, Karina Vasconcelos e Norma Chaves.

Ao Wesley por todo carinho, atenção e pelas coisas bonitas vividas que jamais serão esquecidas.

À Universidade do Vale do Paraíba – Univap e ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D por permitir um curso admirável de mestrado.

À toda comissão de pós-graduação e funcionários, em especial ao carisma e atenção da Miriam Nunes e da Nanci Vilela.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – Código de financiamento 001, pelo apoio financeiro por meio do processo: 88887.342238/2019-00.

“Mas se você nunca tentar, você nunca saberá”

(FIX YOU - COLDPLAY)

RESUMO

O endotélio vascular é descrito como uma monocamada de células finas, que revestem o luminal de todos os vasos sanguíneos, e que desempenha função determinante no controle da homeostase vascular, agindo na regulação de sinais intracelulares, permeabilidade, tônus vascular, cascata de coagulação, angiogênese, entre outras funções. Recentemente, foi relatado que o endotélio de vasos umbilicais humanos é capaz de liberar dopamina, um mediador na reatividade vascular. A 6-nitrodopamina faz parte da família das 6-nitrocatecolaminas, sendo um produto putativo da nitração dependente do óxido nítrico com dopamina, atraindo, com isso, relevância em estudos nos últimos anos. Este estudo teve como objetivo descrever, pela primeira vez, o desenvolvimento e validação de um método específico e sensível para quantificação da 6-nitrodopamina em solução de Krebs-Henseleit em aortas de *Chelonoidis carbonaria* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS / MS). Os anéis aórticos de *Chelonoidis carbonaria* com endotélio intacto e sem endotélio (15 mm, N = 6) foram incubados por 30 min em 5 mL de banho de órgão contendo solução de Krebs-Henseleit. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram utilizadas para a extração em fase sólida da 6-nitrodopamina. A separação da 6-nitrodopamina foi obtida em uma coluna Shim-pack GIST-HP C18 de 150 mm x 3,0 mm e a detecção foi realizada por um espectrômetro de massas equipado com uma interface de eletrospray operando em modo de íon positivo. Os resultados obtidos, demonstraram sensibilidade, precisão e exatidão suficientes para sua aplicação na medida da liberação basal de 6-nitrodopamina em aorta de *Chelonoidis carbonaria in vitro*. O tempo de corrida foi de 3,5 min e a curva de calibração foi linear na faixa de 0,1 - 20,0 ng/mL. As concentrações médias \pm erro padrão da média da 6-nitrodopamina liberada da aorta com endotélio intacto e sem endotélio foram $0,44 \pm 0,06$ ng/mL e $0,18 \pm 0,05$ ng/mL, respectivamente. Estes resultados indicam que a aorta da *Chelonoidis carbonaria* exibe uma liberação de 6-nitrodopamina basal derivada do endotélio basal.

Palavras-chave: Endotélio vascular. 6-nitrodopamina. LC-MS / MS. Extração em fase sólida. *Chelonoidis carbonaria*.

ABSTRACT

The vascular endothelium is described as a monolayer of thin cells, which line the luminal of all blood vessels, and which plays a determining role in the control of vascular homeostasis, acting in the regulation of intracellular signals, permeability, vascular tone, coagulation cascade, angiogenesis, and among other functions. Recently, it has been reported that human umbilical vessel endothelium is a basal dopamine releaser, this substance being a mediator in vascular reactivity. 6-nitrodopamine is part of the family of 6-nitrocatecholamines, being a putative product of nitric oxide-dependent nitration with dopamine, with this, it has proved a study in recent years. The objective of this study was to define, for the first time, the development and validation of a specific and sensitive method for quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit solution in *Chelonoidis carbonaria* aortas by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC- MS / MS). *Chelonoidis carbonaria*'s endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings (15 mm, N = 6) were incubated for 30 min in 5 mL organ bath containing Krebs-Henseleit's solution. Aliquots of 1 mL of the supernatant were used to extract 6-nitrodopamine by solid phase extraction (SPE). The separation of 6-nitrodopamine was obtained on a 150 mm x 3.0 mm Shim-pack GIST-HP C18 column and the detection was performed by a mass spectrometer equipped with an electrospray interface operating in positive ion mode. The run time was 3.5 min and the calibration curve was linear over the range 0.1 - 20.0 ng/mL. The method showed sensitivity, precision and accuracy enough for its application in the measurement of the basal release of 6-nitrodopamine from *Chelonoidis carbonaria* aortae in vitro. The mean \pm standard error of the mean concentrations of 6-nitrodopamine released from endothelium-intact and endothelium-denuded aortae were 0.44 ± 0.06 ng/mL and 0.18 ± 0.05 ng/mL, respectively. These results indicate that tortoise's aortae display a basal endothelium-derived 6-nitrodopamine release.

Keywords: Vascular endothelium. 6-nitrodopamine. LC-MS/MS. Solid phase extraction. *Chelonoidis carbonaria*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estrutura da parede arterial	20
Figura 02 - Formação da placa de ateroma no interior de um vaso sanguíneo	21
Figura 03 - Biossíntese de catecolaminas.....	23
Figura 04 - Estrutura química da nitrocatecolamina	24
Figura 05 - Representação do <i>Chelonoidis carbonária</i> (Jabuti-Piranga).....	27
Figura 06 - Representação do sistema de banho para órgãos isolados com solução de Krebs-Henseleit.....	30
Figura 07 - Espectros de massas do íon molecular protonado e produto	33
Figura 08 - Cromatogramas obtidos na análise da 6-nitrodopamina.....	34
Figura 09 - Curva de calibração da 6-nitrodopamina. PI= Padrão interno.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Dados de precisão e exatidão de 6-nitrodopamina em solução de Krebs-Henseleit	38
Tabela 02 - Efeito da matriz para 6-nitrodopamina em solução de Krebs-Henseleit.	39
Tabela 03 - Dados da estabilidade da 6-nitrodopamina em solução de Krebs-Henseleit.	39
Tabela 04 - Concentração de 6-nitrodopamina em amostras de solução de Krebs-Henseliet após incubação de anéis aórticos de <i>Chelonoidis carbonária</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS

6-ND: 6-nitrodopamina

ACh: Acetilcolina

ADR: Adrenalina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AUH: Artéria Umbilical Humana

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COMT: Catecol-O-Metiltransferase

CQ: Controle de Qualidade

CV: Coeficiente de Variação

DA: Dopamina

DOPA: Dihidroxifenilalanina

D β H: Dopamina β -hidroxilase

EDRF: Fator Relaxante Derivado do Endotélio

EV: Endotélio Vascular

SPE: Extração em Fase Sólida

FMN: Fator de Matriz Normalizado

FNMT: Feniletanolamina n-metiltransferase

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IM: Intramuscular

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

LIQ: Limite Inferior de Quantificação

LSQ: Limite Superior de Quantificação

MSR: Medula Suprarrenal

NO: Óxido Nítrico

NOR: Noradrenalina

PI: Padrões Internos

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

TH: Tirosina Hidroxilase

VUH: Veia Umbilical Humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Endotélio Vascular	17
2.2 Catecolaminas	20
2.3 LC - MS / MS.....	22
2.4 <i>Chelonoidis carbonária</i> (Jabuti-Piranga)	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Local do estudo	27
4.2 Universo dos animais e procedimentos éticos	27
4.3 Preparo dos tecidos	27
4.4 Preparo das amostras	28
4.5 Padrões de calibração e controles de qualidade	29
4.6 Padrões e reagentes.....	29
4.7 Análise cromatográfica.....	29
4.8 Validação do método	30
4.8.1 Seletividade.....	30
4.8.2 <i>Carryover</i>	30
4.8.3 Linearidade	31
4.8.4 Precisão e exatidão.....	31
4.8.5 Efeito da matriz e recuperação	32
4.8.6 Estabilidade.....	32
4.9 Análise dos dados.....	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Validação	34
5.1.1 Seletividade.....	34
5.1.2 <i>Carryover</i>	35
5.1.3 Linearidade	35
5.1.4 Exatidão e precisão.....	35
5.1.5 Efeito de matriz	36
5.1.6 Estabilidade.....	36
5.1.7 Aplicação do método.....	37

6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO A – CERTIFICADO DO CEUA.....	50
ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO SISBIO	52
ANEXO C - PRODUÇÕES REALIZADAS DURANTE O MESTRADO.....	56

1 INTRODUÇÃO

O endotélio vascular (EV), ou células endoteliais, é definido com uma única e contínua camada de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício, revestindo o interior dos vasos sanguíneos, incluindo artérias, veias e as câmaras do coração (STORCH *et al.*, 2017; BAHIA *et al.*, 2006; JOYNER; LIMBERG, 2016). Essas células possuem fendas entre si, preenchidas por uma matriz proteica, funcionando como um filtro, evitando que as moléculas grandes ultrapassem de um meio para o outro e permitindo a passagem das moléculas menores (FÉLÉTOU, 2011).

O EV, estão presentes no interior de vasos sanguíneos que percorrem todo o corpo, órgãos e tecidos. O EV tem a capacidade de regular o tônus vascular através da liberação de agentes vasoativos para controlar a contratilidade e/ou proliferação das células da musculatura lisa (SORRIENTO *et al.*, 2012; WIDMER; LERMAN, 2014). O EV pode ser também considerado o maior órgão parácrino do organismo, que responde a diversas respostas, originando e secretando localmente muitos compostos metabolicamente ativos entre as células vizinhas (CARDOSO *et al.*, 1994).

O EV é considerado um tecido ativo e dinâmico com propriedades importantes como manutenção da circulação sanguínea, permeabilidade microvascular, homeostática, angiogênese vascular, resposta inflamatória e vasoreguladora (GHISI *et al.*, 2010; PAGAN; GOMES; OKOSHI, 2018).

De acordo com o estudo de Godo e Shimokawa (2017), essa camada de células desempenha papéis importantes na modulação do tônus vascular, sintetizando e liberando uma variedade de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), incluindo prostaglandinas vasodilatadoras e óxido nítrico (NO).

A identificação da importância do EV na regulação do tônus vascular foi observada no estudo de Furchgott e Zawadzki (1980), analisando a relação entre a acetilcolina (ACh) e a vasodilatação na aorta isolada de coelho. Em algumas preparações notou-se que a ACh produzia a vasodilatação. Isso ocorria devido a presença do EV durante a preparação do vaso, originalmente denominado EDRF, identificado mais tarde como NO, no qual comprova a liberação contínua do EDRF-NO pelo EV é responsável pela manutenção do tônus vascular.

Dentre os vasodilatadores derivados do endotélio, NO atualmente é o principal fator envolvido na função endotelial. Distúrbios na liberação desse gás provocam

perturbações da homeostase vascular e levam ao desenvolvimento de disfunção endotelial associada com várias desordens cardiovasculares (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006).

Os aminoácidos aromáticos no cérebro exercem funções como precursores dos neurotransmissores monoamina serotonina e das catecolaminas (FERNSTROM; FERNSTROM, 2007). As catecolaminas endógenas são dopamina (DA), noradrenalina (NOR) e adrenalina (ADR) (GOLDSTEIN, 2012). As catecolaminas, possuem funcionalidades neurotransmissoras e/ou hormonais presentes tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no sistema nervoso periférico (SNP). Elas dispõem de uma gama de atividades, podendo exercer diferentes funções dependendo do órgão-alvo e dos receptores disponíveis (KVETNANSKY; SABBAN; PALKOVITS, 2009).

As catecolaminas mostram respostas excitatórias e inibitórias do SNP, bem como ações no SNC, como por exemplo, estimulação da respiração, aumento da atividade psicomotora e função cardíaca. Os efeitos excitatórios são exercidos nas células dos músculos lisos dos vasos que fornecem sangue à pele e às membranas mucosas (FERES 2014).

A DA é um neurotransmissor bem conhecido no SNC, também é um modulador importante da pressão arterial, equilíbrio de sódio, função renal e adrenal e é relevante para a patogênese e / ou manutenção da hipertensão arterial (ZENG *et al.* 2004). A DA derivada do endotélio adiciona um papel importante deste mediador na reatividade vascular (BRITTO-JÚNIOR *et al.*, 2020).

A 6-nitrodopamina (6-ND) faz parte da família das 6-nitrocatecolaminas é um produto putativo da nitração dependente do NO com DA, e que tem atraído interesse em estudos nos últimos anos (PALUMBO *et al.*, 1999; PALUMBO; ASTARITA; D'ISCHIA, 2001). A 6-ND demonstrou atividades biológicas, como por exemplo: a da catecol-O-metiltransferase (COMT) e do óxido nítrico sintase neuronal (CHIARI *et al.*, 2000; TSUNODA *et al.*, 2007).

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou evidências da liberação de catecolaminas pelo endotélio vascular de répteis, como aorta de cobra cascavel, jararaca e jabuti (CAMPOS *et al.*, 2020), e em vasos de cordão umbilical humano (BRITTO-JÚNIOR *et al.*, 2020). Esses achados levantaram a questão sobre a possibilidade de derivados da DA também serem liberados pelo endotélio dos vasos sanguíneos. Estudos de fisiologia comparada envolvendo animais não mamíferos são

essenciais para a compreensão das associações evolutivas entre grupos, como os processos fisiológicos e funcionais e as diferentes adaptações de diversas espécies.

O presente estudo de identificação e quantificação torna-se relevante, isso porque dentre a nitração do NO com DA, a 6-ND pode ser capaz de proporcionar um controle retrógrado partindo do vaso sanguíneo em direção ao coração. Desta forma, é imprescindível que métodos analíticos sejam descritos e validados para a identificação precisa e seletiva de novos derivados de neurotransmissores com relevância fisiológica que, por fim, podem ter impacto no desenvolvimento de diferentes condições patológicas.

Até o momento, nenhum método de análise da 6-ND em amostras biológicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) foi descrito na literatura. Este estudo mostra, pela primeira vez, o desenvolvimento e validação do método para quantificação da 6-ND por LC-MS/MS em solução de Krebs-Henseleit após 30 min de incubação em aorta de *Chelonoidis carbonaria*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Endotélio Vascular

O EV foi considerado por anos como uma barreira seletiva permeável entre a corrente sanguínea e o sistema vascular, que é agora reconhecido como um órgão homeostático fundamental para a regulação do tônus e estrutura vascular (VERSARI *et al.*, 2009). O EV é denominado como uma monocamada de células finas, que revestem o luminal de todos os vasos sanguíneos (CARDOSO *et al.*, 1994). O endotélio desempenha função determinante no controle da homeostase vascular, agindo na regulação de sinais intracelulares, permeabilidade, tônus vascular, cascata de coagulação, angiogênese, entre outros (STORCH *et al.*, 2017).

O EV libera diversas substâncias vasoativas capazes de modular os processos como a angiogênese, respostas inflamatórias, imunológicas, tônus e permeabilidade vascular, além de atuarem na prevenção de trombose e promover a manutenção da integridade dos vasos (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006).

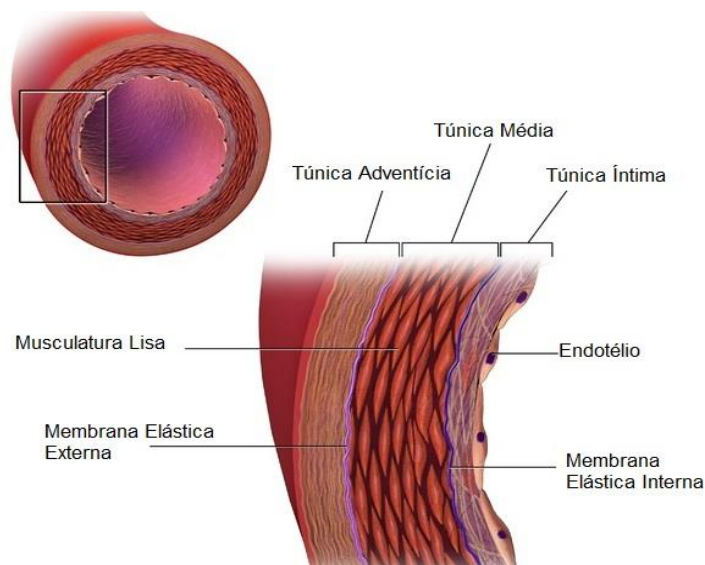
Dentre as substâncias vasoativas liberadas pelo EV, incluem EDRF (NO), fatores constritores derivados do endotélio (endotelina-1 e prostaglandinas) e fatores hiperpolarizantes derivados do EV. Dentre os vasodilatadores derivados do EV, NO atualmente é o principal fator envolvido na função endotelial (SU, 2015).

As diversas funções realizadas pelo EV requerem uma efetiva capacidade de comunicação intercelular que ocorre por meio dos diferentes tipos de junções existentes nas membranas das células endoteliais, como as junções de adesão, vedação e junções *gap*, permitindo a distribuição do tônus elétrico, assim como a transferência de íons ou pequenas molécula (GUTSTEIN *et al.*, 2002). De acordo com Storch *et al.* (2017), uma das principais funções do endotélio é a liberação de substâncias frente a estímulos, que atuam de forma autócrina e/ou parácrina.

Morfologicamente, o EV dispõe de três características conforme a sua localização: contínuo, fenestrado e sinusoidal (BENNETT; LUFT; HAMPTON, 1959; RISAU, 1995). O endotélio contínuo é encontrado em artérias, veias e capilares do cérebro, da pele, do pulmão, coração e músculo. No SNC, o endotélio é coberto por uma camada permeável de células periendothelias, também camadas de pericitos servindo como barreira, suporte e possibilita troca de íons (HIRSCHI; D'AMORE, 1996).

Histologicamente, as artérias são formadas por três membranas diferentes, definidas como túnicas, túnica íntima, média e adventícia. A primeira túnica é a mais interna e apresenta uma camada de células endoteliais apoiada em tecido conjuntivo frouxo e uma camada subendotelial, que pode conter, eventualmente, células musculares lisas; a segunda é constituída, principalmente, por camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas helicoidalmente, possuindo uma lâmina elástica externa mais delgada que a separa da túnica adventícia; a terceira e última túnica, torna-se progressivamente contínua com o tecido conjuntivo do órgão pelo qual passa o vaso sanguíneo. E desse modo, são encontrados nos capilares linfáticos e nervos, podendo estas estruturas aprofundar-se até a porção mais externa da túnica média, como mostra a figura 01 (GARCIA FILHO *et al.*, 2012).

Figura 01 – Estrutura da parede arterial.



Fonte: Adaptado de Mercadante e Raja, 2020.

De acordo com Carvalho *et al.* (2001) o endotélio apresenta-se estrategicamente localizado na parede vascular para:

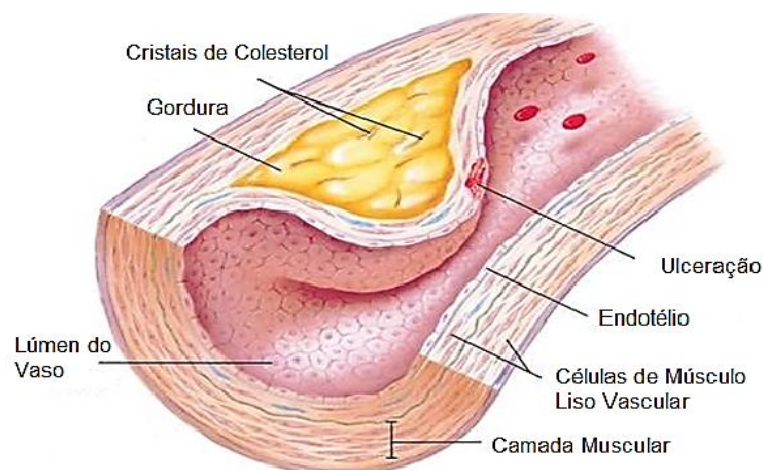
- Agir como sensor de modificações hemodinâmicas;
- Conduzir sinais que recebe de células e da matriz extracelular;
- Desenvolver mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte celular;
- Conservar as alterações adaptativas de forma que elas se ajustem às exigências circulatórias.

A disfunção endotelial exerce um papel importante no desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos (OISHI *et al.*, 2018). Modificações da função na camada do endotélio em resposta a ações mecânicas (hipertensão arterial e *shear stress*), imunológicas e químicas representam o primeiro passo fisiopatológico da ativação da aterosclerose (MELO *et al.*, 2007). Semelhantemente, há relatos experimentais na literatura apontando que a disfunção endotelial pode limitar o fluxo sanguíneo cerebral e predispor a disfunções cognitivas (SOROP *et al.*, 2017).

Ao longo dos anos, a aterosclerose foi considerada uma doença de acúmulo passivo de lipídios na parede arterial. Ainda assim, principalmente a partir dos anos 1990, robusta evidência que a inflamação tem um papel central em todas as fases da aterosclerose, passando, atualmente, a ser considerada uma patologia de resposta inflamatória arterial (PITTHAN; MARTINS; BARBISAN, 2014).

Para a Sociedade Brasileira de Cardiologia, origina-se com a agressão ao EV por inúmeros fatores de risco, como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo. Como repercussão, a disfunção endotelial amplia a permeabilidade da túnica íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial (FALUDI *et al.*, 2017), como demonstrado na figura 02.

Figura 02 - Formação da placa de ateroma no interior de um vaso sanguíneo.



Fonte: Adaptado do Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias da Universidade de São Paulo, 2014.

A disfunção endotelial é um aspecto precoce no desenvolvimento e progressão da placa aterogênica e suas respectivas complicações. Essa condição é caracterizada por uma redução na biodisponibilidade de vasodilatadores derivados do endotélio, por

exemplo o NO. Essa instabilidade prejudica a vasodilatação dependente endotélio, marca funcional que configura a disfunção endotelial (STORCH *et al.*, 2017).

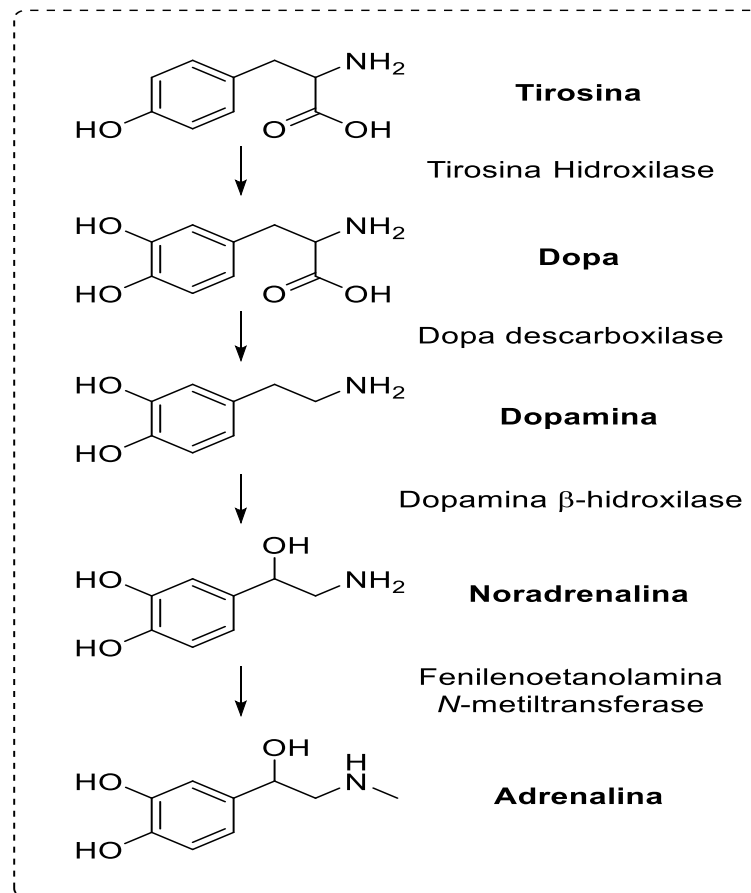
O endotélio produz vários EDRFs, fatores de hiperpolarização, e fatores de contração. Por meio de um adequado equilíbrio entre a liberação desses fatores, o endotélio exerce um papel fundamental na manutenção da homeostase circulatória. Conseqüentemente, existindo qualquer alteração nesse equilíbrio, poderá promover para disfunção do endotélio (OISHI *et al.*, 2018). Tal disfunção vem acarretando importantes enfermidades vasculares, acometendo cada vez mais pessoas no mundo e, à medida que a população envelhece a morbimortalidade causada por essas doenças aumenta.

2.2 Catecolaminas

As catecolaminas são substâncias moleculares ativas que apresentam o anel catecol (anel benzênico e duas hidroxilas) e uma amina (NH₂) em sua estrutura química. Agem como neurotransmissores e hormônios circulantes no controle do SNC e SNP, sendo essenciais para homeostasia do organismo (JUSTO 2020; FERES 2014).

A síntese de catecolaminas se inicia a partir da biossíntese do aminoácido tirosina, o qual por reações enzimáticas formam, sequentemente, dihidroxifenilalanina (DOPA), DA, NOR e ADR (HEINZ *et al.*, 1995; PEREIRA, RIBEIRO, 2012). O passo inicial envolve a hidroxilação em DOPA, sendo catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Uma vez formada, a DOPA é rapidamente sensível à luz; eles são relativamente inativos na escuridão e torne-se ativo na luz (FERNSTROM; FERNSTROM, 2007).

Por seguinte, a dopa é descarboxilada para originar a DA, pela enzima descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos, logo em seguida sendo conduzida para vesículas secretoras, onde é subseqüentemente β -hidroxilada pela enzima dopamina β -hidroxilase para dar início à NOR. A NOR é, em grande parte, N-metilada pela feniletanolamina n-metiltransferase (FNMT), uma enzima citoplasmática presente, sobretudo, na medula suprarrenal (MSR), dando origem a ADR, que é transportada para as vesículas, onde é armazenada com a NOR (DAUBNER; LE; WANG; 2011; PEREIRA; RIBEIRO, 2012), como representado na figura 03.

Figura 03 - Biossíntese de catecolaminas.

Fonte: Ilustração baseada e adaptado de RANG *et al.*, 2012. Créditos: NUNES, 2021.

Esse completo processamento de biossíntese das catecolaminas decorre essencialmente em nervos adrenérgicos e na MSR. Apesar disso, na MSR, a NOR tem potencial ainda de ser metilada pela FNMT, utilizando como cofator S-adenosilmetionina, e armazenadas nas vesículas de células de cromafins (FERNSTROM; FERNSTROM, 2007).

A liberação de catecolaminas nas terminações nervosas simpáticas, encontra-se intimamente ligada pela ação da ACh, procedente de neurônios pré-ganglionares. Nas células de cromafins da MSR, a ACh liga-se a receptores nicotínicos ou muscarínicos e possibilita o aumento da concentração intracelular de cálcio, proporcionando a fusão das membranas das vesículas com a membrana celular e subsequente exocitose das catecolaminas (PEREIRA; RIBEIRO, 2012).

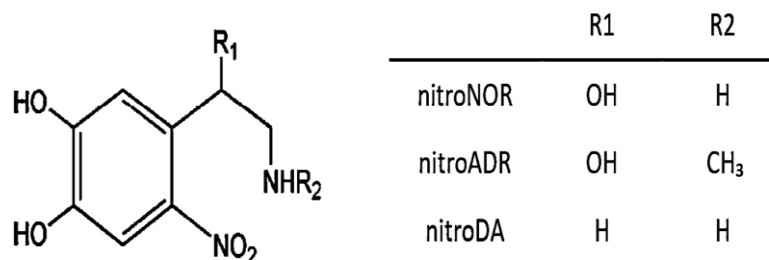
A NOR é o neurotransmissor presente na maior parte das fibras pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo e de algumas regiões do SNC. Enquanto a DA é o neurotransmissor principal de várias vias neurais do sistema nervoso dos

mamíferos, sendo esta predominante no SNC, no que se refere às catecolaminas. Por fim, a ADR é o principal hormônio MSR e é encontrada em pequenas quantidades no SNC (ALVES, 2017). O maior trato de DA no cérebro está situado no sistema nigroestriatal, que compreende cerca de 80% do neurotransmissor no cérebro. O sistema dopaminérgico nigroestriatal exerce associação ao movimento voluntário, alterações nesta via dopaminérgica estão relacionados à doença de Parkinson (SILVA, 2020).

A 6-ND e suas classe como, por exemplo, a 6-nitronoradrenalina, mostrou-se como uma nova classe de metabólitos de catecolaminas aparentemente implicados em uma variedade de condições fisiopatológicas associadas ao estresse oxidativo, neurotransmissão catecolaminérgica prejudicada e síntese aprimorada de NO, sendo um potente mediador fisiológico (NAPOLITANO; PALUMBO; D'ISCHI, 2000).

A origem e possível definição funcional de 6-nitrocatecolaminas, incluindo a 6-ND e seu congêneres da NOR, 6-nitronoradrenalina, têm atraído um relevante e crescente interesse desde a identificação de 6-nitronoradrenalina no cérebro de mamíferos em níveis e à atividade do óxido nítrico sintase (NOS), sendo essa atribuída para a síntese do mediador fisiológico NO (PALUMBO; ASTARITA; D'ISCHIA, 2001). Na figura 04, podemos observar as estruturas químicas das nitrocatecolaminas (nitronoradrenalina, nitroadrenalina e nitrodopamina).

Figura 04 - Estrutura química de uma nitrocatecolamina.



Fonte: Adaptado de Tsunoda *et al.*, 2007.

2.3 LC - MS / MS

A cromatografia pode ser combinada a diversos sistemas de detecção, tratando-se de um dos métodos analíticos mais empregados e com desempenho

satisfatório. O acoplamento de um cromatógrafo associado a um espectrômetro de massas, combina as vantagens da cromatografia, tais como: alta seletividade e eficiência de separação com as vantagens da espectrometria de massas, como obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O espectrômetro de massas é um aparelho que ioniza moléculas para a forma gasosa e desagrega as mesmas segundo com sua relação massa/carga (LIMA; 2013). A princípio, o espectrômetro de massas, em particular com combinação em tandem (MS/MS), possui uma capacidade de identificação de substâncias inigualável, e sua aplicabilidade mais ampla na prática diagnóstica está na dependência de desenvolvimento de técnicas pontuais e disseminação de conhecimento (VIEIRA; NAKAMURA; CARVALHO, 2005).

A LC-MS/MS confere alta seletividade, sensibilidade e universalidade às análises. O emprego dessa técnica tem simplificado as análises toxicológicas e farmacológicas por diminuir o número de estágios na preparação de amostras e com o mínimo de separação cromatográfica (GONÇALVES *et al.*, 2017). Diferentes estudos são representados empregando a cromatografia em fase líquida acoplada ao detector de massas (FUSTINONI *et al.*, 2010; CHIANG *et al.*, 2015).

O presente método consiste na geração de íons na fase gasosa que, logo em seguida, são selecionados através de sua razão massa/carga. O processo de desenvolvimento dos íons na fase gasosa pode ser considerado, o mais significativo da espectrometria de massas e, frequentemente, requer duas etapas, são elas: a vaporização e a ionização, que podem acontecer sequencialmente ou de forma simultânea. Essas etapas ocorrem apenas com o fornecimento de energia e, em análises de compostos orgânicos, a energia da fonte tem que ser suficientemente baixa para não proporcionar quebras intramoleculares e assim, desenvolver íons gasosos a partir da estrutura intacta da molécula (DRIGO, 2013).

Dentre os métodos aplicados para quantificar as catecolaminas em diferenciados modelos de amostras biológicas, como plasma, urina e células mononucleares do sangue periférico, o LC-MS/MS, é o mais promissor, pois tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade, além de mais rápido (BRITTO-JÚNIOR *et al.*, 2020).

No estudo recentemente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando anéis de artéria umbilical humana (AUH) e em veia umbilical humana (VUH)

com a camada de endotélio preservada, por meio de análise por LC-MS-MS na solução de Krebs-Henseleit, revelou uma liberação basal de DA (BRITTO-JÚNIOR *et al.*, 2020).

Em um outro estudo realizado por Britto-Júnior *et al.* (2020), foi demonstrado, pela primeira vez, o desenvolvimento e validação do método para quantificação de DA, NOR e ADR por LC-MS-MS em solução de Krebs-Henseleit após incubação de anéis aórticos de *Chelonoidis carbonaria in vitro*. O método apresentado demonstrou sensibilidade e precisão suficiente para sua aplicação na medida da liberação basal destas catecolaminas pelos anéis aórticos.

2.4 *Chelonoidis carbonaria* (Jabuti-Piranga)

Estudos com répteis vem ganhando cada vez mais relevância, tanto por questões ambientais quanto pelo aumento do interesse em sua utilização como animais de companhia (MATIAS *et al.*, 2006).

Os amniotas especificam-se como todos os animais vertebrados tetrápodes cujos embriões são constituídos por uma membrana amniótica gerando uma cavidade preenchida por fluidos. Incluem-se nesse grupo os mamíferos, répteis e as aves atuais, que hoje chegam a mais de 23 mil espécies descritas (SHEDLOCK; EDWARDS, 2009). Os jabutis são animais terrestres, de corpo robusto, carapaça bem arqueada, membros locomotores cilíndricos e fortes, apropriados para sustentar o casco pesado e caminhar em ambientes rústicos (FERREIRA *et al.*, 2012).

As três espécies de jabutis de ocorrência natural no Brasil são do gênero *Chelonoidis carbonaria* e *Chelonoidis denticulata*, que tem classificação ampla, e *Chelonoidis chilensis*, que pode ocorrer no extremo sul do país. Os *Chelonoidis carbonaria* são encontrados ainda na Venezuela, Equador, Paraguai e em algumas ilhas do Caribe (MEIRELES, 2014). A primeira e a segunda espécies de jabutis, possuem ampla distribuição no território brasileiro. Apesar de ocorrerem em muitos locais, *Chelonoidis carbonaria* apresenta predileção por áreas mais abertas, enquanto a *Chelonoidis denticulata*, prefere áreas de florestas mais densas, respectivamente (FARIAS *et al.*, 2007).

Estas espécies são consideradas de tamanho médio, com uma média comprimento reto da carapaça em *Chelonoidis carbonaria* raramente excedendo 50 cm, e indivíduos com carapaças variando entre 30 e 40 cm de comprimento são mais

comumente observados (figura 05) (BARROS *et al.*, 2012). O *Chelonoidis carbonaria* manifesta uma coloração forte, de cabeça e patas vermelhas, podendo chegar a aproximadamente 15 kg. Os machos são maiores que as fêmeas, medindo em média 30 cm, já as fêmeas medem em torno de 28 cm, chegando no máximo de 40-50 cm, e com expectativa de vida de 80 anos (FERREIRA *et al.*, 2012).

Figura 05 – Representação do *Chelonoidis carbonária* (Jabuti-Piranga).



Fonte: Créditos ao autor (2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo desenvolver e validar pela primeira vez, um método específico e sensível para quantificação da 6-ND em solução de Krebs-Henseleit em aortas de *Chelonoidis carbonaria* por LC-MS / MS.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a 6-ND em solução de Krebs-Henseleit;
- Desenvolver o método e validar conforme as preconizações;
- Determinar a liberação de 6-ND em aortas de *Chelonoidis carbonária* com e sem a presença de endotélio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

O experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, sob supervisão do Professor Dr. Gilberto De Nucci, seguindo todas as normas e procedimentos de biossegurança.

4.2 Universo dos animais e procedimentos éticos

Foram utilizados 06 *Chelonoidis carbonaria* (Jabuti-Piranga) de ambos os gêneros, com peso de 2,0 a 7,0 kg, provenientes do Parque Ecológico do Tietê (São Paulo, SP, Brasil). Todos os procedimentos experimentais, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA da Universidade Estadual de Campinas: 5265-1/2019 (ANEXO A)) e foi autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO: número 20910 (ANEXO B)).

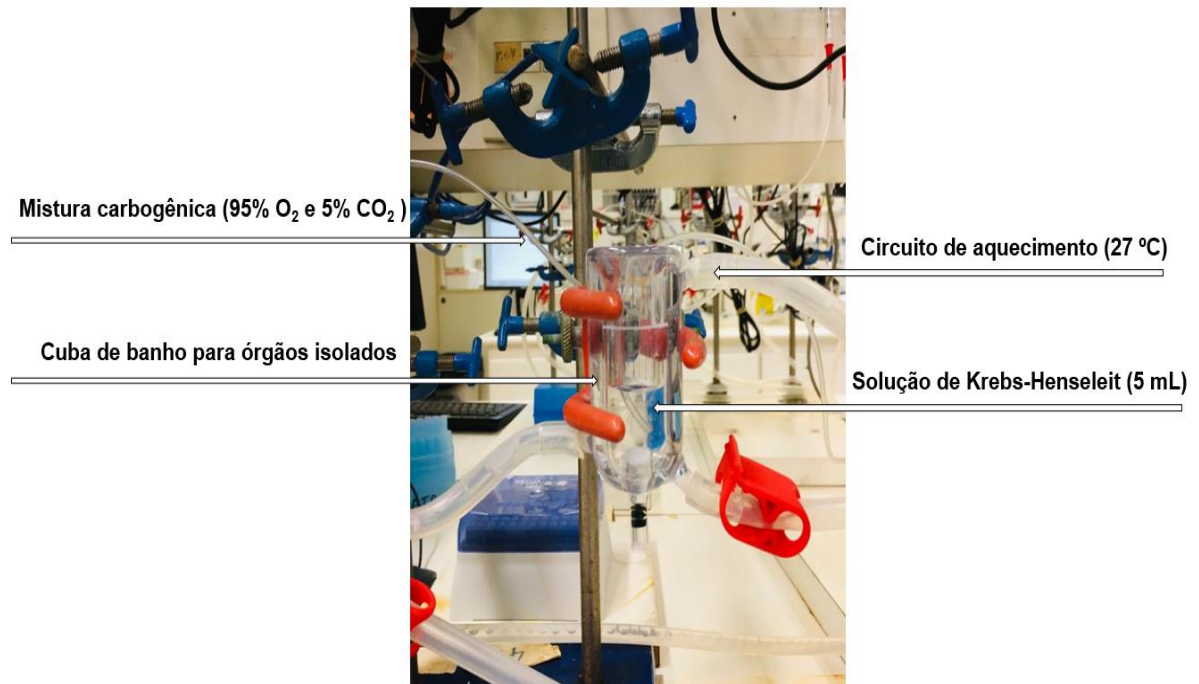
4.3 Preparo dos tecidos

Os animais foram sedados com midazolam (2 mg/kg; via intramuscular (IM)), anestesiadas com cetamina (40 mg/kg; via IM) e propofol (15 mg/kg; intravenosa), e eutanasiadas por exsanguinação. Um segmento da aorta dorsal foi cuidadosamente dissecado e imediatamente imerso em solução de Krebs-Henseleit a 27 °C.

Posteriormente, dois anéis aórticos por animal (15 mm), um com endotélio intacto e outro sem endotélio foram suspensos verticalmente entre dois ganchos de metal em banhos de órgãos contendo 5 mL (Figura 06) da solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: Cloreto de sódio (NaCl) 118; Cloreto de potássio (KCl) 4,7; Cloreto de cálcio (CaCl₂) 2,5; Sulfato de magnésio (MgSO₄) 1,2; Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 25; Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 1,2; Glicose 5,6 e 3mM de ácido ascórbico), gaseificados com mistura carbogênica: 95% O₂ e 5% CO₂, e com pH 7,4 a 27 °C, uma vez que esta temperatura é frequentemente usada para experimentos de tecido de réptil (CAMPOS *et al.*, 2020; CAMPOS *et al.*, 2019). Após 30 min de incubação, uma alíquota com 1 mL do sobrenadante foi transferida para um

tubo âmbar e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente, esfregando suavemente as artérias com uma pinça.

Figura 06 – Representação do sistema de banho para órgãos isolados com solução de Krebs-Henseleit.



Fonte: Créditos ao autor (2021).

4.4 Preparo das amostras

A 6-ND foi extraída de 1 mL de solução de Krebs-Henseleit por extração em fase sólida (SPE). Os calibradores, controles de qualidades (CQ) e as amostras foram enriquecidos com 50 μL de solução de padrão interno (PI), a 6-nitrodopamina-d4 100 ng/mL. Os cartuchos de extração foram condicionados com 1 mL de metanol e, em seguida, equilibrados com 2 mL de água deionizada. As amostras foram transferidas para os cartuchos de extração e lavadas três vezes com água deionizada. Em seguida foram eluídas com 0,9 mL de metanol / água deionizada (90/10, v/v) + ácido fórmico 0,1% seguido de evaporação sob fluxo de nebulização (N₂) a 50 °C.

4.5 Padrões de calibração e controles de qualidade

As soluções estoques de 6-ND e da 6-nitrodopamina-d4 foram preparadas em acetonitrila / água (20/80, v/v). As curvas de calibração (duplicata) foram preparadas por adição de 6-ND em solução de Krebs-Henseleit para gerar as concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 ng/mL. Os CQs foram preparados nas concentrações baixa, média 1, média 2 e alta de 0,3, 1,5, 9,0 e 15,0 ng/mL de 6-ND na solução de Krebs-Henseleit.

A curva de calibração consistiu em duas amostras branco (amostra de matriz processadas sem PI), duas amostras zero (amostra de matriz processada com PI), e 8 concentrações diferentes de padrão de calibração cobrindo a faixa prevista das concentrações a serem quantificadas.

4.6 Padrões e reagentes

Os padrões da 6-ND (analito) e 6-nitrodopamina-d4 (padrão interno) foram adquiridos da Toronto Research Chemicals (TRC, North York, Canadá). Os ácidos ascórbicos e trifluoroacético foram adquiridos da Sigma - Aldrich Chemicals Co. (Missouri, EUA). O NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄ e a glicose foram adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). A acetonitrila e o metanol foram obtidos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A água foi obtida a partir do sistema de purificação de Sinergia UV[®] (Millipore, Molsheim, França).

4.7 Análise cromatográfica

A quantificação da 6-ND na solução de Krebs-Henseleit foi realizada por LC-MS / MS, que constituiu em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Nexera acoplado a um espectrômetro de massas modelo LCMS-8060 triplo quadrupolo (Shimadzu, Kyoto, Japão).

O sistema de HPLC era formado por um auto injetor (modelo SIL- 30AC), uma bomba binária LC-30AD e um forno de coluna CTO-20AC. A 6-ND foi separada em uma coluna Shim-pack GIST-HP C18 de 150 mm x 3,0 mm, tamanho de partícula de 3 µm (Shimadzu, Duisburg, Alemanha) usando 75 % da fase móvel A consistindo em água deionizada com 0,1 % de ácido fórmico (v/v) e 25 % da fase móvel B consistindo

em uma mistura acetonitrila / água deionizada (50/50, v / v) + 0,1 % de ácido fórmico a uma taxa de fluxo de 350 µL/min. A temperatura da coluna e do auto injetor foram mantidas em 65 e 8 °C, respectivamente.

O sistema de detecção MS/ MS foi equipado com uma interface (ionização) por eletronebulização (ESI) operando no modo íon positivo. A voltagem capilar no ESI foi ajustada em 4,0 kV, temperatura de dessolvatação em 250 °C, fluxo de gás do nebulizador em 3,0 L/min, temperatura do bloco de aquecimento em 400 °C, fluxo de gás de secagem em 10 L/min. A voltagem do cone foi de 5 V e a energia de colisão foi de 15 V para a 6-ND e 6-nitrodopamina-d4. As análises foram realizadas no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 203,10 > 186,00 para a 6-ND e 199,10 > 181,95 para a 6-nitrodopamina-d4. A aquisição e quantificação dos dados foram feitas no software LabSolutions, versão 5.0 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

4.8 Validação do método

O método para análise da 6-ND foi validado de acordo com as recomendações do Food and Drug Administration (FDA, 2018) dos Estados Unidos e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011).

4.8.1 Seletividade

As amostras branco de solução de Krebs-Henseleit (N=6) foram testadas individualmente, quanto as interferências usando o preparo de amostra e as condições descritas anteriormente e comparadas com os resultados obtidos do limite inferior de quantificação (LIQ). O LIQ foi definido levando-se em conta a sensibilidade, a precisão e a exatidão do método.

4.8.2 Carryover

O *carryover* pode ser determinado como um crescimento da concentração em uma amostra, oriunda de resquícios da amostra antecedente, provavelmente, existentes no injetor, *liner*, coluna e detector (CAMARGO, 2008). O *carryover* foi avaliado usando o limite superior de quantificação (LSQ) preparado em solução de

Krebs-Henseleit branco (6-ND 20,0 ng/mL). Amostras de solução de Krebs-Henseleit branco extraídas (triplicata) foram injetadas imediatamente após a injeção da amostra LSQ. Assim, o *carryover* foi avaliado comparando o sinal das amostras de solução de Krebs-Henseleit branco injetadas após a amostra LSQ com o sinal da amostra LIQ. Os limites de sinal podem ser $\leq 20\%$ para analitos e $\leq 5\%$ para PIs.

4.8.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, ou seja, o analito. A linearidade das curvas de calibração (0,1 - 20,0 ng/mL em duplicata) foi determinada traçando a proporção da área do pico da 6-ND / PI versus concentração nominal da 6-ND. As curvas de calibração foram construídas por regressão linear de mínimos quadrados ponderados ($1/x$). O coeficiente de correlação linear deve ser $\geq 0,98$.

A linearidade da curva de calibração foi desenvolvida conforme os critérios a seguir:

- desvio menor ou igual a 20 % em relação a concentração nominal para o LIQ;
- desvio menor ou igual a 15 % em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- no mínimo 75 % dos pontos da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo pelo menos uma das réplicas do LIQ e do LSQ.

4.8.4 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e a exatidão do método analítico desenvolvido utilizaram-se no mínimo três concentrações distintas, na faixa de concentrações esperadas, onde se avaliou o uso de sete determinações para cada concentração. A precisão e a exatidão foram avaliadas com base numa mesma corrida (intra-corrída), que define aqueles parâmetros durante uma única corrida analítica; e com base em corridas diferentes (intercorrida), que mensura a variabilidade entre os dias.

Sete alíquotas de LIQ e todas as amostras de CQ (0,3, 1,5, 9,0 e 15,0 ng/mL) foram analisadas em três lotes de validação em três dias diferentes. A precisão inter e intra-corrídas foi determinada como coeficiente de variação (% CV) e a exatidão como o erro relativo percentual (% RE). Os valores de CV não devem exceder 15 %

para cada CQ e 20 % para LIQ e a exatidão deve estar dentro da faixa de 85 - 115 % dos valores reais para CQ e dentro da faixa de 80 - 120 % para amostras LIQ.

4.8.5 Efeito da matriz e recuperação

O efeito da matriz foi avaliado comparando as áreas dos picos da 6-ND (0,3 e 15,0 ng/mL) e PI injetados diretamente na fase móvel, com as áreas de pico geradas a partir das soluções padrão adicionadas aos extratos de solução de Krebs-Henseleit (N = 3). Cada amostra foi obtida por um fator de matriz normalizado por PI (FMN) de acordo com a seguinte fórmula: $FMN = (\text{resposta da 6-ND na matriz} / \text{resposta do PI na matriz}) / (\text{resposta da 6-ND em solução} / \text{resposta do em solução PI})$. O CV dos FMNs para todas as amostras deve ser < 15 %. A recuperação da extração analítica foi determinada em triplicata comparando as áreas dos picos de 6-ND de duas amostras de CQ extraídas (0,3 e 15,0 ng/mL) com as áreas dos picos obtidos de soluções padrão adicionadas a extratos de solução de Krebs-Henseleit nas mesmas concentrações.

4.8.6 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de curta duração, após 3 ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento. Para a avaliação da estabilidade de curta duração os CQs (0,3 e 15,0 ng/mL) foram mantidos na bancada do laboratório em temperatura ambiente durante 6 h. Para verificar a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, os CQs foram congelados a -20°C por pelo menos 24 h, a seguir foram descongelados e congelados novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de congelamento quando foram extraídos e analisados. Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, os CQs extraídos foram mantidos no auto injetor a 8 °C durante 53 h antes da injeção no sistema cromatográfico.

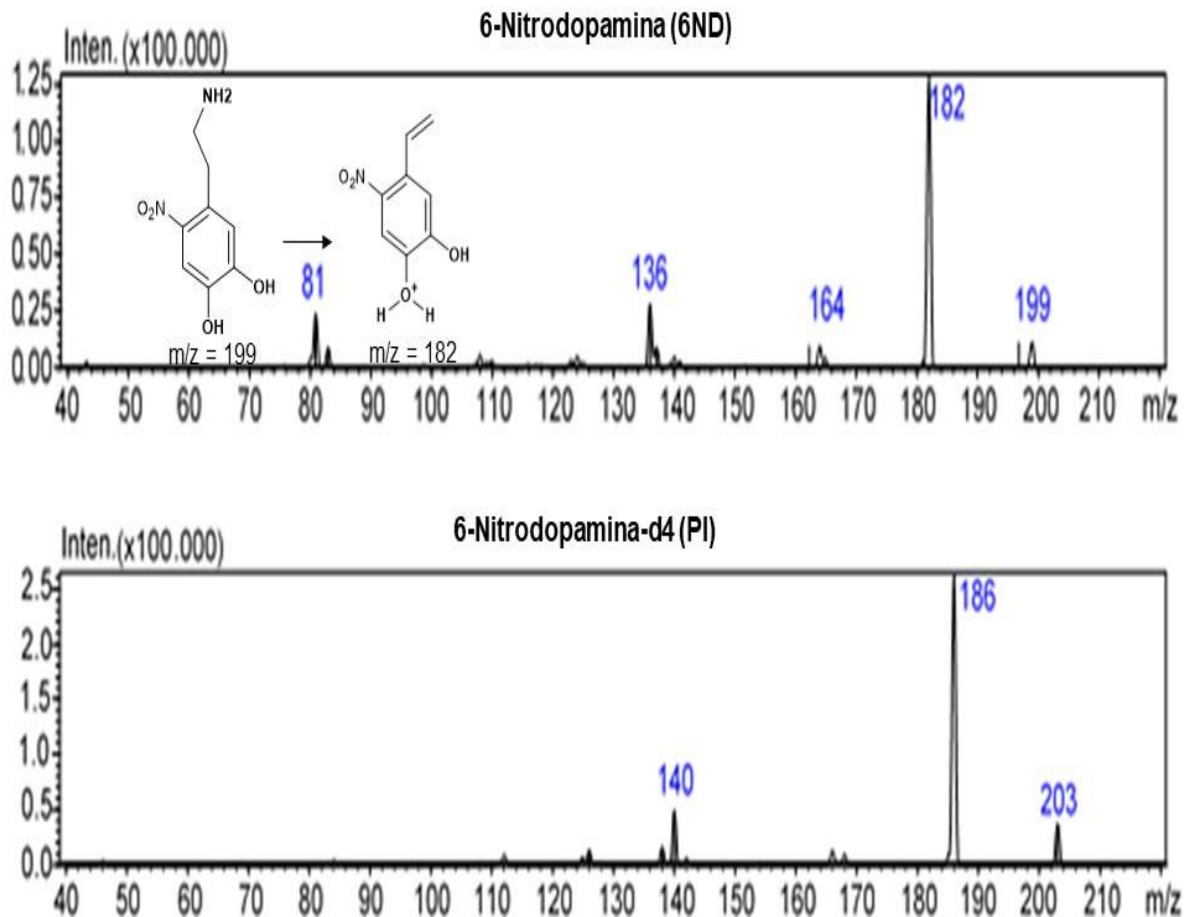
4.9 Análise dos dados

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média do número de experiências (N = 6). O teste t de Student pareado foi usado e o valor de p <0,05 foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

O presente estudo mostra, pela primeira vez, um método seletivo e sensível para análise de 6-ND em amostras de solução de Krebs-Henseleit após incubação em anéis aórticos de *Chelonoidis carbonaria*, usando LC-MS/MS e SPE. Os espectros de massas para 6-ND e PI são apresentados na figura 07. O tempo total da corrida foi de 3,5 min e o tempo de retenção foi $1,784 \pm 0,3$ para 6-ND e 6-nitrodopamina-d4 (Figura 08).

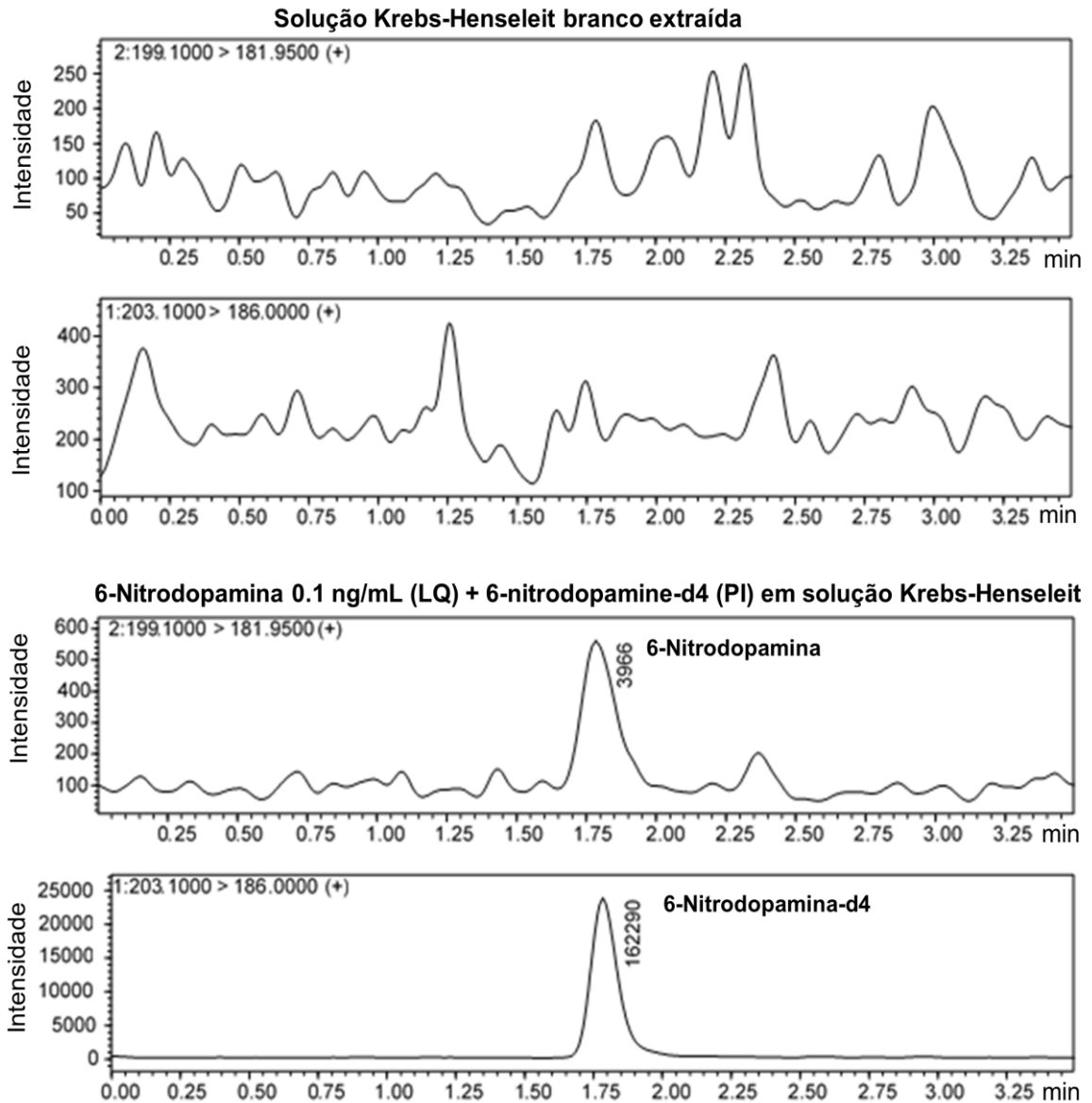
Figura 07 – Espectros de massas do íon molecular protonado e produto.



Fonte: Créditos ao autor (2021).

Legenda: Espectros de massas do íon molecular protonado ($m/z = 199$) e produto ($m/z = 182$) da 6-nitrodopamina e íon molecular protonado ($m/z = 203$) e produto ($m/z = 186$) da 6-nitrodopamina-d4 adquiridos na ionização por eletronebulização operando em modo positivo.

Figura 08 - Cromatogramas obtidos na análise da 6-nitrodopamina.



Fonte: Créditos ao autor (2021).

Legenda: Solução de Krebs-Henseleit branco e solução de Krebs-Henseleit branco enriquecida com 6-nitrodopamina a 0,1 ng / mL e 6-nitrodopamina (padrão interno).

5.1 Validação

5.1.1 Seletividade

O método demonstrou seletividade pela ausência de interferência endógena na quantificação da 6-ND nas amostras testadas.

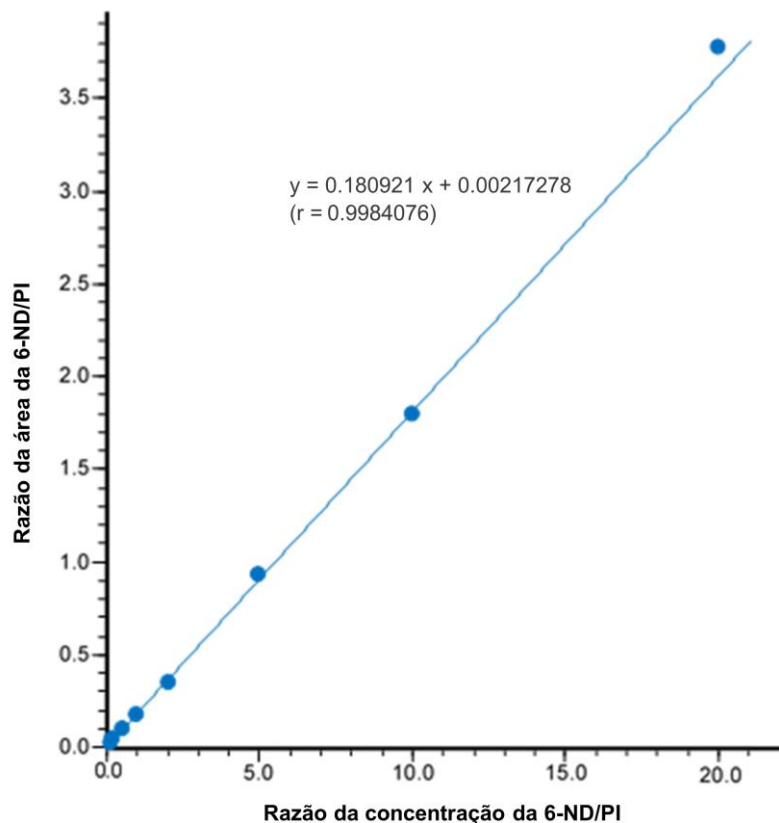
5.1.2 Carryover

Não foi observado nenhum pico nas amostras branco analisadas diretamente após a análise da amostra de alta concentração. Além disso, nenhuma interferência significativa foi encontrada no tempo de retenção de 6-ND e 6-nitrodopamina-d4.

5.1.3 Linearidade

A curva de calibração da 6-ND mostrou linearidade na faixa de concentrações de 0,1 - 20,0 ng/mL. O coeficiente de correlação foi superior a 0,99 (Figura 09).

Figura 09 – Curva de calibração da 6-nitrodopamina (6-ND). PI=padrão interno.



Fonte: Créditos ao autor (2021).

5.1.4 Exatidão e precisão

A precisão intra e inter-corridas (% CV) e exatidão (% RE) foram <14,9% e 93,2 - 103,7%, respectivamente (Tabela 01), garantindo a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados.

Tabela 01 - Dados de precisão e exatidão de 6-nitrodopamina em solução de Krebs-Henseleit.

Parâmetros	6-Nitrodopamina (ng/mL)				
	LIQ	CQ	CQ	CQ	CQ
	(0.1)	(0.3)	(1.5)	(9.0)	(15.0)
Intra-corrída					
Média (n=7)	0.104	0.3	1.4	8.78	14.6
Precisão (% CV)	12.7	5.8	4.8	2.4	4.3
Exatidão (%)	103.7	94.3	94.7	97.5	97.2
Inter-corrídas					
Média (n=21)	0.104	0.3	1.4	8.9	14.8
Precisão (% CV)	14.9	6.3	4.4	2.6	4.2
Exatidão (%)	103.6	93.2	93.8	98.5	98.3

Fonte: Créditos pelo autor (2021).

Legenda: %CV: coeficiente de variação; QC: controle de qualidade; LIQ: limite inferior de quantificação.

5.1.5 Efeito de matriz

Nenhum efeito de matriz significativo na ionização da 6-ND e do PI foi observado (Tabela 02).

Tabela 02 – Efeito da matriz para 6-nitrodopamina em solução de Krebs-Henseleit

6-Nitrodopamina	FMN	CV (%)
0.3 ng/mL (n = 5)	1.08	9.0
15.0 ng/mL (n = 5)	1.04	13.3

Fonte: Créditos pelo autor (2021).

Legenda: FMN = fator de matriz normalizado por padrão interno [(resposta do analito na matriz / padrão interno resposta matriz) / (resposta do analito na solução / resposta do padrão interno)]; CV = coeficiente de variação [(desvio padrão FMN / FMN médio) x 100].

5.1.6 Estabilidade

A 6-ND mostrou estabilidade na solução de Krebs-Henseleit após 6 h em temperatura ambiente, após três ciclos de congelamento e descongelamento, e após

processamento no auto injetor por 53 h a 8°C (Tabela 03), conforme mostrado por CV e precisão inferior de 9,9%.

Tabela 03 - Dados da estabilidade da 6-nitrodopamina em solução de Krebs-Henseleit.

Estabilidade	Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Recém preparado			
0.3 ng/mL	0.3	9.9	100.0
15.0 ng/mL	14.7	4.6	98.0
Curta duração (6 h)			
0.3 ng/mL	0.298	5.8	99.3
15.0 ng/mL	14.9	0.9	99.3
Congelamento / descongelamento (3 ciclos)			
0.3 ng/mL	0.31	8.9	100.3
15.0 ng/mL	14.7	3.6	98.0
Pós-processamento (53 h a 8°C)			
0.3 ng/mL	0.3	6.9	100.3
15.0 ng/mL	15.0	3.1	100.0

Fonte: Créditos pelo autor (2021).

Legenda: CV%: coeficiente de variação $[(DP / média) \times 100]$; % De precisão = $[(E / T) \times 100]$; E, concentração determinada experimentalmente; T, concentração teórica; QC, controle de qualidade.

5.1.7 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado para quantificação da liberação basal de 6-ND de aortas de *Chelonoidis carbonaria in vitro*. A tabela 04 mostra as concentrações de 6-ND liberada da aorta com e sem endotélio. A remoção do endotélio diminuiu a liberação de 6-ND da aorta, indicando que a tecido de *Chelonoidis*

carbonaria exibe uma liberação basal de 6-ND derivada do endotélio. Esta é a primeira evidência de liberação de 6-ND de um tecido biológico.

Tabela 04 - Concentração de 6-nitrodopamina em amostras de solução de Krebs-Henseliet após incubação de anéis aórticos de *Chelonoidis carbonária*.

Número da amostra	6-Nitrodopamina (ng/mL)	
	E+	E-
1	0.25	0.15
2	0.70	0.30
3	0.36	0.08
4	0.41	0.34
5	0.55	0.10
6	0.38	0.10
Média	0.44	0.18
Erro padrão da média	0.06	0.05
Valor de p	0.0076	

Fonte: Créditos pelo autor (2021).

Legenda: E+: Anéis da aorta com endotélio intacto; E-: Anéis da aorta sem endotélio.

6 DISCUSSÃO

As ferramentas cromatográficas de análise apresentam-se como as relevantes técnicas de separação, principalmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, como por exemplo, fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio e outras. Isto se deve, sobretudo, à sua habilidade de separação dos itens presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas (LANÇAS 2009).

O presente método foi realizado com base em um estudo anterior do nosso grupo, no qual foi realizada a quantificação de DA, NOR e ADR por LC-MS/MS em solução de Krebs-Henseleit de anéis aórticos de *Chelonoidis carbonaria in vitro* (BRITTO-JÚNIOR *et al.*, 2020). Em contrapartida, neste estudo, os cartuchos Strata™-X foram usados como sorvente para a preparação da amostra, em vez de adicionar óxido de alumínio (Al₂O₃) diretamente nas amostras. Usando esses cartuchos para extração da 6-ND resultou em recuperações médias de 95,49% e 92,16% para as amostras de QC baixo e alto, respectivamente. Quando extraído com Al₂O₃, a recuperação foi muito menor (29,70% e 17,46% para amostras de CQ baixo e alto, respectivamente).

A introdução de um grupo nitro, um substituinte de remoção de elétrons, no anel de catecol aromático, diminui tanto a protonação quanto as constantes de formação do complexo Al (III) dos ligantes substituídos devido a seus efeitos indutivos e de ressonância, que diminuem fortemente a basicidade dos dois fenólicos grupos em catecol (NURCHI *et al.*, 2009). O grupo nitro também diminui o componente covalente levando a afinidade de ligação mais baixa (TORRE *et al.*, 2018).

Os cartuchos Strata™-X também foram testados para extração de catecolaminas e as recuperações médias foram 94,15% e 93,64% para amostras de CQ de dopamina baixo e alto, 98,97% e 95,03% para amostras de CQ de NOR amostras de baixo e alto CQ de ADR, e 100,02% e 92,40% para baixo e alto. Estes resultados mostram que os cartuchos Strata™-X podem ser usados para preparação de amostras de catecolaminas.

As catecolaminas foram separadas em uma coluna Lichrospher RP-8 de 100 x 4,6 mm usando como dispositivo móvel fase acetonitrila / água (90/10, v/v) + hidróxido de amônio 2,5 mM a um fluxo de 1,3 mL / min no estudo anterior. Neste trabalho, 6-ND foi separada em uma coluna Shim-pack GIST-HP C18 de 150 mm x 3,0 mm,

tamanho de partícula de 3 µm, usando 75% da fase móvel A consistindo em água desionizada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e 25% de fase móvel B consistindo em acetonitrila / água deionizada (50/50, v/v) + 0,1% de ácido fórmico a um de fluxo de 350 µL/min. As condições cromatográficas utilizadas no presente estudo geraram um tempo retenção de 1,78 min, enquanto o anterior resultou em tempo de retenção de 4,75 min. Como feito para as catecolaminas, o ácido ascórbico 3 mM foi adicionado à solução de Krebs-Henseleit para prevenir a oxidação da 6-ND (BRITTO-JÚNIOR et al., 2020; OENE *et al.*, 1983).

A determinação precisa das catecolaminas em amostra biológica, é um obstáculo, pois elas são de fácil oxidação e possuem estruturas instáveis (XIE et al., 2018). Em um outro estudo, foi visto que as células da camada endotelial são aptas a sintetizar e liberar catecolaminas em resposta à hipóxia quando avaliado *in vitro* e para isquemia *in vivo* (SORRIENTO *et al.*, 2012). A 6-ND foi extraída por SPE, um protocolo bastante utilizado para determinar catecolaminas de diversas amostras, como por exemplo: soro, urina e plasma, que mostraram resultados aceitáveis (JI *et al.*, 2010; LI; LI; KELLERMANN, 2016; PETTEYS et al., 2012; YU *et al.*, 2019).

A DA foi determinada em plasma neonatal humano por LC-MS / MS e em seguida derivatizada com anidrido propiônico, resultando em um LIQ de 10,0 pg/mL (ZHANG et al., 2016). A NOR e a ADR foram quantificadas no plasma humano por LC-MS / MS em combinação com SPE à base de alumina e um procedimento de derivatização com LIQ de 20,0 pg/mL para NOR e 5,0 pg/mL para ADR (ZHANG et al., 2012). A 6-ND foi previamente extraída no cérebro de rato através da detecção por uma reação de quimioluminescência de peroxioxalato por cromatografia líquida de alta eficiência, mas a reprodutibilidade (<10 %) não era confiável e não foi quantificada (TSUNODA *et al.*, 2007). As catecolaminas possuem papel relevante na regulação do sistema vascular e respiratório em répteis. Foi verificado em *Chrysemys picta bellii* (tartaruga-pintada) o aumento dos níveis circulantes de catecolaminas, especialmente NOR submetidas durante um protocolo de anóxia. Além disso, foi visto que as catecolaminas desempenham um papel na mediação do aumento da glicose no sangue podendo ser um fator significativo na manutenção da viabilidade do tecido (WASSER; JACKSON, 1991).

Há pouco tempo, foi publicado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando a LC-MS/MS que as curvas de calibração para DA, NOR e ADR foram lineares para as concentrações de 0,1-10,0 ng/mL e tendo com uma correlação de coeficiente maior

que 0,99 e LIQ foi 0,1 ng/mL. Ainda, o receptor do tipo D2 antagonista inibiu as contrações induzidas por estimulação do campo elétrico, indicando assim que as catecolaminas são também liberadas no endotélio vascular de aortas de *Chelonoidis carbonaria* (BRITTO-JÚNIOR *et al.*, 2021).

Outro resultado relevante publicado pelo nosso grupo de pesquisa, foi verificado no tecido humano em endotélio de VUH e na AUH a liberação de 6-ND por LC-MS / MS, obtendo curva de calibração linear para concentrações de 0,1–10 ng/mL e com o coeficiente de correlação superior a 0,99. Além disso, a 6-ND está supostamente atuando como um antagonista dopaminérgico, com seletividade para o receptor D2 (BRITTO-JÚNIOR *et al.*, 2021).

Pesquisas futuras ainda são necessárias para o melhor entendimento da 6-ND, nesse sentido, as perspectivas de estudo são importantes para a caracterização da ação farmacológica em aortas de répteis (*chelonoidis carbonaria* e *corn snakes*) e em vasos de cordões umbilicais humanos.

7 CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado para quantificação da 6-ND por LC-MS / MS em solução de Krebs-Henseleit se mostra sensível, preciso e exato o suficiente para sua aplicação na medida da liberação basal em aorta de *Chelonoidis carbonaria in vitro*. Foi demonstrado ainda, a liberação basal de 6-ND derivada do endotélio. Corroborando a isso, a continuação e validação de protocolos farmacológicos tradicionais é de grande valia, pois proporciona um melhor entendimento, descobertas de novos mediadores e uma melhor compressão para possíveis tratamentos patológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Jacqueline Querino. **Complexos rutênio-catecolaminas como moduladores da angiogênese. Aspectos químicos e biológicos da relação estrutura-atividade.** 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, São José dos Campos, 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RE N° 899**, 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b>. Acesso em: 17 de setembro de 2020.

BAHIA, L. et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v 50, n. 2, p.291-303, 2006.

BARROS, M. S et al. Morphological variations and sexual dimorphism in *Chelonoidis carbonaria* (Spix, 1824) and *Chelonoidis denticulata* (Linnaeus, 1766) (Testudinidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 153-161, 2012.

BENNETT, H. S; LUFT, J. H; HAMPTON, J. C. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v 196, n. 2, p.381-390, 1959.

BRITTO-JÚNIOR, et al. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels. **Pharmacology research & perspectives**, v. 8, n. 4, p. e00612, 2020.

BRITTO-JÚNIOR, J et al. Determination of dopamine, noradrenaline and adrenaline in Krebs-Henseleit's solution by liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry. Measurement of basal release from *Chelonoidis carbonaria* aortae in vitro. **Biomedical Chromatography**, p. e4978, 2020.

BRITTO-JÚNIOR, J et al. The basal release of endothelium-derived catecholamines regulates the contractions of *Chelonoidis carbonaria* aorta caused by electrical-field stimulation. **Biology Open**, v. 10, n. 1, 2021.

BRITTO-JÚNIOR, J et al. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. **Life Sciences**, p. 119425, 2021.

CAMARGO, SPS. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de canabidiol e tetraidrocannabinol em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas.** 2008. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Universidade de São Paulo, 2008.

CAMPOS, R et al. Endothelium modulates electrical field stimulation-induced contractions of *Chelonoidis carbonaria* aortic rings. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 233, p. 108763, 2020.

CAMPOS, R et al. Pharmacological and transcriptomic characterization of the nitric oxide pathway in aortic rings isolated from the tortoise *Chelonoidis carbonaria*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 222, p. 82-89, 2019.

CARDOSO, F. A et al. Endotélio vascular: Parte I: função e propriedade. **Revista de Ciências Médicas**, v 3, n. 3, p. 76-84, 1994.

CARVALHO, M. H. C et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.

CRID. Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias da Universidade de São Paulo. **A Aterosclerose**, 2014. Disponível em: < <http://crid.fmrp.usp.br/site/2014/11/04/a-aterosclerose/>>. Acesso em: 18 de setembro de 2020.

CHIANG, W. C et al. Fast and simple screening for the simultaneous analysis of seven metabolites derived from five volatile organic compounds in human urine using on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 132, p. 469-478, 2015.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHIARI, A. et al. Formation of 6-nitro-norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. **Neuroscience**, v. 101, n. 1, p. 189-196, 2000.

DAUBNER, S. C; LE, T; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 1, p. 1-12, 2011.

FALUDI, A. A al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose, Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2017. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017.

DRIGO, Lilian Costa. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de anti-hipertensivos em amostras de estudos de permeação em células caco-2 utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2013. Dissertação (Mestre em Química) - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FARIAS, I. P et al. Population genetics of the Amazonian tortoises, *Chelonoidis denticulata* and *C. carbonaria*, (Cryptodira: Testudinidae) in an area of sympatry. **Amphibia-Reptilia**, v. 28, n. 3, p. 357-365, 2007.

FÉLÉTOU, M. The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators. In: **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function**. Morgan & Claypool Life Sciences, 2011. p. 1-306.

FÉLÉTOU, M; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture). **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, p. H985-H1002, 2006.

FERES, Marcia Cristina. **Catecolaminas plaquetárias e LDL oxidada em indivíduos com apneia obstrutiva do sono**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2014.

FERNSTROM, J. D; FERNSTROM, M. H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1539S-1547S, 2007.

FDA, U. S. et al. Bioanalytical method validation guidance for industry. **US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine**, 2018. Disponível em: < <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>>. Acesso em: 18 de setembro de 2020.

FERREIRA, V. H. M et al. Distocia em Jabuti Piranga (*Chelonoidis carbonaria*) - relato de caso. **PUBVET**, v. 6, p. Art. 1478-1483, 2012.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

FUSTINONI, S et al. Methodological issues in the biological monitoring of urinary benzene and S-phenylmercapturic acid at low exposure levels. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 27, p. 2534-2540, 2010.

GARCIA FILHO, S. P. et al. Estrutura, ultraestrutura e morfometria da aorta de paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) criada em cativeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 599-605, 2012.

GHISI, G. L. M al. Physical exercise and endothelial dysfunction. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 95, n. 5, p. e130-e137, 2010.

GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Endothelial functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 9, p. e108-e114, 2017.

GOLDSTEIN, D. Noradrenergic Neurotransmission. **Primer on the Autonomic Nervous System**, p. 37–43, 2012.

GONÇALVES, E. S et al. Estratégias analíticas com cromatografia e espectrometria de massas para biomonitorização da exposição ao benzeno pela determinação do ácido S-fenilmercaptúrico urinário. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, n. 1, p. 1-14, 2017.

GUTSTEIN, D. E et al. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. **Journal of cell science**, v. 116, n. 5, p. 875-885, 2002.

HEINZ, A. et al. Clinical aspects and follow-up of dopamine-induced psychoses in continuous dopaminergic therapy and their implications for the dopamine hypothesis of schizophrenic symptoms. **Der Nervenarzt**, v. 66, n. 9, p. 662, 1995.

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular research**, v. 32, n. 4, p. 687-698, 1996.

JI, C et al. Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC–MS/MS. **Analytica chimica acta**, v. 670, n. 1-2, p. 84-91, 2010.

JOYNER, M. J.; LIMBERG, J. K. Blood pressure: return of the sympathetics?. **Current hypertension reports**, v. 18, n. 1, p. 7, 2016.

JUSTO, Alberto Fernando Oliveira. **Papel do endotélio na contração induzida por campo elétrico em aorta de *Crotalus durissus terrificus* (cascável) e *Bothrops jararaca* (jararaca) e evidência da síntese de catecolamina no endotélio humano**. 2020. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2020.

KVETNANSKY, R.; SABBAN, E. L.; PALKOVITS, M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. **Physiological reviews**, v. 89, n. 2, p. 535-606, 2009.

LANÇAS, FM. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LI, X. S.; LI, S.; KELLERMANN, G. An integrated liquid chromatography–tandem mass spectrometry approach for the ultra-sensitive determination of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells to assess neural-immune communication. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 54-61, 2016.

LIMA, Diogo Borges. **Método computacional para identificação de peptídeos marcados com fenil-isotiocianato e analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem**. 2013. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Sistemas e Computação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

MATIAS, C. A. R al. Aspectos fisiopatológicos da retenção de ovos em Jabutipiranga (*Geochelone carbonaria* Spix, 1824). **Ciencia Rural**, v. 36, n. 5, p. 1494-1500, 2006.

MEIRELES, Yara Silva. **Caracterização ultrassonográfica dos órgãos da cavidade celomática Pdo jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonaria* SPIX, 1824)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2014.

MELO, S. E. S. F. C et al. Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo. **Rev Bras Hipertens**, v. 14, n. 4, p. 234-238, 2007.

MERCADANTE, A. A. RAJA, A. **Anatomy Arteries. StatPearls [Internet]**. 2020.

NAPOLITANO, A.; PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M. Oxidation of the neurotoxin 6-nitrodopamine and related 4-nitrocatechols under biomimetic conditions. **Tetrahedron**, v. 56, n. 32, p. 5941-5945, 2000.

NURCHI VM et al. "Effect of substituents on complex stability aimed at designing new iron (III) and aluminum (III) chelators." **Journal of inorganic biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 227-236, 2009.

OENE, J. C. V et al. The purported dopamine agonist DPI inhibits [3H] noradrenaline release from rat cortical slices but not [3H] dopamine and [14C] acetylcholine release from rat striatal slices in-vitro. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 35, n. 12, p. 786-792, 1983.

OISHI, J. C et al. Disfunção Endotelial e Inflamação Precedem a Elevação da Pressão Arterial Induzida por Dieta Hiperlipídica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 6, p. 558-567, 2018.

PAGAN, L. U.; GOMES, M. J.; OKOSHI, M. P. Endothelial function and physical exercise. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 111, n. 4, p. 540-541, 2018.

PALUMBO, A.; ASTARITA, G.; D'ISCHIA, M. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 6-nitrocatecholamines, putative reaction products of nitric oxide with catecholamines under oxidative stress conditions. **Biochemical Journal**, v. 356, n. 1, p. 105-110, 2001.

PALUMBO, A et al. Nitrite-and peroxide-dependent oxidation pathways of dopamine: 6-nitrodopamine and 6-hydroxydopamine formation as potential contributory mechanisms of oxidative stress-and nitric oxide-induced neurotoxicity in neuronal degeneration. **Chemical research in toxicology**, v. 12, n. 12, p. 1213-1222, 1999.

PEREIRA, M. C.; RIBEIRO, L. Stresse, catecolaminas e risco cardiovascular. **Arquivos de Medicina**, v. 26, n. 6, p. 245-253, 2012.

PETTEYS, B J. et al. Performance characteristics of an LC–MS/MS method for the determination of plasma metanephrines. **Clínica Chimica Acta**, v. 413, n. 19-20, p. 1459-1465, 2012.

PITTHAN, E.; MARTINS, O. M. O.; BARBISAN, J. N. Novos biomarcadores inflamatórios e de disfunção endotelial: predição de risco cardiovascular. **Rev AMRIGS**, v. 58, n. 1, p. 69-77, 2014.

RANG, H. P et al. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 174-18.

RISAU, W. Differentiation of endothelium. **The FASEB journal**, v. 9, n. 10, p. 926-933, 1995.

SHEDLOCK, A M.; EDWARDS, S. V. Amniotes (amniota). **The timetree of life**, v. 375, p. 379, 2009.

SILVA, Suzane Rosa da. **Planejamento, síntese e caracterização de análogos da dopamina**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2020.

SOROP, O. et al. The microcirculation: a key player in obesity-associated cardiovascular disease. **Cardiovascular research**, v. 113, n. 9, p. 1035-1045, 2017.

SORRIENTO, D et al. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. **Hypertension**, v. 60, n. 1, p. 129-136, 2012.

STORCH, A. S et al. Métodos de investigação da função endotelial: Descrição e suas aplicações. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262-273, 2017.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World journal of cardiology**, v. 7, n. 11, p. 719, 2015.

TORRE, G. D et al. Tuning the affinity of catechols and salicylic acids towards Al (III): characterization of Al–chelator interactions. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 29, p. 9592-9607, 2018.

TSUNODA, M et al. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1-2, p. 162-166, 2007.

VERSARI, D et al. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. **British journal of pharmacology**, v. 157, n. 4, p. 527-536, 2009.

VIEIRA, J. G. H.; NAKAMURA, O. H.; CARVALHO, V. M. Dosagem de cortisol e cortisona livres urinários empregando cromatografia líquida associada a

espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 2, p. 291-298, 2005.

WASSER, J. S; JACKSON, D. C. Effects of anoxia and graded acidosis on the levels of circulating catecholamines in turtles. **Respir Physio**, v. 84, p. 363–377, 1991. Doi: [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(91\)90130-B](https://doi.org/10.1016/0034-5687(91)90130-B).

WIDMER, R. J.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. **Global Cardiology Science and Practice**, v. 2014, n. 3, p. 43, 2014.

XIE, L et al. A convenient method for extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography of catecholamine neurotransmitters and their metabolites. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 133, p. e56445, 2018.



YU, S et al. Validation of an improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for rapid and simultaneous analysis of plasma catecholamine and their metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 1129, p. 121805, 2019.

ZHANG, Daping et al. Quantitative determination of dopamine in human plasma by a highly sensitive LC–MS/MS assay: application in preterm neonates. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 117, p. 227-231, 2016.



ZHANG, Guodong et al. Ultra sensitive measurement of endogenous epinephrine and norepinephrine in human plasma by semi-automated SPE-LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 895, p. 186-190, 2012.

ZENG, C et al. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. **Physiological Genomics**, v. 19, n. 3, p. 233-246, 2004.

ANEXO A – CERTIFICADO DO CEUA

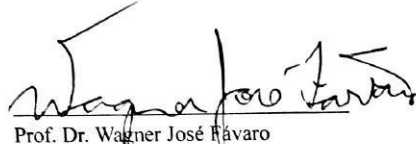

INTRANET IB	https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/certific...
	
CERTIFICADO	
<p>Certificamos que a proposta intitulada Avaliação do papel do endotélio como fonte de catecolamina em Chelonoidis sp., registrada com o nº 5265-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto De Nucci e Felipe Fernandes Jacintho, Rafael Campos, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo <i>Chordata</i>, subfilo <i>Vertebrata</i> (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.</p>	
Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/05/2019 a 25/03/2029
Vigência da autorização para manipulação animal:	29/05/2019 a 25/03/2029
Espécie / linhagem/ raça:	Réptil** / Chelonoids sp
No. de animais:	10
Idade/Peso:	30.00 Anos / 3.00 Kilos
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Réptil** / Chelonoids sp
No. de animais:	10
Idade/Peso:	30.00 Anos / 3.00 Kilos
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Réptil** / Chelonoidis sp
No. de animais:	10
Idade/Peso:	30.00 Anos / 3.00 Kilos
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Réptil** / Chelonoidis sp
No. de animais:	10
Idade/Peso:	30.00 Anos / 3.00 Kilos
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	Os animais serão adquiridos no Parque Ecológico do Tietê e serão utilizados para fins experimentais no mesmo dia da sua chegada, permanecendo menos de 24 horas no laboratório de Farmacologia.
Biotério onde serão mantidos os animais:	-Não se aplica-

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 14:52

1 of 2

RET IB

<https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/certific...>Campinas, 29 de maio de 2019.
Prof. Dr. Wagner José Fávoro
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.

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 20910-11	Data da Emissão: 27/04/2020 08:45:32	Data da Revalidação*: 01/03/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gilberto De Nucci	CPF: 868.134.478-15
Título do Projeto: Avaliação, ex vivo, do trato urogenital de <i>Chelonoidis carbonaria</i> .	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Retirada de tecidos e retomada de estudos na Unicamp	04/2020	04/2021
2	Seleção dos animais e início do tratamento	08/2009	08/2009
3	início do tratamento	09/2009	09/2009
4	Retirada de tecidos e estudos na Unicamp	10/2012	12/2012
5	Retirada de tecidos e estudos na Unicamp	06/2011	07/2011
6	Retirada de tecidos e estudos na Unicamp	08/2011	09/2011
7	Retirada de tecidos e estudos na Unicamp	07/2012	09/2012
8	Retirada de tecidos, análise de resultados e finalização dos estudos	01/2013	07/2013
9	Retirada de tecidos e estudos na Unicamp	10/2011	12/2011
10	Retirada de tecidos e estudos na Unicamp	04/2012	06/2012
11	Retirada de tecidos e estudos na Unicamp	01/2012	03/2012
12	Retirada de tecidos e retomada dos estudos na Unicamp	04/2015	03/2016
13	Retirada de tecidos e retomada dos estudos na Unicamp	08/2013	08/2014
14	Retirada de tecidos e retomada de estudos na unicamp	03/2016	03/2017
15	Retirada de tecidos e retomada de estudos na unicamp	05/2017	05/2018
16	Retirada de tecidos e retomada de estudos na unicamp	03/2019	03/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Renata Lopes Rodrigues	Executor	368.601.738-58	Brasileira
2	Rafael de Moraes Campos	Executor / Médico Veterinário	020.678.733-26	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0209101120200427

Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 20910-11	Data da Emissão: 27/04/2020 08:45:32	Data da Revalidação*: 01/03/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gilberto De Nucci	CPF: 868.134.478-15
Título do Projeto: Avaliação, ex vivo, do trato urogenital de Chelonoidis carbonaria.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Observações e ressalvas

5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Unicamp	Campinas-SP	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Univap	São José dos Campos-SP	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chelonoidis carbonaria	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0209101120200427

Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 20910-11	Data da Emissão: 27/04/2020 08:45:32	Data da Revalidação*: 01/03/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gilberto De Nucci	CPF: 868.134.478-15
Título do Projeto: Avaliação, ex vivo, do trato urogenital de Chelonoidis carbonaria.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Répteis)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1		Outro

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0209101120200427

Página 3/4

ANEXO C – PRODUÇÕES REALIZADAS DURANTE O MESTRADO



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*

Rafael Campos^{a,b,1}, David Halen Araújo Pinheiro^{c,1}, José Britto-Júnior^d, Heleson Alves de Castro^f, Gustavo Duarte Mendes^{f,g}, Manoel Odorico Moraes^b, Maria Elisabete A. Moraes^b, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes-Martins^{d,e}, Natalícia J. Antunes^{d,*}, Gilberto De Nucci^{b,f,g}

^a Superior Institute of Biomedical Sciences, Ceará State University (UECE), Fortaleza, CE, Brazil

^b Clinical Pharmacology Unit, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil

^c Institute of Research and Development, University of Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, Brazil

^d Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^e Laboratório de Biofotônica e Terapêutica Experimental em Saúde e Estética, Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, Universidade Brasil, Itaquera, SP, Brazil

^f Faculty of Medicine, São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil

^g Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Metropolitan University of Santos, Santos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

6-nitrodopamine
LC-MS/MS
Solid phase extraction
Tortoise
Endothelium

ABSTRACT

In this study, the development and validation of a method for quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with positive ion electrospray ionization is described. Aortic rings taken from tortoise were either denuded or left with endothelium intact (15 mm, N = 6) and were incubated for 30 min in 5 mL Krebs-Henseleit's solution in an organ bath. Solid phase extraction (SPE) was performed for aliquots of 1 mL of the supernatant. The separation of 6-nitrodopamine was obtained on a 150 mm × 3 mm Shim-pack GIST-HP C18 column, using 75% of mobile phase A consisted of deionized water with 0.1% formic acid (v/v) and 25% of mobile phase B consisted of acetonitrile/deionized water (50/50, v/v) + 0.1% formic acid at a flow rate of 350 μL/min in an isocratic mode. The method was linear over the concentration range of 0.1–20 ng/mL. The method was sensitive, precise and accurate for the assessment of the basal release of 6-nitrodopamine from *Chelonoidis carbonaria* aortae *in vitro*. The mean ± SEM concentrations of 6-nitrodopamine released from endothelium-intact and endothelium-denuded aortae were 0.44 ± 0.06 ng/mL and 0.18 ± 0.05 ng/mL, respectively. These results indicate that tortoise's aortae display a basal endothelium-derived 6-nitrodopamine release.

1. Introduction

6-Nitrodopamine is a member of 6-nitrocatecholamines family and a putative product of the nitric oxide (NO)-dependent nitration of dopamine [1,2]. *In vitro*, 6-nitrodopamine inhibits neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity [2]. Tortoise *Chelonoidis carbonaria* aortic endothelium releases mediator(s) capable of modulating electrical field stimulation (EFS) induced spasmogenic activity [3], similarly shown in

human umbilical cord vessels (HUCV) [4]. *Chelonoidis carbonaria* aortic rings released dopamine, noradrenaline and adrenaline *in vitro* [5]. In humans, both umbilical arteries (HUA) and human umbilical vein vessels (HUV) also present a basal release of endothelium-derived dopamine [6]. Within the central nervous system (CNS), dopamine is a key neurotransmitter as well as being an important modulator of blood pressure, sodium balance, and renal and adrenal function and thus relevant to the pathophysiology of hypertension [7]. Endothelium-

* Corresponding author at: State University of Campinas (UNICAMP), Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, Alexander Fleming St, 105, 13083-881, Campinas, SP, Brazil.

E-mail address: nataliciaja@gmail.com (N.J. Antunes).

¹ R.C. and D.H.A.P. contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122668>

Received 24 September 2020; Received in revised form 9 March 2021; Accepted 11 March 2021

Available online 22 March 2021

1570-0232/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

RESEARCH ARTICLE

The basal release of endothelium-derived catecholamines regulates the contractions of *Chelonoidis carbonaria* aorta caused by electrical-field stimulation

José Britto-Júnior^{1,*}, Felipe Fernandes Jacintho¹, Rafael Campos², David Halen Araújo Pinheiro¹, Guilherme M. Figueiredo Murari¹, Valéria B. de Souza¹, André A. Schenka¹, Fabíola Z. Mónica¹, Ronilson Agnaldo Moreno¹, Edson Antunes¹ and Gilberto De Nucci^{1,3}

ABSTRACT

The contractions of *Chelonoidis carbonaria* aortic rings induced by electrical field stimulation (EFS) are not inhibited by blockade of the voltage-gated sodium channels by tetrodotoxin but almost abolished by the α_1/α_2 -adrenoceptor antagonist phentolamine. The objective of this study was to identify the mediator(s) responsible for the EFS-induced contractions of *Chelonoidis carbonaria* aortic rings. Each ring was suspended between two wire hooks and mounted in isolated 10 ml organ chambers filled with oxygenated and heated Krebs-Henseleit's solution. Dopamine, noradrenaline and adrenaline concentrations were analysed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The contractions caused by dopamine and EFS were done in absence and presence of the nitric oxide (NO) synthesis inhibitor L-NAME, the NO-sensitive guanylyl cyclase inhibitor ODQ, the D1-like receptor antagonist SCH-23390, the D2-like receptor antagonists risperidone, quetiapine, haloperidol, and the tyrosine hydroxylase inhibitors salsolinol and 3-iodo-L-tyrosine. Basal concentrations of dopamine, noradrenaline and adrenaline were detected in Krebs-Henseleit solution containing the aortic rings. The catecholamine concentrations were significantly reduced in endothelium-denuded aortic rings. L-NAME and ODQ significantly potentiated the dopamine-induced contractions. The D2-like receptor antagonists inhibited the EFS-induced contractions of the aortic rings treated with L-NAME, whereas SCH 23390 had no effect. Similar results were observed in the contractions induced by dopamine in L-NAME treated aortic rings. These results indicate that catecholamines released by endothelium regulate the EFS-induced contractions. This may constitute a suitable mechanism by which reptilia modulate specific organ blood flow distribution.

This paper has an associated First Person interview with the first author of the article.

KEY WORDS: LC-MS-MS, Tortoise, Vessel, ODQ, L-NAME, Tyrosine hydroxylase

INTRODUCTION

It is well established that endothelial cells modulate vascular reactivity through the release of mediators such as prostacyclin (Moncada et al., 1976), nitric oxide (Furchgott and Zawadzki, 1980) and endothelin (Yanagisawa et al., 1988). Catecholamines modulate vascular tonus through the actions on α - and β -adrenoceptors (Ahlquist, 1948); however, the production and release of catecholamines are associated with the existence of nerve terminals on vessels (Kadowitz et al., 1976; Matsuyama et al., 1985).

Electrical-field stimulation (EFS) is a technique in which an electrical stimulus is applied uniformly to an isolated tissue in short pulse widthwaves (Paterson, 1965; Bevan, 1962). EFS is commonly used in protocols evaluating adrenergic (Campos et al., 2019a,b; Dail et al., 1987), cholinergic (De Oliveira et al., 2019) and non-adrenergic non-cholinergic events (Ignarro et al., 1990; De Oliveira et al., 2003). Tetrodotoxin is considered an inhibitor of nerve terminal stimulation, since it blocks voltage-sensitive sodium channels (Narahashi et al., 1964).

Electrical-field stimulation causes aortic contractions of the tortoise *Chelonoidis carbonaria*, but these responses are not inhibited by tetrodotoxin, indicating they are not due to nerve terminal stimulation (Campos et al., 2020). Interestingly, these EFS-induced aortic contractions are reduced by either the α -adrenoceptor antagonist phentolamine or by endothelium removal (Campos et al., 2020), suggesting a potential modulatory role for endothelium-derived catecholamines. Similar observations have been reported for EFS-induced aortic contractions of the snakes *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca* (Campos et al., 2018a) and *Pantherophis guttatus* (Campos et al., 2018b), as well as of the human umbilical cord vessels (Britto-Júnior et al., 2020a). Since immunohistochemistry failed to identify nerve terminals in *Chelonoidis carbonaria* aortae (Campos et al., 2020), the results indicate a non-neuronal source of catecholamine synthesis. Interestingly, the enzyme tyrosine hydroxylase, responsible for catalyzing the conversion of L-tyrosine to L-DOPA, was identified only in the endothelial cells from *Chelonoidis carbonaria* aorta (Campos et al., 2020) and from both human umbilical artery and human umbilical vein (Britto-Junior et al., 2020b). The inhibition by phentolamine of EFS-induced contractions in both tortoise (Campos et al., 2020) and umbilical cord vessels (Britto-Júnior

¹Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-894, Brazil. ²Department of Physiology, Superior Institute of Biomedical Sciences, Ceará State University (UECE), Fortaleza 60714-903, Brazil. ³Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-060, Brazil.

*Author for correspondence (josebrittojr@gmail.com)

© J.B.-J., 0000-0003-0250-8468; F.F.J., 0000-0003-1379-6450; R.C., 0000-0002-9816-2061; D.H.A.P., 0000-0002-8661-9159; G.M.F.M., 0000-0002-1890-0723; V.B.d.S., 0000-0002-6462-5718; A.A.S., 0000-0002-8162-8996; F.Z.M., 0000-0002-8449-6677; R.A.M., 0000-0001-6692-1011; E.A., 0000-0003-2201-8247; G.D.N., 0000-0002-4346-7941

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

SHORT REPORT



Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels

José Britto-Júnior¹  | David H. A. Pinheiro¹  | Alberto F. O. Justo¹  |
 Guilherme M. Figueiredo Murari¹  | Rafael Campos²  | Fernanda V. Mariano³  |
 Valéria B. de Souza¹  | André A. Schenka¹  | Fabiola Z. Mónica¹  | Edson Antunes¹  |
 Gilberto De Nucci^{1,4,5} 

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

²Superior Institute of Biomedical Sciences, Ceará State University (UECE), Fortaleza, Brazil

³Department of Pathology, Faculty of Medical Science, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

⁴Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

⁵Brazil University, Fernadópolis, Brazil

Correspondence

José Britto-Júnior, University of Campinas (Unicamp), Department of Pharmacology, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária, 13083-887 – Campinas, São Paulo, Brazil.
 Email: josebrittojr@gmail.com

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 303839/2019-8; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2017/15175-1

Abstract

Electrical field stimulation (EFS) induces contractions of both snake aorta and human umbilical cord vessels (HUCV) which were dependent on the presence of the endothelium. This study aimed to establish the nature of the mediator(s) responsible for EFS-induced contractions in HUCV. Rings with or without endothelium from human umbilical artery (HUA) or vein (HUV) were mounted in organ bath chambers containing oxygenated, heated Krebs-Henseleit's solution. Basal release of dopamine (DA), noradrenaline, and adrenaline was measured by LC-MS-MS. Cumulative concentration-response curves were performed with dopamine in the absence and in the presence of L-NAME or of dopamine antagonists. EFS studies were performed in the presence and absence of L-NAME, the α -adrenergic blockers prazosin and idazoxan, and the dopamine antagonists SCH-23390 and haloperidol. Tyrosine hydroxylase (TH) and dopa-decarboxylase (DDC) were studied by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridizations. Basal release of dopamine requires an intact endothelium in both HUA and HUV. TH and DDC are present only in the endothelium of both HUA and HUV as determined by immunohistochemistry. Dopamine induced contractions in HUA only in the presence of L-NAME. Dopamine-induced contractions in HUV were strongly potentiated by L-NAME. The EFS-induced contractions in both HUA and HUV were potentiated by L-NAME and inhibited by the D2-like receptor antagonist haloperidol. The α -adrenergic antagonists prazosin and idazoxan and the D1-like receptor antagonist SCH-23390 had no effect on the EFS-induced contractions of HUA and HUV. Endothelium-derived dopamine is a major modulator of HUCV reactivity *in vitro*.

KEYWORDS

dopamine, EFS, endothelium, haloperidol, human umbilical artery, human umbilical vein, idazoxan, L-NAME, prazosin, tyrosine hydroxylase

Abbreviations: DDC, dopa decarboxylase; EFS, electric field stimulation; HUA, human umbilical artery; HUCV, human umbilical cord vessels; HUV, human umbilical vein; LC-MS-MS, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry; L-NAME, N ω -nitro-L-arginine-methyl ester; TH, tyrosine hydroxylase.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

DECLINE IN SCHIZOPHRENIA AND SCHIZOPHRENIA SPECTRUM DISORDERS IN BRAZIL: A CROSS-SECTIONAL STUDY FROM 2013 TO 2019

DECLÍNIO DE ESQUIZOFRENIA E TRANSTORNOS DO ESPECTRO ESQUIZOFRÊNICOS NO BRASIL: UM ESTUDO TRANSVERSAL DE 2013 A 2019

PEDRO PAULO LUCIANO AFONSO¹, MARIANA LUCIANO AFONSO², DAVID HALEN ARAÚJO PINHEIRO³, RITA DE CÁSSIA COLLAÇO⁴, ALBERTO FERNANDO OLIVEIRA JUSTO^{5*}

1. Medical Doctor. Resident in Psychiatry, Hospital Municipal do Campo Limpo, São Paulo (SP), Brazil; 2. Ph.D. in Social Psychology. Assistant Professor in Faculty of Medical Sciences, City University of São Paulo (UNICID), São Paulo, Brazil; 3. Physiotherapist. Master Student in Biomedical Engineering, University of Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos (SP), Brazil; 4. Ph.D. in Pharmacology. Researcher in Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas (SP), Brazil; 5. Ph.D. in Pharmacology. Associate Researcher in Faculty of Medical Sciences, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo (SP), Brazil

* Faculty of Medical Sciences, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo (SP), Brazil. Pedro de Toledo St., 781, Vila Clementino, São Paulo, São Paulo, Brazil. albertofojusto@gmail.com

Received: 01/08/2021. Accepted: 02/18/2021

ABSTRACT

Since 2015, as a sign of setback, the Ministry of Health stopped publishing the data regarding the investments of Mental Health Services, in particular, Centers for Psycho-Social Care (*Centros de Atenção Psicossocial, CAPS*). Among the psychiatric diseases, schizophrenia is one of the most serious and disabling disorders in Brazil. In this context, the aimed of this study is to analyze the Brazilian profile of schizophrenia and schizophrenia spectrum disorders from 2013 to 2019. During the studied time, the hospitalization by schizophrenia and schizophrenia spectrum disorders committed more males (304.793) compared to females (192.887). In males, hospitalization was more prevalent in aged 30-39 followed by 20-29, 40-49, 50-59, 60-69, 70-79, and 80 or older. Interestingly, a different profile was seen in females, women aged 40-49 were more hospitalized, followed by 30-39, 50-59, 20-29, 60-69, 70-79, and 80 or older. Decreasing the rate of hospitalization in subjects aged 30 and more, and a steady rate in individuals aged 20 years old in both sexes. The data showed a decrease of hospitalization in subjects aged 30 or more and no difference in younger age over time, these findings may indicate in short-term the schizophrenic spectrum hospitalization did not have an impairment.

KEYWORDS: Schizophrenia; Brazil; Hospitalization; Mental Health Services.

1. INTRODUCTION

Mental disorders have emerged as a global health issue¹. Highly prevalent worldwide, it is estimated that one in four people will be diagnosed with a psychiatric disease during the lifetime². It was reported that 31% of work disability is related to neurologic and psychiatric disorders worldwide³. Besides the high rate of disability, in a Brazilian study was reported re-hospitalization due to mental illness is approximately 42.6% in one year⁴.

Among the mental disorders, schizophrenia is an important psychiatric disease, considered as one of the most serious and disabling disorders, characterized by symptoms such as, delusions, disorganized communication, hallucinations, reduced motivation, apathy, and poor planning, which affects approximately 1% of the population⁵. Schizophrenic patients live on average 17 years less comparing with people undiagnosed for major mental diseases. Besides mortality due to suicide, two-thirds of the schizophrenic-premature deaths are related to diabetes, cardiovascular and smoking-related diseases⁶. In this regard, the earlier diagnosis for this psychiatric disease has an important impact and a successful treatment can prolong schizophrenic patients' life.

Previous reports addressed several pathways in order to understand the biological link in schizophrenia, schizotypal and delusional disorders. It's known heritability is the major risk factor for these diseases, increasing the odds up to 80%⁷. Some studies showed that polymorphisms in several genes could affect schizophrenia, schizotypal and delusional disorders, such as, presence of α -1C subunit of the L-type voltage-gated calcium channel (*CACNA1C*) gene, as a significant risk gene for schizophrenia⁸ and polymorphisms in multidrug resistance 1 (*MDR1*) gene is related to greater severity of delusions and hallucinations⁹. However, due to the complex pathophysiology of mental illness, the biological link between these disorders is unclear.

Besides the biological influence of schizophrenia and its spectrum, it is important to highlight the Brazilian Psychiatric Reform though the implementation and expansion of Centers for Psycho-Social Care (*Centros de Atenção Psicossocial, CAPS*) according to the Decree 189/1991, 224/1992 e 336/2002. From 1990 and 2010, there was a crucial increase of implementation of CAPS from 12 to 1620 in the counties, respectively, which represent an

EFEITOS DO LASER ISOLADO E ASSOCIADO À NATAÇÃO NA INFLAMAÇÃO PULMONAR EM *Rattus norvegicus*

EFFECTS OF ISOLATED AND ASSOCIATED SWIMMING LASER ON PULMONARY INFLAMMATION in *Rattus norvegicus*

DAVID HALEN ARAÚJO PINHEIRO¹, KARINA VASCONCELOS DA SILVA², DAVI MACHADO DE CARVALHO ARAÚJO³, KELLYANNE SOARES DE SOUSA⁴, ESMERALDA MARIA LUSTOSA BARROS⁵, KARINNE SOUSA DE ARAÚJO⁶, ANA FLÁVIA MACHADO DE CARVALHO^{7*}

1. Mestrando em Engenharia Biomédica – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba; 2. Pós-graduanda em Osteopatia Estrutural; 3. Acadêmico do Curso de Medicina do Centro Universitário UniFacid; 4. Especialista pelo Programa de Residência Multiprofissional em Saúde - Universidade Federal do Piauí; 5. Mestre em Ciências e Saúde e Técnica do Laboratório de Fisiologia - Universidade Federal do Piauí; 6. Doutora em Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí e Docente do Centro Universitário UniFacid; 7. Doutora em Engenharia Biomédica - Universidade do Vale do Paraíba e Docente do Centro Universitário UniFacid.

* R. Veterinário Bugyja Brito, 1354 - Horto, Teresina - PI, 64052-410. Centro Universitário UniFacid. anaflaviaparaibana@hotmail.com

Recebido em 01/07/2020. Aceito para publicação em 10/08/2020

RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) caracteriza-se pela limitação crônica e persistente do fluxo de ar. Geralmente é progressiva e resulta em uma resposta inflamatória anômala das vias aéreas e do parênquima pulmonar. É uma doença ocasionada pela exposição à fumaça do cigarro, à exposição ocupacional e à combustão de biomassa, isso devido a uma dilatação dos espaços aéreos distais nos bronquíolos terminais. O processo inflamatório crônico à exposição do cigarro pode promover alterações como bronquite crônica, bronquiolite respiratória, e ainda causar destruição do parênquima pulmonar, resultando no enfisema pulmonar. A melhora do estado geral em saúde tem sido uma preocupação constante em o todo mundo, para isso, diversas terapias alternativas têm sido inseridas, dentre elas destaca-se o laser e a natação.

PALAVRAS-CHAVE: Inflamação pulmonar; DPOC; Laserterapia; Natação.

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by chronic and persistent airflow limitation. It is usually progressive and results in an abnormal inflammatory response of the airways and lung parenchyma. It is a disease caused by exposure to cigarette smoke, occupational exposure and combustion of biomass, this is due to a dilation of the distal air spaces in the terminal bronchioles. The chronic inflammatory process to cigarette exposure can promote changes such as chronic bronchitis, respiratory bronchiolitis, and even cause destruction of the lung

parenchyma, resulting in pulmonary emphysema. The improvement of the general health status has been a constant concern worldwide, for this reason, several alternative therapies have been inserted, among which the laser and swimming stand out.

KEYWORDS: Pulmonary inflammation; COPD; Laser Therapy; Swimming.

1. INTRODUÇÃO

A Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, publicado em 2018, definiu a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) como uma limitação crônica e persistente do fluxo de ar, geralmente progressiva e que resulta em uma resposta inflamatória anômala das vias aéreas e do parênquima pulmonar. Esse mal é ocasionado pela exposição à fumaça do cigarro, exposição ocupacional e combustão de biomassa, os quais provocam uma dilatação dos espaços aéreos distais nos bronquíolos terminais¹.

A DPOC pode ser classificada em enfisema pulmonar, que é o aumento anormal dos espaços aéreos distais em relação ao brônquio terminal, e em bronquite crônica, que é uma condição caracterizada pela secreção excessiva de muco na árvore brônquica². A DPOC, atualmente, é um problema de saúde de grande relevância, não apenas pela sua alta prevalência, mas devido às comorbidades relacionadas à este quadro, o que eleva as taxas de mortalidade^{3,4}.

A DPOC gera alterações extrapulmonares significativas para o organismo, tais como a desnutrição, inflamação sistêmica, perda da massa muscular, depressão, descondicionamento físico, disfunção diafragmática e musculatura periférica. Desta

IMPACTO DA HANSENÍASE NA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES TRATADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA

IMPACT OF LEPROSY ON THE QUALITY OF LIFE OF PATIENTS TREATED IN A REFERENCE CENTER

ELAINE CRISTINA DE SOUSA¹, DAVID HALEN ARAÚJO PINHEIRO², FELIPE FERNANDES JACINTHO³, KARINA KELLY VASCONCELOS DA SILVA⁴, CRISTINA CARDOSO DA SILVA⁵, SILVANA MARIA VÉRAS NEVES^{6*}

1. Terapeuta Ocupacional pelo Centro Universitário UniFacid Wyden; 2. Mestrando em Engenharia Biomédica – Universidade do Vale do Paraíba; 3. Doutorando em Farmacologia - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 4. Pós-graduanda em Osteopatia Estrutural; 5. Doutoranda em Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí; 6. Mestre em Engenharia Biomédica – Universidade do Vale do Paraíba e Docente dos cursos de Terapia Ocupacional e Fisioterapia – Centro Universitário UniFacid Wyden.

* Rua Veterinário Bugyja Brito, 1354, Horto, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64052-410. Centro Universitário UniFacid Wyden. silvanafisio7@yahoo.com.br

Recebido em 23/05/2020. Aceito para publicação em 23/06/2020

RESUMO

A hanseníase é uma doença contagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* ou pelo *Mycobacterium lepromatosis*, afetando a pele e ao sistema nervoso periférico. Tem alta potência incapacitante e apresenta lesões cutâneas e envolvimento nervoso, classificadas entre paucibacilar e multibacilar. Devido as deformidades e incapacidades que a doença gera, vários pacientes sentem-se estigmatizados em função da sua autoimagem, desenvolvendo danos emocionais e psicológicos, além disso, traz prejuízos na qualidade de vida. A relevância de um protocolo de tratamento prévio, devido à hanseníase originar um sofrimento que atravessa o quadro algico e o mal-estar estritamente vinculados ao prejuízo físico, com grande impacto social e psicológico.

PALAVRAS-CHAVE: Hanseníase, qualidade de vida, atividades cotidianas, independência.

ABSTRACT

Leprosy is a contagious disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae* or *Mycobacterium lepromatosis*, affecting the skin and the peripheral nervous system. It has high disabling power and has skin lesions and nerve involvement, being classified into paucibacillary and multibacillary. Due to the deformities and disabilities that the disease generates, several patients feel stigmatized because of their self-image, developing emotional and psychological damage, in addition, it brings losses in the quality of life. The relevance of a previous treatment protocol, due to leprosy causing suffering that goes through the pain and malaise strictly linked to physical damage, with great social and psychological impact.

KEYWORDS: Leprosy, quality of life, daily activities, independence.

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase, ou doença de Hansen, é uma infecção causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* ou pelo *Mycobacterium lepromatosis*, com progresso crônico e lento^{1,2}.

O período de incubação da doença é de aproximadamente 5 anos e os sintomas podem aparecer no primeiro ano, mas em alguns casos, pode levar 20 anos ou mais². A doença acomete a pele e o sistema nervoso periférico, ocasionando uma redução de sensibilidade nervosa dos membros superiores e inferiores periféricos, resultando em uma grave deficiência física e deformidades com consequências ruins para a saúde e qualidade de vida do paciente³.

A transmissão é através de gotículas ou aerossóis^{4,5}. Os pacientes com hanseníase são classificados de acordo com o número de lesões cutâneas e envolvimento nervoso¹: paucibacilar e multibacilar, sendo que a primeira é até cinco lesões, enquanto que a segunda é mais de seis, respectivamente⁶.

O tratamento da hanseníase de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é por antibióticos de uso diário no período de 6 a 12 meses e follow-up dos pacientes durante anos^{2,3}. As resistências bacterianas em pacientes com hanseníase são raras, com o primeiro caso em 1964 e depois em 1976, quando se usava a monoterapia. Alguns casos de resistência foram reportados ao redor do mundo, mas a maioria foi por conta da recidiva após terapia insuficiente⁷.

A doença continua sendo uma questão de saúde pública para vários países de baixa e média renda, incluindo o Brasil, com cerca de 27.000 novos casos a cada ano⁸. Endêmica em mais de 100 países em todo o mundo, a cada ano há 200.000 novos diagnósticos e mais de 4 milhões de pessoas vivendo com algum tipo de comprometimento relacionado à hanseníase⁹.



e-ISSN 2446-8118

INCIDÊNCIA DE LESÕES NO SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO EM ATLETAS DE JUDÔ NAS CATEGORIAS SUB 15 E SUB 21 NO ESTADO DO PIAUÍ

174

INCIDENCE OF INJURIES IN THE MUSCULOSKELETAL SYSTEM IN JUDO ATHLETES IN THE U15 AND U21 CATEGORIES IN THE STATE OF PIAUÍ

INCIDENCIA DE LESIONES EN EL SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO EN ATLETAS DE JUDO EN LAS CATEGORÍAS U15 Y U21 EN EL ESTADO DE PIAUÍ

Norma Nunes Chaves¹
David Halen Araújo Pinheiro²
Karina Kelly Vasconcelos da Silva³
Diego Miranda Mota⁴
Silvana Maria Véras Neves⁵

RESUMO: Objetivo: analisar a incidência de lesões do sistema musculoesquelético em judocas do estado do Piauí nas categorias sub 15 e sub 21, e a relação de todos os movimentos adotados durante o trauma. **Métodos:** Participaram deste estudo onze atletas de judô de ambos os gêneros, distribuídos em grupo sub 15 e grupo sub 21, no período de novembro a dezembro de 2017. Foi aplicado um questionário estruturado com questões fechadas e abertas sobre a relação das técnicas de judô com as lesões oriundas deste esporte. **Resultados:** Do total, 72,7% (n=8) eram do sexo masculino e 27,3% (n=3) do sexo feminino. O membro dominante mais prevalente foi o direito, perfazendo um total de 63,6 (n=7) da amostra. Em relação às variáveis contínuas a média de peso foi de 65,02±22,2 quilos e a de altura foi de 1,66±0,10 metros (Tabela 2). A idade variou de 14 a 20 anos (média = 15,81±2,18). **Conclusão:** De acordo com os resultados obtidos, a prevalência de lesões musculoesqueléticas acometeu igualmente os gêneros com predominância durante o golpe de projeção imperfeita, e nos treinos, devido à desigualdade de peso entre os atletas e as repetições dos golpes.

DESCRITORES: Judô; Traumatismos em atletas; Competição.

ABSTRACT: Objective: to analyze the incidence of musculoskeletal system injuries in judokas from the state of Piauí in categories under 15 and under 21, and the relationship of all movements adopted during trauma. **Methods:** Eleven judo athletes of both genders, distributed in under 15 and under 21 groups, participated in this study from November to December 2017. A structured questionnaire with closed and open questions about the relationship of judo techniques was applied.

¹ Fisioterapeuta pela Faculdade Integral Diferencial - FACID WYDEN e Pós-graduanda em Fisioterapia Dermatofuncional pela Universidade de Fortaleza - UNIFOR.

² Graduado em Fisioterapia pela Faculdade Integral Diferencial - FACID WYDEN e Mestrando do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica pela Universidade Vale do Paraíba.

³ Fisioterapeuta pela Faculdade Integral Diferencial - FACID WYDEN e Pós-graduanda em Osteopatia Estrutural e Visceral pela Escola Brasileira de Fisioterapia Manipulativa.

⁴ Fisioterapeuta pela Faculdade Santo Agostinho e Especialista em Traumatologia Manipulativa.

⁵ Fisioterapeuta pela Universidade de Fortaleza - UNIFOR e Mestre em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba.



e-ISSN 2446-8118

A INFLUÊNCIA DO TABAGISMO SOBRE A MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE ADULTOS JOVENS

THE INFLUENCE OF SMOKING ON THE RESPIRATORY MECHANICS OF YOUNG ADULTS

LA INFLUENCIA DE FUMAR EN LA MECÁNICA RESPIRATORIA DE ADULTOS JÓVENES

Letícia Sousa Silva¹
David Halen Araújo Pinheiro²
Daniele Naiara Araujo Pinheiro³
Ana Flávia Machado de Carvalho⁴

RESUMO: Objetivo: avaliar os efeitos do tabagismo sobre a mecânica respiratória em adultos jovens. **Métodos:** esse estudo é delineado como pesquisa de campo, de abordagem quantitativa, descritiva e de natureza comparativa. A amostra do estudo foi composta por 18 participantes, escolhidos de acordo com os critérios pré-estabelecidos. Para coleta de dados, utilizou-se uma ficha de avaliação elaborada pelos pesquisadores, um manovacuômetro analógico para mensurar a força dos músculos respiratórios por meio da P_{Imax} e da P_{E_{max}} e um Peak-Flow para medir o pico de fluxo expiratório. **Resultados:** a maioria dos participantes (n=12) 66,7% eram do gênero masculino e (n=6) 33,3% do gênero feminino. Dos (n=10) 55,6% tabagistas (n=6) 60% haviam iniciado fumo antes dos 18 anos. Segundo a escala de dependência de nicotina 30% do grupo apresentou grau elevado (n=3). Houve diferença estatisticamente significativa entre média de altura entre jovens com nível 1 em relação aqueles com nível 2 de dependência de nicotina (1,76 *versus* 1,67; p=0,01). **Conclusão:** O hábito apresenta efeitos deletérios, desenvolvendo uma dependência química e alterando a mecânica respiratória de adultos jovens.

DESCRITORES: Jovens adultos; Tabagismo; Mecânica respiratória; Fisioterapia.

ABSTRACT: Objective: to evaluate the effects of smoking on respiratory mechanics in young adults. **Methods:** this study is designed as a field research, with a quantitative, descriptive and comparative approach. The study sample consisted of 18 participants, chosen according to pre-established criteria. For data collection, an evaluation form prepared by the researchers was used, an analog manovacuumeter to measure the strength of the respiratory muscles by means of P_{Imax} and P_{E_{max}} and a Peak-Flow to measure the peak expiratory flow. **Results:** most participants (n = 12)

¹ Centro Universitário UniFacid, Teresina, PI, Brasil. Fisioterapeuta e Pós-graduanda em Fisioterapia Traumatológica e Esportiva - Teresina, PI, Brasil.

² Universidade do Vale do Paraíba - São José dos Campos, SP, Brasil. Mestrando em Engenharia Biomédica pelo Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - São José dos Campos, SP, Brasil.

³ Centro Universitário UniFacid, Teresina, PI, Brasil. Graduada em Enfermagem pelo Centro Universitário UniFacid, Teresina, PI, Brasil.

⁴ Centro Universitário UniFacid, Teresina, PI, Brasil. Doutora em Engenharia Biomédica pelo Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba e Docente do Centro Universitário UniFacid, Teresina, PI, Brasil.



e-ISSN 2446-8118

EFEITOS DO DRY NEEDLING NA LOMBALGIA CRÔNICA
EFFECTS OF DRY NEEDLING ON CHRONIC LOMBALGY
EFECTOS DE AGUJA SECA EN LA LOMBALGÍA CRÓNICA

153

Rafaela de Sousa Silva¹
David Halen Araújo Pinheiro²
Matheus Henrique da Silva Lemos³
Cristina Cardoso da Silva⁴

RESUMO: Objetivo: Analisar os efeitos do dry needling em pacientes com lombalgia crônica. **Métodos:** A amostra contou com 07 participantes, de ambos os gêneros e faixa etária entre 18 e 65 anos com presença de dor lombar por mais de três meses. Para a coleta de dados foi aplicado o questionário de incapacidade-RMDQ e uma ficha de avaliação ortopédica. **Resultados:** houve diferença estatisticamente significativa entre pontuação para dor na EVA no segundo dia do tratamento e após 4 atendimentos (5,85 versus 3,57, $p < 0,01$) e entre o 4º e 8º atendimento (3,57 versus 1,14, $p < 0,01$). Houve também diferença estatisticamente significativa entre as médias do início e fim do tratamento (5,85±0,89 versus 1,14±0,38, $p < 0,01$). **Conclusão:** que a intervenção fisioterapêutica empregando a técnica de dry needling em pacientes com lombalgia crônica apresentou diversos benefícios, dentre eles, redução do quadro algico e melhora da amplitude de movimento.

DESCRITORES: Dor lombar; Síndromes da Dor Miofascial; Agulhas.

ABSTRACT: Objective: To analyze the effects of dry needling in patients with chronic low back pain. **Methods:** The sample consisted of 07 participants, of both genders and age range between 18 and 65 years old, with low back pain for more than three months. For data collection, the RMDQ disability questionnaire and an orthopedic evaluation form were applied. **Results:** There was a statistically significant difference between VAS pain score on the second day of treatment and after 4 visits (5.85 versus 3.57, $p < 0.01$) and between the 4th and 8th visit (3.57 versus 1.14, $p < 0.01$). There was also a statistically significant difference between the mean start and end of treatment (5.85 ± 0.89 versus 1.14 ± 0.38, $p < 0.01$). **Conclusion:** that the physical therapy intervention employing the dry needling technique in patients with chronic low back pain had several benefits, including pain reduction and range of motion improvement.

DESCRIPTORS: Backache; Myofascial Pain Syndromes; Needles.

¹ Fisioterapeuta pela Faculdade Integral Diferencial - FACID WYDEN e Pós-graduanda em Osteopatia Estrutural e Visceral pela Escola Brasileira de Fisioterapia Manipulativa.

² Graduado em Fisioterapia pela Faculdade Integral diferencial - FACID WYDEN e Mestrando do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica pela Universidade Vale do Paraíba.

³ Enfermeiro pela Faculdade Integral Diferencial - FACID WYDEN.

⁴ Mestre em Ciência e Saúde pela Universidade Federal do Piauí e Docente da Faculdade Integral Diferencial - FACID WYDEN.