



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

PAPEL DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NO RELAXAMENTO
VASCULAR

LUCAS FERREIRA ALVES

Belo Horizonte

2020

LUCAS FERREIRA ALVES

**PAPEL DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NO RELAXAMENTO
VASCULAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Doutora Virgínia Soares Lemos

**Belo Horizonte
2020**

043 Alves, Lucas Ferreira.
Papel dos receptores nicotínicos no relaxamento vascular [manuscrito] /
Lucas Ferreira Alves. - 2020.
96 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Doutora Virgínia Soares Lemos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Receptores Nicotínicos. 3. Acetilcolina. 4. Vasodilatação. I.
Lemos, Virgínia Soares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de
Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis - CRB 6 - 2680

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 316 DE LUCAS FERREIRA ALVES

Às 14:00 horas do dia 18 do mês de fevereiro de 2020, na SALA PROF. WILSON BERALDO-BLOCO A4 - ICB, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Lucas Ferreira Alves**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Rosaria Dias Aires**, FACSETE, **Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia**, FMRP/USP, **Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**PAPEL DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NO RELAXAMENTO VASCULAR**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar aprovada a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Maristela de Oliveira Poletini
Rosaria Dias Aires
Stêfany Bruno de Assis Cau
Virgínia Soares Lemos
Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá certificado de conclusão do doutorado.

AGRADECIMENTOS

Acredito que esta parte seja a mais difícil de ser escrita, considerando que a vida nos surpreende com pessoas maravilhosas todos os dias. Eu que sempre acreditei que a caminhada é mais valiosa junto, tenho enorme prazer em agradecer a cada um que participou comigo dessa incrível jornada.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade. Por me guiar, por segurar a minha mão e por me gritar lá de cima todos os dias: “Suba o queixo, ande em frente, sorria menino, confie em mim. Vá para a luta que eu cuido das feridas.” E aqui, estou.

Gostaria de agradecer aos meus pais pela incansável tarefa de acreditar em mim e me fazer acreditar que tudo seria possível. Eu não poderia ter guias mais sinceros e motivadores que vocês. Em especial a minha mãe Varlene, que mesmo diante de todas as dificuldades que a vida lhe impôs, sempre foi meu maior exemplo de resiliência e sabedoria. Para você que me ouviu todos os dias sorrindo, chorando e pedindo, meu muito obrigado.

Com lágrimas nos olhos eu gostaria de agradecer a uma senhora muito importante em minha vida, que talvez nunca irá se dar conta desse agradecimento, mas me transborda em alegria todas as vezes que sinto seu abraço. A você, minha amada Avó Angélica, a quem eu conheço e me apresento todos os dias, que me recebe com muito carinho quando se dá conta de quem eu sou, meu muito obrigado. Que sejamos capazes de começar e recomeçar todos os dias. Obrigado pelo tudo e pelo muito. Por me mostrar que felicidade é só questão de ser. Gostaria de poder engarrafar todas as suas palavras e fotografar todos os seus sorrisos. Volto aqui a agradecer a Deus por permitir que a senhora viesse até aqui comigo.

Agradeço a minha tia Lilian pelo companheirismo durante toda a minha trajetória como aluno, desde o início da faculdade ao término do meu doutorado. Foi muito importante o seu carinho, otimismo e incentivo para que tudo isso acontecesse. Muito obrigado.

Um agradecimento enorme a minha orientadora Virgínia, por me abrir a porta de seu laboratório, confiar em mim e me mostrar que fazer ciência é divertido, valioso e, sobretudo enriquecedor. Por todas as horas juntos, por cada minuto do seu tempo

dedicado a minha formação. Por não me deixar desistir da ciência em um cenário tão maluco como o que vivemos atualmente, meu muito obrigado.

Agradeço aos professores Steyner, Daniela Bonaventura, Cida, Rafaela, Stéfany e André pelas palavras amigas, pelo apoio e por todo conhecimento adquirido. Em especial a professora Miriam, com quem pude conviver mais diretamente. Tenho um orgulho imenso em ter sido formado por grandes doutores como vocês.

Gostaria de fazer um agradecimento aos meus amigos, a essa família imensa que eu escolhi para viver ao meu lado, e que mesmo longe compartilhavam de sorrisos, lágrimas e histórias de vida o tempo todo. Agradeço ao Rafael, ao Ramon e a Roberta, por terem sido meus grandes amigos durante os quatro anos vividos no ICB. A Íris, Antônio e Aline pela alegria constante e por sempre estarem ali comigo. Em especial a minha amiga Ronara, que é a minha grande surpresa na vida. *Best*, eu amo muito você! Eu não sei o que seria de mim sem ouvir você todos os dias, incansavelmente. Por ouvir todas as minhas histórias com enorme paciência e me mostrar que amizade é o que de mais bonito nós temos, meu muito obrigado.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, com quem eu aprendi inúmeras coisas e vou levá-los sempre: Walma, Luciana, Carlos, Daniela, Thiago, Josiane, Grazielle, Eduardo, Bruno, Rosária e Leonardo. Agradeço também aos novos integrantes do laboratório pelo carinho e consideração nesse final tão turbulento, a vocês Ildernandes, Wesley e William, muito obrigado. Gostaria de fazer um agradecimento muito grande aos meus alunos de iniciação científica, Gabriela, Joyce e Euller, vocês fizeram muito por mim e grande parte deste trabalho também é de vocês. Em especial a Josiane, por ser um exemplo de pesquisadora e pessoa. Obrigado pelo apoio, pelos dias de experimento em sua companhia e por toda palavra amiga e carinhosa. Você é uma pessoa brilhante e merece um mundo inteiro de felicidades e conquistas.

Agradeço a equipe médica do Hospital de Clínicas de Belo Horizonte, que me proporcionou o material necessário para a realização desta pesquisa. Em especial ao professor Cláudio Gelape, pela disponibilidade e confiança.

Agradeço aos pacientes que participaram deste trabalho pela valiosa contribuição. Torço para que cada um de vocês esteja em perfeito estado de saúde.

Por fim, agradeço ao programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG e ao CNPq pela enriquecedora experiência. Eu não poderia ter escolhido melhor lugar para a minha formação. Tenho admiração por todo o pessoal envolvido.

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.

Albert Einstein

RESUMO:

Os receptores colinérgicos são basicamente de dois tipos: nicotínicos (nAChRs), que formam canais iônicos ativados por ligante e os muscarínicos (mAChRs), que são acoplados à proteína G. Até o momento, é bem aceito que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina (ACh) é mediado pela ativação de mAChRs, presentes no endotélio vascular, principalmente do subtipo M₃. Alguns estudos têm demonstrado a presença dos componentes de síntese, transporte e degradação da ACh em vários tecidos não-neuronais. Dados bastante consistentes do nosso grupo, em aorta de camundongos, apontam para um importante papel dos nAChRs $\alpha 7$ na vasodilatação dependente do endotélio mediada pela ACh. No entanto, a existência dos componentes do sistema colinérgico não neuronal em vasos, o mecanismo pelo qual o nAChR participa da resposta vasodilatadora e se esses receptores são funcionais em vasos humanos, ainda não são conhecidos. Portanto, este trabalho propôs estudar a presença do sistema colinérgico não-neuronal em vasos humanos, bem como, avaliar a participação dos nAChRs no relaxamento vascular dependente de endotélio e a sinalização intracelular desencadeada por essa resposta. Foram utilizados segmentos de artéria mamária e veia safena humana de pacientes, de ambos os sexos, submetidos a cirurgias de revascularização cardíaca. Para avaliar a expressão gênica dos componentes do sistema colinérgico foi utilizada a técnica de RT-PCR. A expressão proteica dos receptores mAChR M₃ e nAChR $\alpha 7$ foi avaliada por Western blot. Co-immunoprecipitação, seguida de Western blot foi utilizada para avaliar a possibilidade de uma interação física entre os nAChRs e mAChRs. A participação dos nAChRs na resposta vasodilatadora induzida pela ACh foi avaliada utilizando um sistema de banho de órgãos. Para avaliar o mecanismo envolvido na resposta vasodilatadora foi utilizada aorta de camundongo. A determinação da $[Ca^{+2}]_i$ foi feita na linhagem de célula endotelial humana EA-hy926 por microscopia de fluorescência. Foi identificada a expressão gênica do transportador de colina de alta eficiência (SLC5A7), das enzimas butirilcolinesterase (BChE) e acetilcolinesterase (AChE), responsáveis pela degradação da ACh, da enzima colina acetil-transferase (CHAT), que realiza a síntese de ACh, além de mAChRs M₃ e nAChRs $\alpha 7$. Foi demonstrada também a expressão proteica dos mAChRs M₃ e nAChRs $\alpha 7$ no endotélio. Esses dados são consistentes com a presença de um sistema colinérgico não-neuronal (SCNN) em artéria mamária e veia safena de humanos. A ACh induziu um efeito vasodilatador concentração-dependente que foi dependente da presença de um endotélio

funcional e abolido pela atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos, tanto na artéria mamária como na veia safena de humanos. A estimulação direta dos nAChRs, com um agonista não-seletivo (DMPP) e um agonista seletivo dos nAChRs $\alpha 7$ (PNU-282987), não induziu efeito vasodilatador. Curiosamente, o bloqueio farmacológico com dois antagonistas dos nAChRs mecamilamina e D-tubocurarina, reduziu a resposta vasodilatadora em cerca de 40%. Nossos dados sugerem que o efeito vasodilatador mediado pela estimulação dos mAChRs é, em parte, dependente da ativação dos receptores nAChRs, já que o bloqueio desses receptores diminuiu a resposta vasodilatadora. No entanto, a ativação dos nAChRs é dependente da ativação prévia dos mAChRs. Foi demonstrado a formação de um imunocomplexo ou uma proximidade muito grande entre o mAChRs M3 e o nAChRs $\alpha 7$. Foi possível observar que já na condição basal, esses receptores parecem estar ligados fisicamente no endotélio vascular de aorta de camundongos, e que após estímulo com ACh ou muscarina, na presença e na ausência de atropina, a formação do complexo não é alterada. O mesmo acontece na condição basal em humanos. Esses dados sugerem que o mAChRs M3 e o nAChRs $\alpha 7$ parecem estar ligados fisicamente e/ou muito próximos para co-imprecipitarem juntos. O bloqueio da pequena proteína G Rho-A com Rhosin (inibidor do domínio de ligação Rho GEF de Rho-A), diminuiu a resposta vasodilatadora induzida pela muscarina na aorta de camundongo. Ainda, o bloqueio farmacológico dos receptores de potencial transitório (TRPs) com bloqueadores não seletivos e seletivos para o subtipo do receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV-4), a resposta vasodilatadora foi reduzida em 40%. Esses achados indicam que Rho-A e os TRPs também estar envolvidos na resposta vasodilatadora da ACh. Dessa forma, os dados deste trabalho, em conjunto, mostram que existe um sistema colinérgico não-neuronal na veia safena e na artéria mamária de humanos. Mais importante, estes dados sugerem que os nAChRs $\alpha 7$ participam da resposta vasodilatadora dependente de endotélio mediada pela ACh. O mecanismo parece não envolver uma ativação direta dos nAChR $\alpha 7$, mas sim a ativação do mAChRs M3 que fariam parte de um complexo formado pela heterodimerização com os nAChR $\alpha 7$.

Palavras-chave: Receptores nicotínicos, relaxamento vascular, sistema colinérgico não-neuronal, acetilcolina.

ABSTRACT:

Cholinergic receptors are basically two types: nicotinic (nAChRs), which form pentameric ligand-gated ion channel, and muscarinic receptors (mAChRs), which are G protein-coupled receptors and responsible for the metabotropic responses. Consistent data from our group in the mouse aorta pointed to an important role of $\alpha 7$ nAChRs in ACh-mediated endothelium-dependent vasodilation. Recently, several components of the cholinergic system have been identified in non-innervated tissues. However, the existence of non-neuronal cholinergic system components in vessels, the mechanism by which the nAChRs participate in the vasodilatory response and whether these receptors are functional in human vessels, is not known. In this sense, the aim of this study was to evaluate the role of nicotinic receptors in the endothelium-dependent vasodilator response induced by ACh and to verify the existence of components of the non-neuronal cholinergic system in human vessels. Besides that, evaluate the intracellular signaling triggered by this response. We used segments of the mammary artery and human saphenous vein of patients of both sex that underwent cardiac revascularization surgery . To evaluate the expression of the components of the cholinergic system, the RT-PCR technique was used. Protein expression of M3 mAChR M3 and $\alpha 7$ nAChR receptors was evaluated by Western blot. Co-immunoprecipitation followed by Western blot was used to evaluate the possibility of a physical interaction between nAChRs and mAChRs. The participation of nAChRs in the ACh-induced vasodilatory response was evaluated using an organ bath system. To evaluate the mechanism involved in the vasodilator response, mouse aorta was used. Determination of $[Ca^{+2}]_i$ was made in human endothelial cell line EA-hy926 by fluorescence microscopy. The gene expression of the high efficiency choline transporter (SLC5A7), the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes, responsible for the degradation of ACh, of the enzyme choline acetyl transferase (CHAT), M3 mAChRs and $\alpha 7$ nAChRs were identified. Protein expression of the M3 mAChRs and $\alpha 7$ nAChRs in the endothelium was also demonstrated. These data are consistent with the presence of a non-neuronal cholinergic system (SCNN) in the human mammary artery and saphenous vein. ACh induced a concentration-dependent vasodilatory effect that was dependent on the presence of a functional endothelium and abolished by atropine, a muscarinic receptor antagonist, in both the mammary artery and saphenous vein of humans. Direct stimulation of nAChRs with a non-selective agonist (DMPP) and selective $\alpha 7$ nAChR agonist (PNU-

282987) did not induce vasodilatory effect. Interestingly, pharmacological blockade with two nAChRs antagonists mecamlamine and D-tubocurarine reduced the vasodilatory response by about 40%. Our data suggest that the vasodilatory effect mediated by mAChRs stimulation is partly dependent on the activation of nAChRs receptors, as blocking these receptors decreased the vasodilator response. However, activation of nAChRs is dependent on prior activation of mAChRs. The formation of an immunocomplex or close proximity between M3 mAChRs and $\alpha 7$ nAChRs has been demonstrated. It was observed that already in the basal condition, these receptors appear to be physically linked in the vascular endothelium of aorta of mice, and that after stimulation with ACh or muscarine, in the presence and absence of atropine, the formation of the complex is not altered. The same is true for the basal condition in humans. These data suggest that M3 mAChRs and $\alpha 7$ nAChRs appear to be physically linked and / or too close to co-immunoprecipitate together. Blockade of the small G Rho-A protein with Rhosin (Rho-A Rho GEF binding domain inhibitor), decreased the muscarin-induced vasodilatory response in the mouse aorta. Also, pharmacological blockade of transient potential receptors (TRPs) with non-selective blockers and selective transient potential receptor subtype vanilloid 4 (TRPV-4) blockers, reduced the vasodilator response by 40%. These findings indicate that Rho-A and TRPs are also involved in the vasodilatory response of ACh. Thus, these data together showed that there is a non-neuronal cholinergic system in the saphenous vein and mammary artery of humans. More importantly, these data suggest that $\alpha 7$ nAChRs participate in the ACh-mediated endothelium-dependent vasodilator response. The mechanism does not appear to involve direct activation of $\alpha 7$ nAChRs, but rather activation of M3 mAChRs that would be part of a cluster formed by heterodimerization with $\alpha 7$ nAChRs.

Keywords: Nicotinic receptors, vascular relaxation, non-neuronal cholinergic system, acetylcholine.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ACh	Acetilcolina
ACHE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
BCHE	Butirilcolinesterase
ChAT	Colina-O-acetiltransferase
ChT1	Transportador de colina de alta afinidade
CRVM	Cirurgia de revascularização do miocárdio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EDHF	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
EPM	Erro padrão da media
HCL	Ácido clorídrico
HEPES	N-2-Hidroetilpiperazina-N_-2-ácido etanosulfônico (<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N_-2-ethanesulfonic Acid</i>)
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
KCl	Cloreto de potássio
KD	Knockdown
Kg	Quilograma
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico

L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster (<i>NG-nitro-L-ArginineMethyl Ester</i>)
L-NNA	NG-nitro-L-arginina (<i>NG-Nitro-L-Arginine</i>)
mg	Miligrama
mAChRs	Receptores muscarínicos para acetilcolina
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mL	Mililitros
mm²	Milímetro quadrado
mmol.L⁻¹	Milimolar
mN	MiliNewton
nAChRs	Receptores nicotínicos para acetilcolina
μmol.L⁻¹	Micromolar
μg	Micrograma
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal (neuronal nitric oxide synthase)
NO[•]	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)

O₂	Oxigênio molecular
O²⁻	Ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxil
OONO[•]	Peróxido nitrito
Pb	Pares de base
PBS	Solução tamponada de potássio (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina
RNA	Ácido ribonucléico (<i>RiboNucleicAcid</i>)
RuR	Rutheniun Red
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SCNN	Sistema colinérgico não-neuronal
SOD	Superóxido dismutase
TRIM	Trifluorometilimidazole
UI	Unidade Internacional
VAcHT	Transportador vesicular de ACh
°C	Graus centígrados

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Figura 1. Esquema representativo da síntese da ACh a partir dos seus substratos.....	23
Figura 2. Esquema ilustrativo dos mAChRs.....	25
Figura 3: Esquema ilustrativo de modelos de arranjos pentaméricos de nAChRs homoméricos e alguns heteroméricos funcionais.....	28
Figura 4: Desenho esquemático que resume os componentes da NNCS envolvidos na síntese, liberação, degradação e sinalização da ACh não neuronal.	30
Figura 5. Expressão gênica dos componentes do sistema colinérgico não neuronal na artéria mamária humana.....	46
Figura 6. Expressão gênica dos componentes do sistema colinérgico não neuronal na veia safena humana.....	47
Figura 7. Expressão proteica dos receptores mAChRs M3 e nAChRs $\alpha 7$ por Western blot.	49
Figura 8: Silenciamento do nAChR $\alpha 7$ por antisense in vivo.....	49
Figura 9: Expressão protéica de $\alpha 7$ nAChR e M3 mAChR no endotélio de artéria mamária e veia safena de humanos.....	50
Figura 10: Efeito da atropina no relaxamento endotélio-dependente da veia safena humana e da artéria mamária humana.	52
Figura 11: Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela ACh.....	53
Figura 12: Relaxamento endotélio-dependente associado ao DMPP e ao PNU-282987 na veia safena humana.	53
Figura 13: Relaxamento endotélio-dependente associado ao DMPP e ao PNU na artéria mamária humana.	54
Figura 14: Efeito da D-Tubocurarina e Mecamilamina no relaxamento endotélio-dependente da veia safena humana.	54

Figura 15: Efeito da D-Tubocurarina e Mecamilamina no relaxamento endotélio-dependente da artéria mamária humana.....	55
Figura 16: Co-imunoprecipitação dos receptores mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ nas células endoteliais de camundongos.	56
Figura 17: Co-imunoprecipitação dos receptores mAChRM3 e nAChR $\alpha 7$ nas células endoteliais de artéria mamária e veia safena.	57
Figura 18: Efeito dos bloqueadores de nAChRs, Rho-a e TRPs na sinalização de cálcio intracelular.....	58
Figura 19. Efeito do Rhosin e do Y-27632 no relaxamento endotélio-dependente na aorta de camundongo.....	61
Figura 20. Efeito dos inibidores de TRPs, Ruthenium Red, SKF-96365, 2-APB, Gadolinium, Lanthanum e da associação Rhosin + Ruthenium Red no relaxamento endotélio-dependente na aorta de camundongos.	62
Figura 21. Efeito do agonista seletivos de TRPV GSK 1016790A, dos bloqueadores de TRV4 GSK 2193874 e HC067047 e da associação de GSK 2193874 + α -bungarotoxina no relaxamento endotélio-dependente na aorta de camundongo.....	64
Figura 22: Resposta vasodilatadora associada à ACh modulada pela heterodimerização entre mAChRs M3 e nAChR $\alpha 7$	65
Tabela 1: Expressão gênica avaliada.....	37

SUMÁRIO

Resumo:	9
Abstract:	11
1. Introdução.....	21
2. Revisão de Literatura.....	23
2.1. Endotélio Vascular	23
2.2 Sistema colinérgico	24
2.3 Receptores Colinérgicos	25
2.3.1 Receptores Muscarínicos	26
2.3.2. Receptores Nicotínicos	27
2.4 Sistema Colinérgico não-neuronal	30
3. Objetivos	36
4. Metodologia de trabalho.....	37
4.1. Aspectos éticos	37
4.2.1. Obtenção dos vasos.	37
4.3. Análise semi-quantitativa dos níveis de mRNA por RT-PCR	38
4.4. Experimentos de reatividade vascular	39
4.4.1 Montagem dos vasos	39
4.4.2. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela ACh frente aos inibidores nicotínicos e muscarínicos.....	40
4.4.2.1. Participação dos nAChRsna resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina em veia safena e artéria mamária de humanos.	40
4.4.2.2. Participação dos mAChRs na resposta vasodilatadora induzida pela ACh em veia safena e artéria mamária de humanos.....	40
4.4.3. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela muscarina frente aos inibidores de Rho e Rhokinase em aorta de murinos	40
4.4.4. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela ACh frente aos inibidores de TRPs em aorta de murinos.....	41

4.5. Experimentos de co-imunoprecipitação	41
4.5.1. Preparação das amostras	41
4.5.2. Preparação das “beads” magnéticas	41
4.5.3. Imunoprecipitação	41
4.6 Determinação da expressão proteica por Western blot	42
4.7 Separação de células endoteliais do músculo liso	43
4.8 Cultura de EA.hy926 e Tratamento	43
4.9 Dosagem de cálcio intracelular	43
4.10 Análises estatísticas e expressão dos resultados	44
5. Resultados	45
5.1 Análise semi-quantitativa dos níveis de mRNA por RT-PCR na artéria mamária e veia safena	45
5.2 Determinação da expressão proteica dos nAChR $\alpha 7$ e do mAChR M3	48
5.3 Participação dos receptores nicotínicos no relaxamento endotélio-dependente da artéria mamária e veia safena da humana.	51
5.4 Co-imunoprecipitação e determinação da expressão protéica de mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$	56
5.5 Avaliação da $[Ca^{2+}]_i$	58
5.6. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora.	61
5.6.1 Papel da Rho-A e ROCK na resposta vasodilatadora induzida pela ativação dos mAChRs	62
5.8 Papel dos TRPs na resposta vasodilatadora induzida pela ativação dos mAChRs frente aos inibidores de TRPs	63
5.6.2 Avaliação do papel de Rho-A e dos TRPs no aumento das $[Ca^{2+}]_i$ a induzida pela ativação dos mAChRs	66
6. Discussão	68
7. Conclusão	75
8. Referências bibliográficas	77

Anexo 1	94
---------------	----

1. INTRODUÇÃO

A ACh foi o primeiro neurotransmissor descrito tanto no sistema nervoso central (SNC) como no sistema nervoso periférico (SNP) e representa um dos mais importantes mediadores biológicos conhecidos (1-4). É uma das moléculas mais conservadas da natureza e sua síntese é descrita em bactérias, protozoários, fungos, plantas e animais (5, 6).

Os receptores colinérgicos são basicamente de dois tipos: receptores nicotínicos (nAChRs), que formam canais iônicos ativados por ligante (7-15) e os receptores muscarínicos (mAChRs), que são acoplados à proteína G e, classicamente, são responsáveis pelas respostas metabotrópicas associadas a essa molécula (3, 16-26). Os nAChRs são subdivididos em dois tipos: os homopentâmeros, que são formados por cinco subunidades idênticas e os heteropentâmeros, que resultam da combinação de diferentes subunidades. Atualmente, são conhecidos cinco tipos de subunidades: α (com dez isoformas: $\alpha 1$ - $\alpha 10$), β ($\beta 1$ - $\beta 4$), γ , δ e ϵ (11). Os subtipos de nAChRs que são fisiologicamente expressos são os nAChR $\alpha 7$ homoméricos e vários heteroméricos formados por combinações de subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$ e $\beta 4$ (23, 27-30) incluindo nAChRs contendo $\alpha 3\beta 4$ (31). Já os mAChRs compreendem cinco subtipos distintos, indicados como receptor muscarínico M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 (21). O receptor M_3 é o mais amplamente expresso em vasos, no entanto, já foi descrita a existência da expressão dos subtipos M_1 e M_5 nesse tecido (6, 24, 26, 32-35). Até o momento, é bem aceito que o relaxamento vascular induzido pela ACh é mediado pela ativação de mAChRs, presentes no endotélio vascular, principalmente do subtipo M_3 , que estimula a síntese de fatores relaxantes derivados do endotélio como o NO, EDHF e prostaciclina induzindo o relaxamento das células do músculo liso vascular (18, 19, 23, 36).

O papel fisiológico da ACh em vasos sanguíneos não inervados foi negligenciado por muito tempo, uma vez que a degradação da ACh pelas acetilcolinesterases e butirilcolinesterases acontece de maneira rápida, o que impede sua ação humoral nesses tecidos (37). Dessa forma, a presença de receptores muscarínicos no endotélio foi considerada por muito tempo como um achado de pouca relevância fisiológica e perdido no processo de evolução das espécies. A identificação da enzima colina acetiltransferase (ChAT) em células da placenta humana, sugeriu pela primeira vez a existência de um sistema colinérgico não neuronal funcional nesse tecido, o que permitiria a produção local de acetilcolina (38). Além da expressão de ChAT, posteriormente, foi detectada a

expressão de nAChRs, mAChRs e da colinesterase em diversos tecidos do organismo não neuronais (39). Essa ampla distribuição não neuronal dos componentes do sistema colinérgico apontava para uma sinalização local desse sistema, com uma ação parácrina ou autócrina da ACh (5, 32, 33, 40, 41).

O nAChR $\alpha 7$ é um dos subtipos de nAChRs mais expressos fisiologicamente em tecidos não neuronais (2, 15, 20, 32, 42-44). Ele possui uma estrutura homopentamérica e é um dos receptores que se caracteriza por possuir uma permeabilidade elevada ao cálcio (45), quando comparada aos demais. Diversos estudos já mostraram que, além de seu clássico papel fisiológico no SNC (6, 46-50), os nAChR $\alpha 7$ exercem um papel fisiopatológico importante na migração de leucócitos, na formação de placa aterosclerótica, no crescimento tumoral, no reparo de feridas e na revascularização isquêmica, (8, 51-55).

Em vasos, os nAChRs $\alpha 7$ contribuem com a formação da rede capilar *in vitro* (28) e estão envolvidos no processo de angiogênese, contribuindo com a proliferação, migração e formação do tubo *in vivo* (39, 56, 57). Estudos com células endoteliais humanas demonstraram a expressão de nAChRs funcionais e a participação do nAChR $\alpha 7$ na sinalização celular de processos biológicos, como: proliferação, sobrevivência e migração (56). Outro estudo em células endoteliais de aorta humana demonstrou a expressão de nAChRs funcionais, mas o subtipo permanece desconhecido uma vez que só foram utilizados antagonistas farmacológicos não seletivos (31). Em 2012, Zou e colaboradores mostraram que a ativação de nAChRs parece contribuir com o relaxamento vascular dependente de endotélio em aorta de ratos hipertensos (58).

Dados bastante consistentes do nosso grupo (ainda não publicados) em aorta de camundongos apontam para um importante papel dos nAChRs $\alpha 7$ na vasodilatação dependente do endotélio mediada pela ACh. No entanto, a existência de outros componentes do sistema colinérgico não neuronal em vasos, o mecanismo pelo qual o nAChR participa da resposta vasodilatadora e se esses receptores são funcionais em vasos humanos, ainda não são conhecidos. Portanto, este trabalho propõe estudar a presença do sistema colinérgico não-neuronal em vasos humanos, bem como, avaliar a participação dos nAChRs no relaxamento vascular dependente de endotélio e o mecanismo pelo qual este receptor promove vasodilatação. Acreditamos que estes são dados de extrema relevância, pois muda um paradigma fisiológico já bem estabelecido na literatura de que só os mAChRs estariam envolvidos no relaxamento vascular dependente de endotélio

mediado pela ACh. Esses dados mostram também que a presença dos receptores colinérgicos no sistema vascular pode ter um papel fisiológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Endotélio vascular

O endotélio está localizado internamente no vaso e constitui a camada íntima (59). Trata-se de uma monocamada de células que desempenha funções importantes no controle da homeostasia e estabelece uma barreira entre o que está fora e dentro dos vasos sanguíneos (59-62). Permite o controle do recrutamento e o extravasamento de células imunes nos tecidos-alvo em todo o corpo, além de manter a estrutura da parede vascular (59). Somado a isso, o endotélio controla as alterações hemodinâmicas, é componente importante do sistema imune, produz uma variedade de mediadores que interfere no crescimento e proliferação de células e, ainda, participa do controle do tônus vascular através da síntese e liberação de fatores relaxantes, incluindo as prostaglandinas, óxido nítrico (NO) e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (59, 61, 63-68). Além dos fatores relaxantes, o endotélio também produz e libera fatores contráteis, como o tromboxano, as endotelinas e as prostaglandinas vasoconstritoras (69).

O endotélio vascular nem sempre teve a visibilidade que tem hoje. Inicialmente era descrito apenas como uma camada de células dentro dos vasos sanguíneos pela qual o sangue passava. No entanto, enormes avanços a partir da década de 1980 levaram a uma compreensão maior de suas funções e atualmente é aceito que a camada endotelial é também um complexo órgão endócrino (31, 39, 60, 62). Por sua localização estratégica, o endotélio tem ganhado o interesse de vários grupos de pesquisa. Em sua membrana celular são expressos uma variedade de receptores, que em resposta a variados estímulos, como a ACh, promove a síntese de moléculas importantes que participam do controle das funções fisiológicas. Através desses estímulos, o endotélio é capaz de produzir alguns produtos com importante resposta vasoativa (23, 31, 36, 39, 58-62, 65, 68-77).

Uma das moléculas chaves no controle da função vascular é o NO, produzido fisiologicamente pelas células endoteliais pela ativação das óxido nítrico sintases (NOS) (65). As NOS são monooxidases com um grupamento heme e catalisam a oxidação da L-arginina, tendo como produto a L-citrulina e o NO (75). Além de sua função importante no controle do tônus vascular, (64, 65, 71, 78-81), o NO possui ação inibitória sobre a

agregação e adesão de plaquetas e de leucócitos a parede vascular (27, 39, 78), como também inibe a proliferação celular (39, 64, 81). Essas propriedades conferem ao NO uma fundamental ação na fisiologia dos vasos sanguíneos e em muitos processos patológicos em que existe comprometimento da sua produção e/ou liberação(59, 79). Atualmente é descrita a caracterização de três formas da NOS: a NOS endotelial (eNOS); a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). A eNOS e a nNOS trabalham de forma constitutiva nos mais variados tecidos e são dependentes do cálcio para funcionar. Já a iNOS é induzida durante os processos inflamatórios, podendo funcionar mesmo em condições onde há baixas concentrações do cálcio (64, 67, 75).

A disfunção endotelial é causada principalmente pela redução da produção ou ação de EDHFs e do NO e pode ser um passo em direção às doenças cardiovasculares. De fato, as disfunções endoteliais em humanos tem atraído muita atenção nos cenários clínicos, porque serve como um excelente marcador de eventos cardiovasculares (31, 38, 63, 68).

2.2 Sistema colinérgico

A ACh é um dos mais antigos mediadores biológicos conhecidos sendo produzida em bactérias, protozoários, fungos, plantas e animais (6). Atua como mediador químico do sistema nervoso central (SNC), do sistema nervoso autônomo (SNA) e também da junção neuromuscular. Desde sua descoberta por Henry H. Dale e Otto Loewi no século passado, várias funções fisiológicas foram descritas para essa molécula. No SNA, desempenha um papel clássico e já bem estabelecido na digestão, controle do batimento cardíaco, pressão sanguínea, movimento entre outras funções (2, 15, 18, 20, 26, 31, 33, 35, 82-89). Embora tenha sido alvo central de atenção como uma molécula neurotransmissora, exerce outras funções em diversos tipos celulares, promovendo parte da organização do citoesqueleto, comunicação celular, proliferação, diferenciação celular, crescimento e apoptose (2-6, 33, 41, 42, 90-94).

A ACh, seus receptores e os componentes enzimáticos responsáveis pela sua síntese, degradação e transporte constituem o sistema colinérgico (6, 20, 95). O estudo desse sistema, principalmente das vias de sinalização intracelular que se iniciam pela ativação de seus receptores, tem sido utilizado na elucidação da fisiopatologia de várias síndromes neurológicas e psiquiátricas, bem como para o desenvolvimento de novas

alternativas terapêuticas. A relação entre o sistema colinérgico e algumas doenças como a de Parkinson, o Alzheimer e a esquizofrenia deixam clara a importância desse sistema (11, 13, 16-18, 20, 45, 49, 54, 73, 96-103).

A Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT) é a enzima responsável pela síntese da ACh a partir de acetil-coenzima A e colina. Esse processo se dá através da acetilação da colina levando à produção de ACh, coenzima A e H_2O_2 (32, 44, 92, 104)(Figura 1).

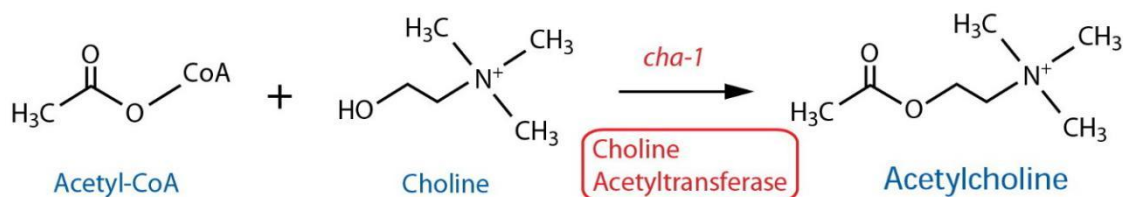


Figura 1. Esquema representativo da síntese da ACh a partir dos seus substratos.

As fontes de colina para a síntese de ACh provêm da circulação, além da sua recaptação após a liberação e degradação desse neurotransmissor pelo neurônio pré-sináptico, realizada pelo transportador de colina de alta afinidade (ChT1) do neurônio colinérgico (85, 105, 106). Uma vez sintetizada, parte da ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas, processo realizado pelo transportador vesicular de ACh (VAcHT). Esse armazenamento é executado via gradiente eletroquímico da bomba H^+ - ATPase e realiza a troca de dois prótons H^+ presentes no lúmen vesicular por uma molécula de ACh do citoplasma (85-87). Após ser liberada inteiramente por exocitose, a ACh interage especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré- e pós-sinápticas. A variabilidade de respostas moduladas pela ACh depende diretamente dessa interação com seus mais variados receptores em todos os órgãos e sistemas fisiológicos (7, 10, 11, 16, 17, 21, 22, 45, 49, 101, 107-110).

A ação da ACh cessa quando é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica. Atualmente existem descritos dois tipos de colinesterases que incluem: a) enzimas com alta afinidade para a ACh ligadas à membrana neuronal e presentes em todas as sinapses colinérgicas; b) enzimas com alta afinidade para a butirilcolina, também chamadas de butiril-acetil-colinesterases (BChE) presentes em todos os tecidos (3, 15, 87, 89, 111).

2.3 Receptores Colinérgicos

2.3.1 Receptores Muscarínicos

As ações metabotrópicas da ACh são mediadas pela ativação do mAChRs. Os mAChRs são receptores acoplados à proteína G de classe I e compreendem subtipos distintos, denominados M1, M2, M3, M4 e M5 (112). Estão distribuídos principalmente nos gânglios autônomos, órgãos inervados pelo sistema nervoso parassimpático e no SNC. Como citado previamente, o fator determinante para os efeitos modulados pela ACh é justamente o tipo de receptor ao qual ela se liga (16, 17). De forma clássica a ativação dos mAChRs, exibe uma série de efeitos bastante diversificados, podendo, no sistema nervoso periférico ter ações que incluem a redução da frequência e força da contração cardíaca, o relaxamento de vasos sanguíneos e a constrição das vias respiratórias (brônquios e bronquíolos) (22, 23). No SNC, estão envolvidos no controle da função extrapiramidal, vestibular, em funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção, em respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília. Todas estas funções diversificadas acontecem em função do tipo de proteína G ao qual eles estão acoplados (16, 21, 24).

Por pertencerem à superfamília de receptores acoplados à proteína G e estruturalmente serem proteínas de membrana contendo sete domínios transmembranares, os sítios de ligação específicos para ACh, agonistas e antagonistas muscarínicos estão presentes na região N-terminal e nas alças extracelulares. Após a ativação, os mAChRs induzem a formação de segundos mensageiros, ativando inúmeras vias de sinalização intracelular (113). A atividade da ACh ao se ligar a seus receptores depende da subunidade $G\alpha$ da proteína G que é ativada. Os mAChRs M2 e M4 preferencialmente acoplam-se a $G_{i/o}$ e muscarínicos M1, M3 e subtipo M5 a $G_{q/11}$ (113). Em alguns casos, as subunidades $G_{\beta\gamma}$ desempenham um papel na sinalização celular, fornecendo, por exemplo, um mecanismo pelo qual o receptor M2 ativa a fosfolipase $C\beta$ e modula condutâncias iônicas específicas. Os receptores M2 e M4 inibem a atividade da adenilato ciclase reduzindo os níveis intracelulares de AMP cíclico, além de prolongar a abertura do canal para potássio, canais de cátions não-seletivos e abertura de receptor canais de potencial transiente (TRPs) (114). Por outro lado, os mAChRs M1, M3 e M5 mobilizam fosfoinosítídeos para gerar inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) e 1,2-diacilglicerol, via ativação da fosfolipase $C\beta$ específica de fosfoinosítídeo, aumentando assim as concentrações de cálcio intracelular (17, 19, 22, 23, 115). Também foi demonstrado que os mAChRs podem regular uma matriz diversificada de

intermediários de sinalização. Assim, tanto o $G_{\alpha i/o}$ como os membros da subfamília acoplada a $G_{\alpha q/11}$ exercem efeitos no citoesqueleto através da ativação da pequena GTPase Rho (54, 73, 113, 116, 117). A ativação de mAChRs pode também ativar efetores que incluem receptores tirosina-quinases e proteína ativada por mitógeno (MAP) quinases. Estas últimas vias de sinalização parecem desempenhar importante papel nas funções autócrinas dos receptores muscarínicos em termos de controle do crescimento celular e proliferação (83).

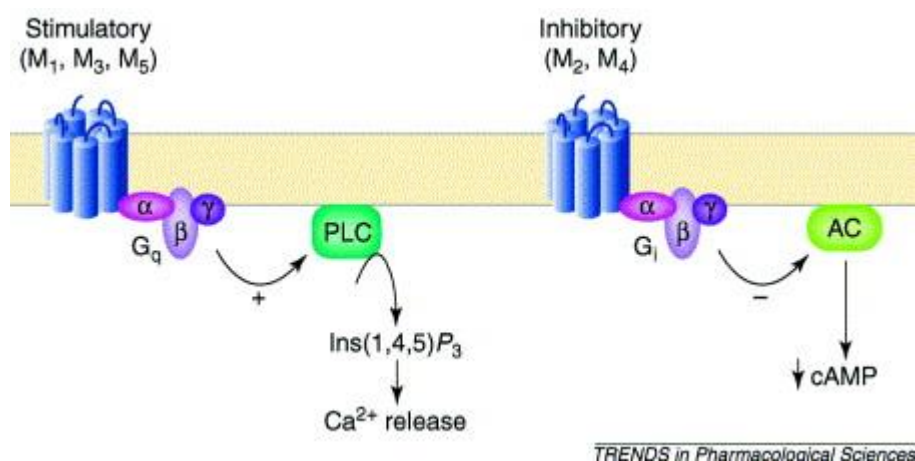


Figura 2. Esquema ilustrativo dos mAChRs. (A) Receptores M1, M3, M5 acoplados a proteína G estimulatória. (B) Receptores M2 e M4 acoplados a proteína G inibitória (97).

2.3.2. Receptores Nicotínicos

Os nAChRs da ACh pertencem à superfamília de receptores de canais iônicos ativados por ligantes loop-Cys homólogos, que incluem os nAChRs do tipo muscular, GABA_A, glicina e serotonina 5-HT₃ (98). Os nAChRs são canais catiônicos ativados por ACh que consistem em nove α subunidades ($\alpha 2$ a $\alpha 10$) e três subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (48, 98, 118-120). A conformação homomérica ($\alpha 7$ ou $\alpha 9$) ou heteromérica ($\alpha 2$ - $\alpha 6$ com $\beta 2$ - $\beta 4$) de cinco subunidades dá origem a muitos subtipos diferentes de canais que compartilham uma estrutura básica comum, possuindo, no entanto, propriedades farmacológicas e funcionais distintas (119). Todas as subunidades dos nAChRs têm uma arquitetura comum que consiste basicamente em um grande domínio extracelular N-terminal seguido por três domínios transmembranares hidrofóbicos denominados M1, M2 e M3, uma grande alça citoplasmática entre M3 e M4, denominada loop M3-M4, um quarto domínio transmembranar hidrofóbico (M4) e um pequeno domínio extracelular

carboxila (domínio C) (111). Os domínios transmembranares M1-M3 estão dispostos de maneira a formar camadas concêntricas ao redor de uma abertura central. O domínio M2 está alinhado a membrana e M4 está mais próxima à camada de lipídeos (89).

Os subtipos dos nAChRs foram redistribuídos em duas classes: receptores sensíveis a a-bungarotoxina, que se liga e bloqueia alguns tipos de receptores, mas não todos, sendo eles os homoméricos ($\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$), ou heteroméricos ($\alpha 7 \alpha 8$, $\alpha 9 \alpha 10$ e $\alpha 7 \beta 2$) e receptores insensíveis a a-bungarotoxina, que são formados pelas subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ e $\beta 2$ - $\beta 4$ e se ligam a nicotina e outros agonistas nicotínicos com alta afinidade (89). Os domínios N-terminal e transmembranares encontram-se com sua estrutura bem conservada entre as diferentes subunidades, enquanto o loop M3-M4 é diversificada e varia em comprimento e composição de aminoácidos entre os nAChRs (121). Essa alça citoplasmática contém inúmeras sequências distintas de aminoácidos que são importantes para interações com outros mensageiros intracelulares, e locais de fosforilação para várias quinases de serina/treonina e tirosina (122-124). Além disso, foi recentemente demonstrado que a alça intracelular da subunidade $\alpha 7$ contém um cluster de ligação a proteína G que promove a sinalização intracelular (53-55, 125).

As propriedades funcionais de cada subtipo são únicas, porém muito parecidas de maneira que é difícil distingui-los utilizando ferramentas farmacológicas, principalmente quando eles têm subunidades iguais ou com grande homologia, como por exemplo $\alpha 3$ e $\alpha 6$, ou $\alpha 2$ e $\alpha 4$ (102). Os nAChRs não são apenas permeáveis aos íons Na^+ e K^+ monovalentes, mas também aos íons Ca^{2+} . A expressão de $\alpha 7$ e $\alpha 9$ nAChRs homoméricas revela uma corrente de Ca^{2+} fracionária comparável àquela estimada para os receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), no entanto mais permeável aos íons Ca^{2+} quando comparado aos nAChRs heteroméricos (126). A capacidade dos nAChRs de alterar os níveis de cálcio intracelular leva à ativação de diferentes vias intracelulares que podem desempenhar um papel fundamental na sinalização e plasticidade neuronal (109).

Os subtipos neuronais mais amplamente expressos no sistema nervoso central são $\alpha 4 \beta 2$ heteromérico se os receptores $\alpha 7$ homoméricos, enquanto o $\alpha 3 \beta 4$ é o subtipo mais amplamente expresso no sistema nervoso periférico (15, 89). Além daqueles com diferentes composições de subunidades, alguns nAChRs têm a mesma composição de

subunidade, mas estequiometrias diferentes, como no caso dos subtipos $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$ (102, 111).

Os receptores $\alpha 7$ homoméricos são um dos dois subtipos de nAChR mais abundantes no SNC, onde estão localizados principalmente no córtex, hipocampo, hipotálamo e alguns núcleos do tronco encefálico. No entanto, evidências emergentes demonstram a presença de $\alpha 7$ nAChR heteroméricas em neurônios nativos. Em receptores heteroméricos as subunidades $\alpha 7$ formam canais funcionais com a subunidade $\beta 2(100)$, $\beta 3(127)$ ou $\beta 4(128)$. Outro trabalho recentemente identificou bioquimicamente um subtipo $\alpha 7\beta 2$ nativo, expresso em prosencéfalo basal de roedores e humanos, que possui propriedades funcionais e farmacológicas diferentes daquelas dos $\alpha 7$ nAChRs homoméricos (111, 129).

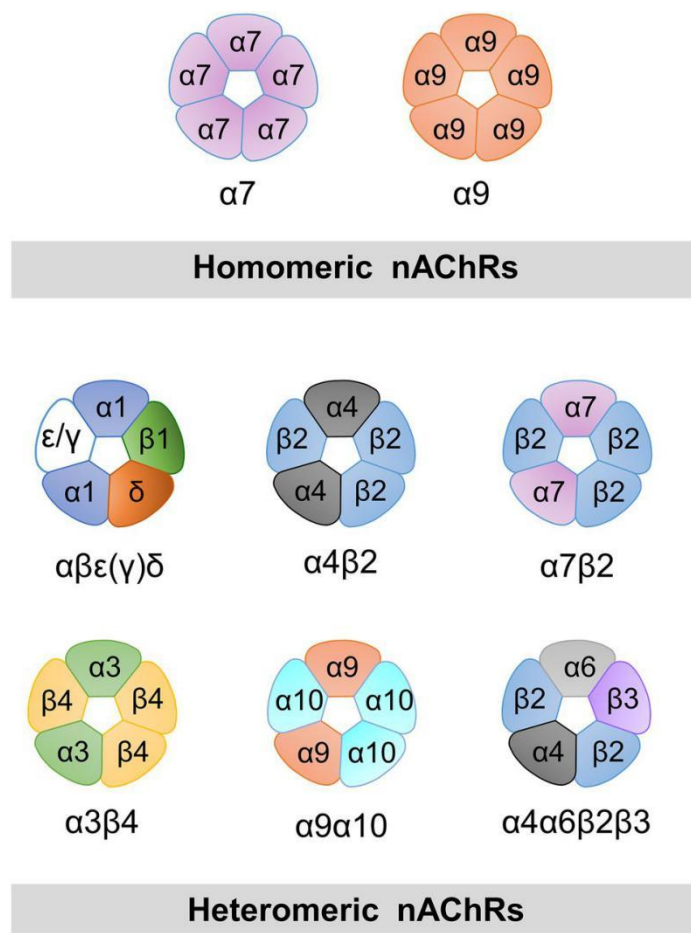


Figura 3: Esquema ilustrativo de Modelos de arranjos pentaméricos de nAChRs homoméricos e alguns heteroméricos funcionais. $\alpha 7$ e $\alpha 9$ são as únicas subunidades do tipo α capazes de formar receptores homoméricos funcionais, os quais contêm cinco

locais de ligação idênticos. Em α_7 , a ocupação de apenas um local é necessário para a ativação. Exemplos de combinações possíveis de subunidades α e não α em arranjos heteroméricos são mostrados. É necessária uma subunidade do tipo α para a face principal do local de ligação. O nAChR muscular contém dois locais de ligação funcional nas interfaces α / δ e α / ϵ (γ). Algumas subunidades podem se reunir com diferentes arranjos, como α_4 e β_2 . Além da disposição mostrada, os receptores $(\alpha_4)_3 (\beta_2)_2$ também são funcionais (130).

2.4 Sistema Colinérgico não-neuronal

O papel fisiológico da ACh em alguns tecidos foi negligenciado por muito tempo, provavelmente porque é rapidamente degradado pela enzima AChE para formar acetato e colina (6, 84, 91). Após sua descoberta, a maioria das pesquisas foi dedicada à exploração do sistema colinérgico neuronal, no qual a ACh exerce um papel clássico como neurotransmissor do sistema parassimpático pós-ganglionar, da junção neuromuscular, das glândulas sudoríparas da axila humana e de várias áreas importantes do cérebro. No entanto, há muito tempo já se conhecia a existência do sistema colinérgico em células não neuronais como bactérias, algas e protozoários antes mesmo que o sistema nervoso fosse descrito (6). Após a redescoberta do sistema colinérgico não-neuronal (SCNN) na década de 1990, a investigação concentrou-se na distribuição, nas funções, nos componentes moleculares e no seu envolvimento em condições patológicas. Mas além da pele, o SCNN foi encontrado em muitos sistemas de órgãos e, para alguns, seu papel fisiológico ou patológico já é descrito (31). Os receptores colinérgicos parecem ser expressos por quase todos os tipos de células; no entanto, a expressão dos receptores isoladamente não é uma indicação da presença do SCNN, já que para que o SCNN exista o tecido precisa apresentar capacidade de sintetizar e liberar ACh. Células que exibem apenas receptores colinérgicos podem servir como células efetoras para ACh sintetizada e liberada não neuronalmente ou neuronalmente. Assim, a presença de um SCNN deve ser caracterizada antes de considerar seu envolvimento em distúrbios órgão-específicos. Os mesmos componentes moleculares que são necessários para a síntese e liberação de ACh nos neurônios são frequentemente identificados em células não neuronais também (6-8, 21, 33, 40, 44, 85).

Nos neurônios e na maioria das células não neuronais, a ACh é sintetizada pela ChAT a partir da colina e da acetil coenzima A (6, 32). Alguns estudos mostram que a

ACh também pode ser produzida pela enzima carnitina acetiltransferase (CarAT) em algumas células não neuronais, células do músculo esquelético e o urotélio (82, 131). O que limita sua síntese é a recaptação do componente essencial colina. No sistema nervoso, isso é mediado pelo transportador de colina de alta afinidade-1 (CHT1) (106). Em algumas células não neuronais o CHT1 também está presente (132), enquanto em outros a recaptação de colina é realizada por proteínas transportadoras de colina (CTL1-5) (133) ou transportadores de cátions orgânicos (OCTs). Nos neurônios, a ACh é armazenada e liberada pelo VACHT (134), enquanto nas células não neuronais o VACHT é especificamente expresso em somente alguns tipos de células (135). Nas células que não expressam VACHT, a ACh geralmente não é armazenada, mas liberada diretamente via OCTs (7, 136). Além disso, a *mediatophore*, uma proteína de 220 kDa constituída de subunidades proteolípídicas de 15 kDa da H⁺ ATPase vacuolar, também pode estar envolvida nos processos de exocitose de ACh (137).

Como descrito anteriormente, a ACh extracelular exerce seu efeito sobre uma variedade de diferentes mAChRs e nAChRs (7, 16, 17, 21, 50). Recentemente, membros da superfamília de receptores ativadores de plasminogênio do tipo antígeno linfócito-6/uroquinase foram identificados como moduladores alostéricos endógenos de nAChR, como o SLURP (peptídeo relacionado ao receptor do ativador do plasminogênio tipo 6/uroquinase secretado pelo linfócito-6/uroquinase)-1 e 2 sendo um dos membros mais caracterizados (138). Por fim, assim como no sistema colinérgico neuronal, no SCNN a degradação da ACh em colina e acetato é catalisada pelas enzimas AChE e pela menos específica BchE (3, 87). Um desenho esquemático da SCNN com o maquinário de síntese, liberação e degradação de ACh, bem como os receptores colinérgicos e seus moduladores, está representado na figura 4.

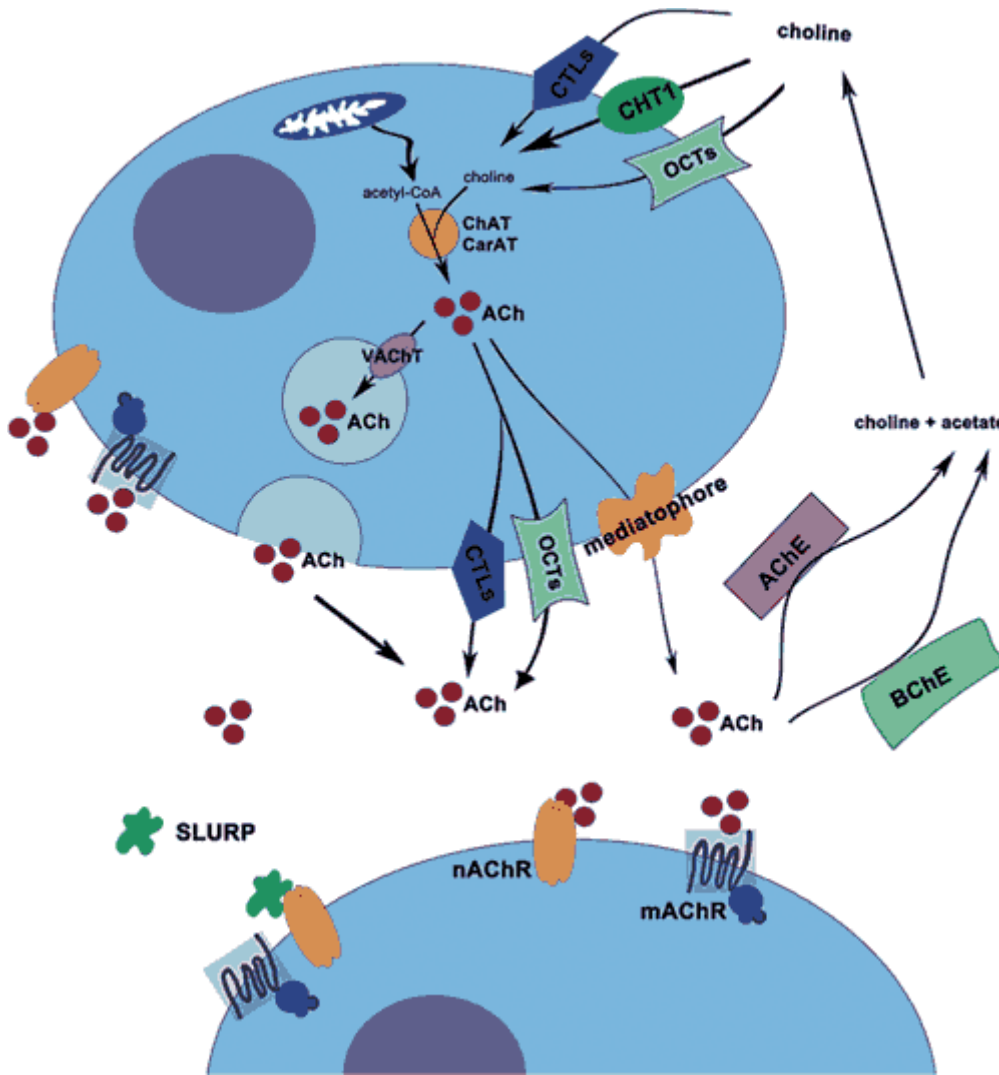


Figura 4: Desenho esquemático que resume os componentes da NNCS envolvidos na síntese, liberação, degradação e sinalização da ACh não neuronal (139). ACh (acetilcolina); AChE (Acetilcolinesterase) BChE (butirilcolinesterase); SLURP (peptídeo relacionado ao receptor do ativador do plasminogênio tipo 6/uroquinase secretado pelo linfócito-6/uroquinase); nAChR (receptores nicotínicos para a acetilcolina); mAChR (receptores muscarínicos para a acetilcolina); OCTs (transportadores de cátions orgânicos). VACHT (transportador vesicular da acetilcolina); CHT1 (transportador de colina de alta afinidade-1); ChAT (colina acetiltransferase); CarAT (carnitina acetiltransferase).

Nesse sentido, vários componentes do sistema colinérgico foram identificados em tecidos não inervados (41). A identificação da ChAT em células placentárias humanas (38) sugeriu a descoberta de um sistema colinérgico não neuronal funcional nesse tecido, que permitiria a produção local de acetilcolina (7, 8, 41, 45, 48, 85). Nos seres humanos,

a ACh e a ChAT, foram encontradas em diferentes tipos de sistemas fisiológicos, principalmente em células epiteliais (vias aéreas, trato gastrointestinal, trato urogenital, epiderme (41, 85), mesotélio (pleura, pericárdio), células endoteliais, musculares lisas e imunes (células mononucleares, granulócitos, macrófagos alveolares, mastócitos) (3, 8, 20, 31, 32, 64, 140).

Além da expressão de ChAT em células não neurais, a expressão de nAChRs, mAChRs e colinesterase em vários tecidos do corpo foi descrita (3, 4, 41, 42, 90, 94). Além disso, funções endócrinas da ACh no endotélio vascular cerebral (58) e no epitélio pulmonar (84), assim como em outros tecidos, também foram descritas (31, 33, 105, 141). Essa ampla distribuição não neuronal dos componentes do sistema colinérgico sugere uma sinalização local desse sistema, com uma ação parácrina ou mesmo autócrina sendo exercida pela ACh (42) (23, 51, 61). A ACh foi encontrada em diversos tipos celulares, promovendo parte da organização do citoesqueleto, comunicação celular, proliferação, diferenciação celular, crescimento e apoptose (7, 41, 90). A presença desses componentes em vasos sanguíneos o que permite a síntese local da ACh aponta para um papel funcional do sistema colinérgico no controle vasomotor (39, 58).

Existem receptores para acetilcolina no endotélio vascular e na musculatura lisa e é um consenso que a estimulação dos mAChRs medeiam os relaxamentos dependentes do endotélio induzidos pela acetilcolina (6, 34, 35). O subtipo M3 parece ser prevalente nas células endoteliais e nas células musculares lisas (21). De forma mais aplicada ao nosso trabalho, estudos de expressão de mRNA revelaram uma distribuição variada dos cinco subtipos conhecidos de mAChRs em vários leitos vasculares (32, 33). No entanto, o que se sabe atualmente é que nem todos subtipos dos mAChRs expressos em determinados vasos sanguíneos contribuem para a resposta vasodilatadora à ACh. Em adição, estudos com experimentos utilizando ferramentas farmacológicas ou estudos utilizando camundongos deficientes para os genes alvo de um dos três subtipos de receptores (M1^{-/-}, M3^{-/-}, e M5^{-/-}) demonstraram que o subtipo M3 é o principal mediador da resposta vasodilatadora endotélio dependente em resposta a ACh na aorta (19, 23). Entretanto outros estudos demonstram de forma surpreendente que os receptores M1 e M5 podem estar envolvidos na resposta vasodilatadora mediada pela ACh. Estudos farmacológicos que fazem uso de inibidores seletivos para o subtipo M1 sugerem que este receptor está envolvido no relaxamento vascular colinérgico das artérias carótidas de ratos, no ramo perfurante da artéria mamária interna humana, pulmonar humana e artérias

linguais de caninos (37, 142-145). Outros trabalhos demonstram que o subtipo M5 do receptor medeia a resposta vasodilatadora nos vasos cerebrais dos seres humanos, bovinos e de camundongos (146, 147).

As células endoteliais também expressam várias subunidades dos nAChRs ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$ (27-29, 85, 148-150). Através do emprego de patch-clamp, foi demonstrada a presença do AChRs do subtipo funcional $\alpha 3$ AChRs em culturas de células endoteliais (31). A ACh, atuando nos nAChRs endoteliais, principalmente do subtipo $\alpha 7$, também modula a vascularização e remodelamento (54, 56, 95).

Em trabalhos que demonstram a expressão gênica dos nAChRs, já foi demonstrado que estes receptores são expressos em várias regiões da aorta de ratos, as subunidades identificadas no endotélio foram ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$) (7). Outros estudos demonstram que a nicotina, um potente agonista nicotínico, promove angiogênese através da ativação de nAChRs não-neuronais (56, 72). A mecamilamina, um inibidor não seletivo dos nAChRs, pode inibir completamente a formação da rede endotelial necessária para o progresso da formação de novos vasos. Resultados semelhantes foram obtidos com a α -bungarotoxina, um inibidor seletivo do nAChRs $\alpha 7$ (56). De forma aditiva ao seu efeito pró-angiogênico, a ativação do $\alpha 7$ pode regular a liberação de EDRFs (58).

Estudos com células endoteliais humanas demonstraram a expressão de nAChRs funcionais formados por combinações das subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$ e $\beta 4$ (31). Outros autores sugerem o envolvimento de $\alpha 7$ nAChRs na transmissão do sinal de processos biológicos, tais como: a proliferação, sobrevivência, migração e formação do tubo, em células endoteliais (2, 52, 108). Os subtipos de nAChRs mais importantes envolvidos nesses processos mencionados são os AChRs $\alpha 7$ homoméricos (2, 28, 31, 33, 52, 104, 108, 151, 152) e as outras subunidades α nAChR (2, 153), incluindo nAChRs contendo $\alpha 3\beta 4$ (31).

A descoberta e caracterização de receptores nAChRs funcionais no endotélio (18, 36, 39, 59, 61, 65, 68, 154) levantaram a hipótese de que os nAChR poderiam participar da resposta vasodilatadora dependente de endotélio induzida pela ACh em humanos, permitindo assim um papel fisiológico deste sistema em vasos não inervados. O estudo da sinalização colinérgica não neuronal local fornece uma melhor compreensão do

controle vascular em situações fisiológicas. A ampliação desse conhecimento para estados patológicos permite o desenvolvimento de terapias mais efetivas, como o tratamento da hipertensão e da aterosclerose, patologias em que os nAChRs parecem atuar de maneira significativa (3, 8, 15, 28, 32, 43, 44, 54, 91, 92, 94, 155-157).

Nesse sentido, apesar de poucas evidências na literatura mostrando um papel funcional dos nAChRs, em especial o $\alpha 7$ relaxamento vascular mediado pela ACh (28, 58). Dados bastantes consistentes do nosso grupo (ainda não publicados) mostraram que os $\alpha 7$ nAChR estão expressos no endotélio da aorta de camundongo, são funcionais e participam da vasodilatação dependente do endotélio mediada pela ACh. Acreditamos que estes são dados de extrema relevância, pois muda um paradigma fisiológico já bem estabelecido na literatura de longa data, de que só os receptores muscarínicos estariam envolvidos no relaxamento vascular dependente de endotélio mediado pela ACh.

Fundamentando-se nos dados acima descritos e sabendo-se que estudos avaliando o papel dos nAChR em vasos humanos ainda são inexistentes, acreditamos que caracterizar a existência de um sistema colinérgico não neuronal e avaliar o papel dos nAChRs na vasodilatação induzida pela ACh em vasos humanos seria de grande relevância. Além disso, utilizando aorta de camundongos e uma linhagem de células endoteliais humanas sugerimos um possível mecanismo pelo qual os receptores nicotínicos então envolvidos na resposta vasodilatadora por uma via de sinalização complexa, que parece envolver os mAChRs, a pequena proteína G Rho-A e os TRPs.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Verificar a existência de componentes do sistema colinérgico em vasos humanos
- 3.2. Avaliar o papel dos receptores nAChRs na resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzido pela ACh em vasos humanos: artéria mamária e veia safena.
- 3.3. Avaliar o mecanismo pelo qual os nAChRs $\alpha 7$ contribuem para a resposta vasodilatadora dependente de endotélio. Para avaliar este mecanismo utilizamos a aorta de camundongo e cultura de uma linhagem de células endoteliais humanas (as células híbridas EA.hy926).

4. METODOLOGIA DE TRABALHO

4.1. Aspectos éticos

Humanos: o uso dos tecidos humanos para os experimentos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE # 82247717.9.0000.5149). Os dados dos pacientes como idade, sexo, doenças associadas, uso de medicamentos pré- e pós-operatórios, foram obtidos, mantendo-se a ética e o sigilo. Os vasos foram provenientes do Hospital das Clínicas e o Prof. Dr. Cláudio Gelape (médico cirurgião) foi responsável pelas cirurgias e fornecimento dos vasos. Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

Camundongos: os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA #86/2015).

4.2. Modelos vasculares

Humanos: Foram utilizados segmentos de artéria mamária e veia safena humana de 64 pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 41 e 72 anos, submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio (CRVM). Apenas fragmentos sadios dos vasos foram utilizados.

Camundongos: Foram utilizados segmentos de aorta de camundongo C57BL/6 machos com idade entre 11 e 13 semanas, provenientes do centro de bioterismo da UFMG (CEBIO). Os animais tiveram livre acesso a ração e água e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00h) com temperatura variando entre $25 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

4.2.1. Obtenção dos vasos.

Humanos: Após o procedimento cirúrgico, os vasos foram mantidos em solução fisiológica de Ringer glicosado gelado (mM: NaCl 111,0; KCl 5,0; NaH_2PO_4 0,5; NaHCO_3 10,0; CaCl_2 1,5; MgSO_4 1,0 e glicose 5,0) e rapidamente transportados ao laboratório. Os vasos foram cuidadosamente dissecados, cortados em anéis de 3 a 4 mm e submetidos aos estudos de reatividade vascular (ver item 3.5). Para realização dos

experimentos de Western blot e PCR “real time”, os vasos foram, logo após a cirurgia, congelados em nitrogênio líquido. Após chegada ao laboratório os vasos congelados foram mantidos em um freezer -80 °C.

Camundongos: Os animais foram sacrificados por decapitação e a aorta torácica foi removida de forma cuidadosa e posteriormente transferida para uma placa de Petri com solução de *Krebs-Henseleit* (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂.2H₂O 2,5 mM; glicose 11 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; Merck® Alemanha) a baixa temperatura, para remoção de excessos de tecido adiposo e conjuntivo. A aorta foi seccionada em anéis de 2 a 3 mm de comprimento. Para os experimentos de co-immunoprecipitação, após a aorta ter sido retirada, foi realizada a dissociação das células endoteliais do músculo liso e as células endoteliais e musculares separadas foram mantidas em um freezer -80 °C.

4.3. Análise semi-quantitativa dos níveis de mRNA por RT-PCR

A expressão gênica dos principais componentes do sistema colinérgico foi avaliada na artéria mamária e veia safena humana utilizando placas de 96 poços adaptadas a 8 genes diferentes (TaqMan Array 96 - Well Fast plate P / N: 4413258 - Ordem de produto 2502901). Todos os genes foram listados na tabela 1. O RNA foi isolado utilizando o reagente Trizol TM (Número de catálogo: 15596018 - Thermo Fisher Scientific). A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm e 280nm (Epoch Spectrophotometer, Biotek®). 1 µg de RNA foi tratado com DNase I (Número de Catálogo: AMPD1, Sigma-Aldrich®) e o produto da reação foi usado diretamente na transcrição reversa (cDNA de alta capacidade, Applied Biosystems - número cat.: 4368813). O RT-qPCR foi realizado em um volume final de 10µL, utilizando o Master Mix Avançado Rápido TaqMan® (número de catálogo: 4444558, Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante das placas. O qPCR foi conduzido no StepOne™ (Applied Biosystems). Os resultados foram expressos como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, sendo o 18S o gene de referência e o GAPDH o gene controle.

Tabela 1: Expressão gênica avaliada

Gene name	Assay ID gene	Gene symbols
Eukaryotic 18S rRNA	Hs99999901_s1	18S
Choline O-acetyltransferase	Hs00252848_m1	CHAT
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1	GAPDH
Solute carrier family 5 member 7	Hs00222367_m1	SLC5A7
Cholinergic receptor muscarinic 3	Hs00265216_s1	mAChRM3
Butyrylcholinesterase	Hs00992319_m1	BCHE
Acetylcholinesterase	Hs01085739_g1	ACHE
Cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit	Hs01063373_m1	nAChR α 7

4.4. Experimentos de reatividade vascular

4.4.1 Montagem dos vasos

Os anéis de artéria mamária, veia safena e aorta foram montados em um sistema para órgãos isolados, conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo (64, 67, 68). Para tal, os anéis foram conectados a duas hastes triangulares metálicas, uma acoplada a um dispositivo para o ajuste da tensão e outra a um transdutor de tensão. Os anéis de veia safena, artéria mamária e aorta de camundongo foram mantidas em solução modificada de Krebs (mM): NaCl 118,3; KCl 4,7; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; glicose 11,1 e Na₂EDTA 0,0026 à 37°C, gaseificadas com carbogênio, sob tensão de 4, 1 e 0,5g, respectivamente. Os registros foram obtidos por meio de transdutores de tensão isométrica, conectados a um amplificador (TBM-4; World Precision Instruments, Inc., USA), sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (AD16JR; World Precision Instruments, Inc. USA). O programa WinDaq Data Acquisition (Dataq® Instruments, USA) foi utilizado para aquisição e análise dos dados experimentais. Após o período de estabilização, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (0,3µM para aorta de camundongo e 0,3 a 1,0 µM para os vasos humanos) e, no platô da contração, a ACh (10 µM) foi adicionada para avaliação da presença de endotélio funcional. Neste estudo foram utilizados os vasos com respostas vasodilatadoras maiores que 80% para aorta de camundongo. Para as artérias matéricas foram considerados vasos com relaxamento que variaram de 40 a 80% (158) e para a veia

safena 30 % (67, 68, 159). Os vasos que apresentaram respostas contráteis ao KCl 80 mM menores que 2 e 0,5 g, respectivamente, foram descartados (64, 68, 160).

4.4.2. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela ACh frente aos inibidores nicotínicos e muscarínicos.

4.4.2.1. Participação dos nAChRs na resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina em veia safena e artéria mamária de humanos.

Curvas concentração-resposta cumulativas à ACh (1nM a 100µM) foram realizadas nos vasos pré-contraídos com fenilefrina e seus efeitos avaliados. A participação dos nAChRs na resposta vasodilatadora à ACh foi avaliada em experimentos onde os vasos foram pré-incubados com: D-tubocurarina (antagonista não seletivo dos nAChRs), α -bungarotoxina (antagonista seletivo dos nAChR α 7), PNU-282987 (agonista seletivo para os nAChR α 7), e DMPP (agonista não seletivo dos nAChRs). A escolha dos agonistas e antagonistas foi realizada levando em consideração dados preliminares obtidos no laboratório em camundongos.

4.4.2.2. Participação dos mAChRs na resposta vasodilatadora induzida pela ACh em veia safena e artéria mamária de humanos

A participação dos mAChRs na resposta vasodilatadora à ACh foi avaliada em experimentos onde os anéis vasculares foram pré-incubados com o antagonista não seletivo atropina. Após a incubação, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina em vasos pré-contraídos com fenilefrina e seus efeitos foram avaliados. Todos os experimentos foram feitos com o intuito de avaliar uma possível interação entre os receptores nAChRs e mAChRs.

4.4.3. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela muscarina frente aos inibidores de Rho e Rhokinase em aorta de murinos

Curvas concentração-resposta cumulativas à muscarina (1nM a 100µM) foram realizadas nos vasos pré-contraídos com fenilefrina e seus efeitos avaliados. A participação da pequena proteína G Rho-A e da Rhocinase na resposta vasodilatadora à muscarina foi avaliada em experimentos onde os vasos foram pré-incubados com: Rhosin (inibidor de RhoGTPase) e Y-27632 (Inibidor de Rho-A quinase (ROCK)).

4.4.4. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela ACh frente aos inibidores de TRPs em aorta de murinos

Curvas concentração-resposta cumulativas à ACh (1nM a 100µM) foram realizadas nos vasos pré-contraídos com fenilefrina e seus efeitos avaliados. A participação dos canais potenciais de receptores transitórios (TRPS) na resposta vasodilatadora à ACh foi avaliada em experimentos onde os vasos foram pré-incubados com: Ruthenium Red (RuR) 10 uM, bloqueador não seletivo de TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV6, TRPA1 e TRPM6; 2-APB (20 uM) e SKF-96365 (3 uM), bloqueadores de TRPC3, TRPV6 e TRPV7 ; Gadolinium (20 uM), bloqueador de TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3 e TRPA1; Lanthanum (20 uM), bloqueador de TRPM1, TRPC1, TRPC3, TRPC5, TRPC6 e TRPC7.

4.5. Experimentos de co-imunoprecipitação

Os experimentos de co-imunoprecipitação foram realizados para avaliar a possibilidade de uma interação física entre os nAChRs e mAChRs presentes no endotélio dos vasos estudados no presente estudo. A imunoprecipitação foi realizada utilizando “beads” magnéticas, ligadas a proteínas A/G (GE Healthcare®).

4.5.1. Preparação das amostras

Primeiramente, os tecidos foram lisados em 0,5 mL do tampão para imunoprecipitação gelado (NaCl150mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM (pH 8,0), orto-vanadato de sódio 0,2 mM, PMSF 0,2 mM, Triton X-100 1%, NP-40 0,5%). As amostras foram centrifugadas a 4°C durante 5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, a concentração de proteínas foi ajustada para cerca de 1 mg/mL com tampão de imunoprecipitação.

4.5.2. Preparação das “beads” magnéticas

As esferas magnéticas foram lavadas em tampão fosfato (PBS), durante cinco minutos, 15 vezes em temperatura ambiente. Após as lavagens, foi realizado o bloqueio com solução de albumina em PBS.

4.5.3. Imunoprecipitação

Quinhentos microgramas de proteína foram incubados com 2 µg de anticorpo anti M3 mAChRs (Santa Cruz Biotechnology) por duas horas sob agitação leve a 4°C seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Em seguida, estas amostras foram imunoprecipitadas com dez microlitros de esferas magnéticas proteína G (Millipore, Billerica, MA), preparadas conforme descrito acima, durante toda a noite a 4 ° C, sob agitação constante. Proteínas ligadas foram imunoprecipitadas em adição de 50 µl de solução de 150 mM de NaCl e 25 mM de Tris em PBS-1X, pH 7,4, durante 3 min e eluídas pela adição de 60 µl de 0,2 M de glicina-HCl, pH 2,5, por 2 min. O sobrenadante foi neutralizado pela adição de 5 µl de Tris-HCl 1 M, pH 8,5, e analisado por Western blotting usando anticorpo contra nAChRs anti $\alpha 7$ (1: 1000; Santa Cruz Biotechnology; fonte: coelho). Extratos celulares foram também imunoprecipitados contra soro de coelho normal (60µg) para avaliar a especificidade dos nossos anticorpos.

4.6 Determinação da expressão proteica por Western blot

A primeira etapa dos experimentos de Western blot foi realizada com o objetivo de confirmar a expressão proteica dos nAChR $\alpha 7$ e mAChR M3. A segunda etapa consistiu em avaliar os produtos de co-imunoprecipitação. Para tal, as amostras foram aplicadas em uma proporção de 50 µg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodiumdodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 10%. Após serem separadas no gel de poliácridamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore®, USA) com poro de 0,45 µm. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 3% de albumina). Após o bloqueio, a membrana foi incubada durante toda a noite em câmara fria (6-8°C) com o anticorpo primário específico diluído em 3% de albumina em TBS-Tween. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:5000), diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (*kit* ECL plus) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell, Mini

Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD®) e o fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare®).

4.7 Separação de células endoteliais do músculo liso

Para os experimentos de western blot e co-imunoprecipitação previamente foi realizada a dissociação das células endoteliais do músculo liso. Os vasos foram incubados com uma solução de colagenase 0,5 mg/mL que foi inserida no lúmen dos vasos com auxílio de uma seringa. As extremidades dos vasos foram fechadas mecanicamente e a solução foi mantida dentro dos vasos por 20 minutos em estufa a 37°C. Em seguida o lúmen do vaso foi lavado com solução tampão fosfato salino (PBS) estéril. O lavado foi centrifugado por 5min a 2000 rpm/4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com solução de RIPA 1X acrescida com inibidores de proteases (*Sigma Fast*).

4.8 Cultura de EA.hy926 e Tratamento

Para as dosagens de cálcio intracelular foram utilizadas uma linhagem de células endoteliais humanas (as células híbridas EA.hy926, derivadas das células primárias HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells) comercialmente disponível (ATCC, USA). As células foram cultivadas em garrafas de culturas contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em estufas de CO₂ a 5%, e temperatura constante de 37°C. Foram realizadas passagens sucessivas das células a cada 2-3 dias, após atingirem uma confluência de aproximadamente 80%. Como parte do controle de qualidade dos experimentos realizados em nosso laboratório, a cultura das células foi monitorada quanto a possível contaminação por micoplasma, conforme descrito no Anexo IV. Para realização dos experimentos, o SFB do meio de cultura era reduzido a 1% por pelo menos 12h de antecedência e durante o experimento era totalmente retirado. Os ensaios experimentais foram realizados em placas de culturas e a densidade celular ajustada conforme cada experimento.

4.9 Dosagem de cálcio intracelular

As células EA.hy926 foram semeadas em lâminas de vidro 24 horas antes da captura da imagem. As células foram então carregadas com 6 μ M de Fluo-4 / AM (Invitrogen, Eugene, OR) por 15 minutos a 37 ° C. As lâminas foram analisadas em um microscópio Zeiss Apotome (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY), emantidas em tampão HEPES, estimulado com ACh (10 μ M), muscarina (10 μ M), nicotina (10 μ M), PNU 282987 (100 nM) e GSK- 1016790 (100 nM) 20 s após o início dos registros. Foram adquiridas também amplitudes normalizadas pela exposição basal de células tratadas com atropina (1 μ M), α -bungarotoxina (1 μ M), Rhosin (10 μ M), HC067047 (1 μ M) e GSK- 2193874 (100 nM) por 10 minutos e estimuladas com muscarina 10 s após o início do registro. A concentração intracelular de cálcio [Ca²⁺]_i foi monitorada nessas células por excitação a 488 nm, enquanto a luz emitida passava por um filtro (510 a 525nm), com emissão máxima do fluo-4 em 516 nm. Após a captura do sinal de cálcio com auxílio do microscópio confocal Zeiss Apotome, objetiva de 10x, as imagens foram analisadas no Image J (NIH, Bethesda, MD), selecionando-se cada célula para coleta da intensidade de pixel em cada segundo. Para cada célula, foi considerado como basal (amplitude basal) a média dos valores antes da aplicação do estímulo. Desta forma, os valores pós-estímulo foram calculados com base na determinação da amplitude basal de cada célula no campo, sendo considerados n=150 células/campo, em no mínimo três preparações para análise da amplitude total (161).

4.10 Análises estatísticas e expressão dos resultados

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0. Os dados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução da contração induzida pela fenilefrina e foram expressos como média \pm EPM. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto por meio da ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados de PCR foram expressos como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, sendo o 18S o gene de referência e o GAPDH o gene controle. Os dados de Western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de β -actina ou GAPDH de cada amostra e foram analisados por meio da ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. Os sinais de [Ca²⁺]_i foram extraídos com o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) e plotados. Foram selecionadas pelo menos 100 células por campo e analisadas a fluorescência de acordo com o basal de cada célula em cada grupo.

5. RESULTADOS

5.1 Análise semi-quantitativa dos níveis de mRNA por RT-PCR na artéria mamária e veia safena

Para avaliar a presença de componentes do sistema colinérgico na artéria mamária e veia safena utilizamos a técnica de RT-PCR. Os dados de RT-PCR mostram a expressão gênica de componentes do sistema colinérgico responsáveis pela síntese, transporte e degradação da ACh, como a BChE, AChE, transportador de colina de alta eficiência (SLC5A7), bem como dos receptores mAChRM3 e nAChR $\alpha 7$ na artéria mamária (Figura 5) e veia safena (Figura 6). Por se tratar de humanos e da baixa disponibilidade do material em estudo, escolhemos avaliar apenas o subtipo nAChR $\alpha 7$, levando em consideração resultados prévios de expressão gênica de nAChRs do nosso grupo de pesquisa, em aorta de camundongos, que demonstrou maior quantidade relativa de expressão do nAChR $\alpha 7$ quando comparado aos demais nAChRs. As análises foram realizadas individualmente por paciente, já que existia uma variabilidade intrínseca a cada um deles. Não foi identificada a expressão gênica da CHAT, responsável pela síntese de ACh a partir de colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA), em nenhum dos pacientes avaliados. Estes dados são consistentes com outros dados da literatura que mostram que em células não neuronais, como células musculares, epiteliais e na maxila, a ACh pode ser produzida pela carnitina acetiltransferase (CarAT) e não pela CHAT (85, 87, 131).

A expressão gênica de vários componentes do sistema colinérgico sugere a presença de um SCNN nesses vasos que permite a produção local de ACh. Esses achados mostram evidências claras de que a presença de receptores colinérgicos em vasos não inervados não é um fato perdido na evolução, como se acreditava. Mais importante estes dados suportam a ideia de que a ACh pode participar fisiologicamente como uma molécula sinalizadora autócrina e/ou parácrina de funções celulares essenciais como por exemplo a resposta vasodilatadora.

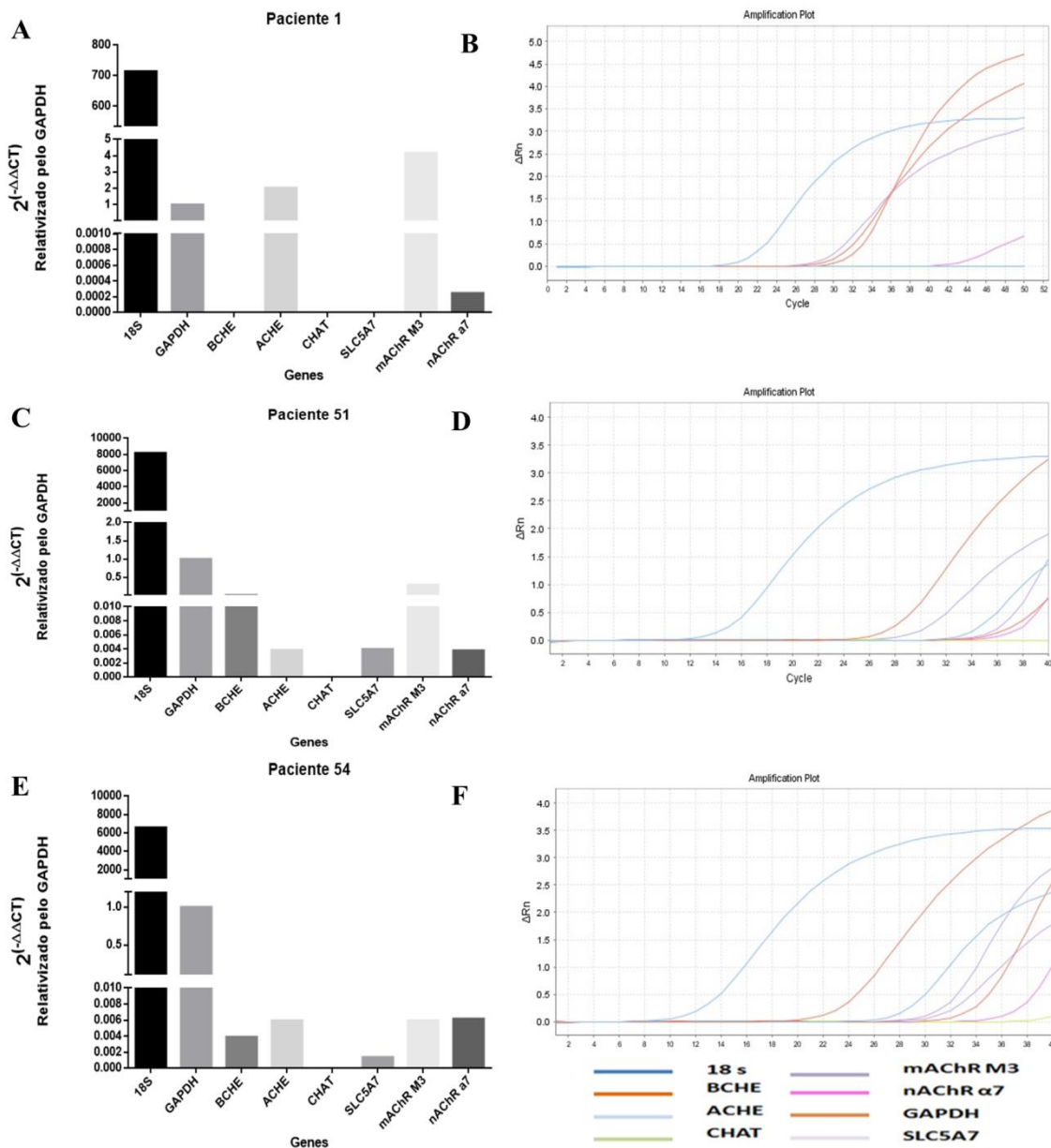


Figura 5. Expressão gênica dos componentes do sistema colinérgico não neuronal na artéria mamária humana. Butirilcolinesterase (BCHE), acetilcolinesterase (ACHE), transportador de colina de alta eficiência (SLC5A7), colina O-acetiltransferase (CHAT), mAChRsM3e nAChR α 7. Os dados foram expressos individualmente por paciente. (A, C e E). Cada gene foi expresso como 2-delta delta Ct, (onde $[\Delta][\Delta] Ct = [\Delta] Ct, amostra - [\Delta] Ct, referência$). (B, D e F) respectivas curvas de amplificação para cada gene expressos como Delta Rn (Variação da intensidade de fluorescência), onde Rn = sinal do fluorocromo normalizado pelo sinal de referência passiva (ROX) – linha de base.

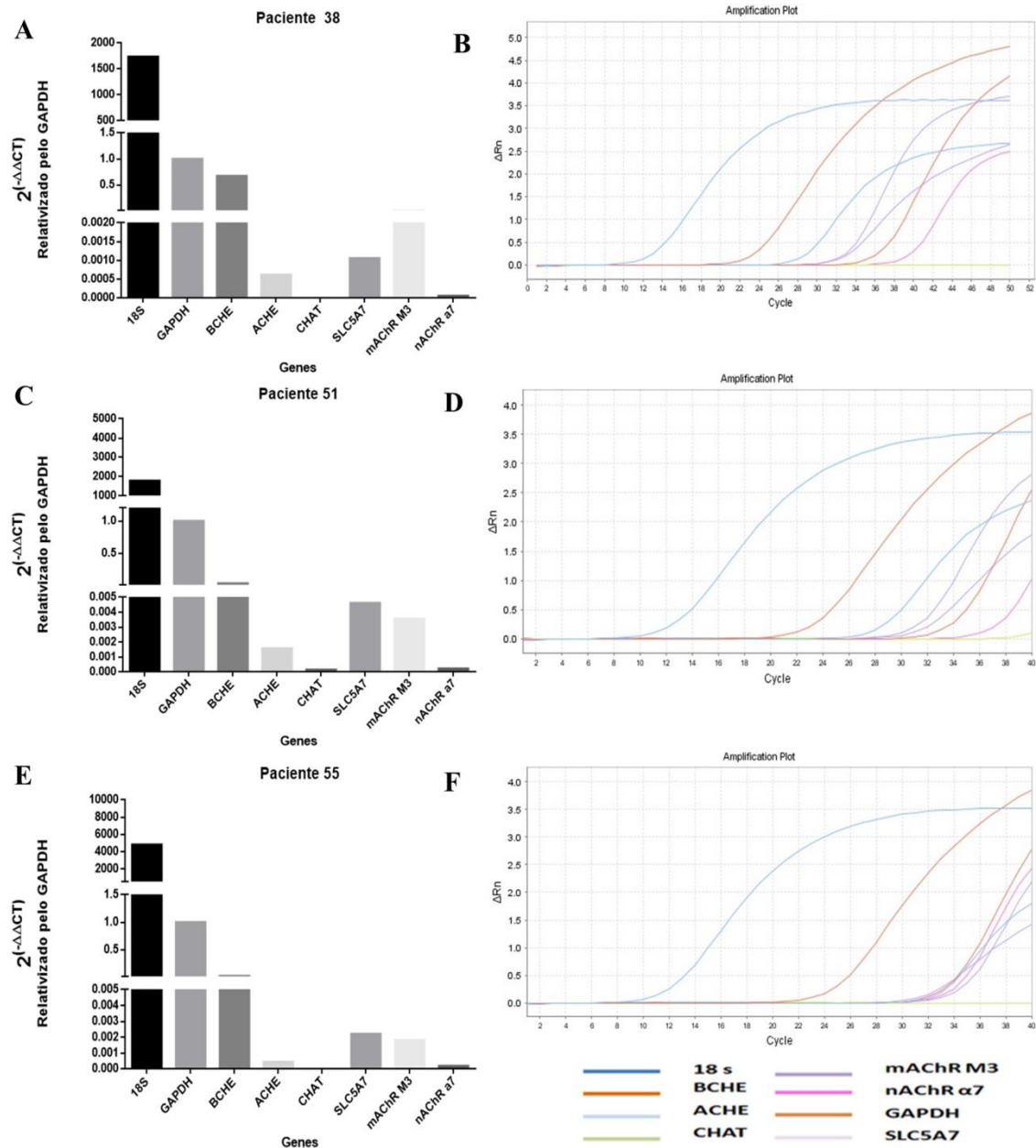


Figura 6. Expressão gênica dos componentes do sistema colinérgico não neuronal na veia safena humana: Butirilcolinesterase (BCHE), acetilcolinesterase AChE), transportador de colina de alta eficiência (SLC5A7), colina O-acetiltransferase (CHAT), mAChRs M3 e nAChR $\alpha 7$. Os dados foram expressos individualmente por paciente. (A, C e E) Expressão total como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (onde $[\Delta\Delta Ct] = [\Delta Ct]_{amostra} - [\Delta Ct]_{referência}$). (B, D e F) respectivas curvas de amplificação para cada gene expressos como ΔRn (variação da intensidade de fluorescência), onde $Rn = \text{signal do fluorocromo normalizado pelo signal de referência passiva (ROX)} - \text{linha de base}$.

5.2 Determinação da expressão proteica dos nAChR $\alpha 7$ e do mAChR M3

Partindo dos resultados acima descritos, o próximo passo foi avaliar se além da expressão gênica, existe a expressão proteica dos mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ na veia safena e artéria mamária de humanos. A princípio foi realizada uma validação dos anticorpos anti mAChR M3 e anti nAChR $\alpha 7$ (Biotecnology Santa Cruz). Esta validação foi feita na aorta de camundongo e fazem parte da tese do doutorando Thiago Frederico Diniz do nosso programa de pós-graduação. Elas serão mostradas aqui com o intuito de mostrar a especificidade do anticorpo utilizado. As membranas representativas (Figura 7A e B) de cinco experimentos realizados de forma independentes mostram que esses receptores são expressos em células endoteliais e musculares lisadas de aorta de camundongo. O diafragma foi usado como controle positivo. Esses dados confirmam a especificidade de nosso anticorpo em se ligar a nossa proteína de interesse. Outro controle realizado, foi o silenciamento gênico *in vivo* por antisense (162) do nAChR $\alpha 7$. A sequência de oligonucleotídeos foi injetada 24, 48 e 72 h antes da retirada da aorta para realização dos experimentos de Western blot. Os dados mostram que nos tempos de 48 e 72 horas, houve com uma redução de 89% e 82 %, respectivamente (Figura 8). Com 24 h não houve redução da expressão e os dados não foram mostrados. Estes dados também confirmam a especificidade do nosso anticorpo. Na sequência analisamos a expressão proteica dos receptores nicotínicos e muscarínicos no endotélio da veia safena e da artéria mamária. Os receptores nAChR $\alpha 7$ e mAChR M3 estão expressos no endotélio vascular de artéria mamária (Figura 9A) e veia safena (Figura 9B). Esses dados corroboram os dados de expressão gênica e dá suporte a hipótese da existência de um sistema colinérgico não-neuronal em vasos humanos.

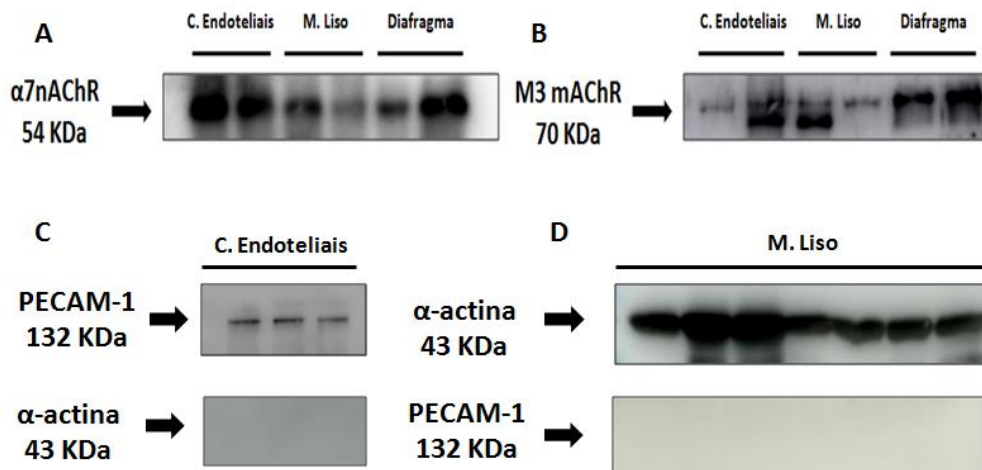


Figura 7. Expressão proteica dos receptores mAChRs M3 e nAChRs $\alpha 7$ por Western blot. As imagens são representativas de 5 experimentos usando anticorpo anti $\alpha 7$ nAChR (1: 1000; Biotechnology Santa Cruz; feito em coelho) (A) e anti M3 (1: 1000; Santa Cruz Biotechnology; feito em coelho) (B). Foram utilizados extratos protéicos de células endoteliais, músculo liso de aorta e diafragma. Foi realizado em outro controle para mostrar que o processo de separação das células endoteliais do músculo liso foi eficiente. Em (C) é mostrado a marcação de molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) nas células endoteliais e a ausência de α -actina. No músculo liso (D), é demonstrada e marcação de α -actina e a ausência de marcação para PECAM-1.

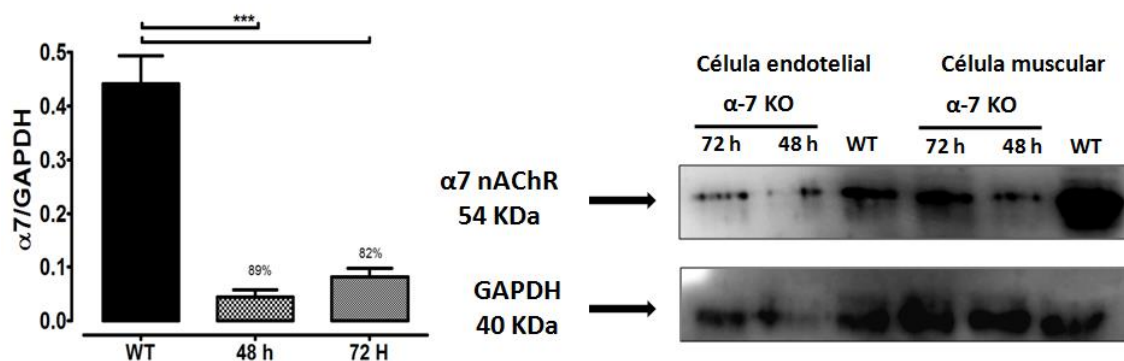
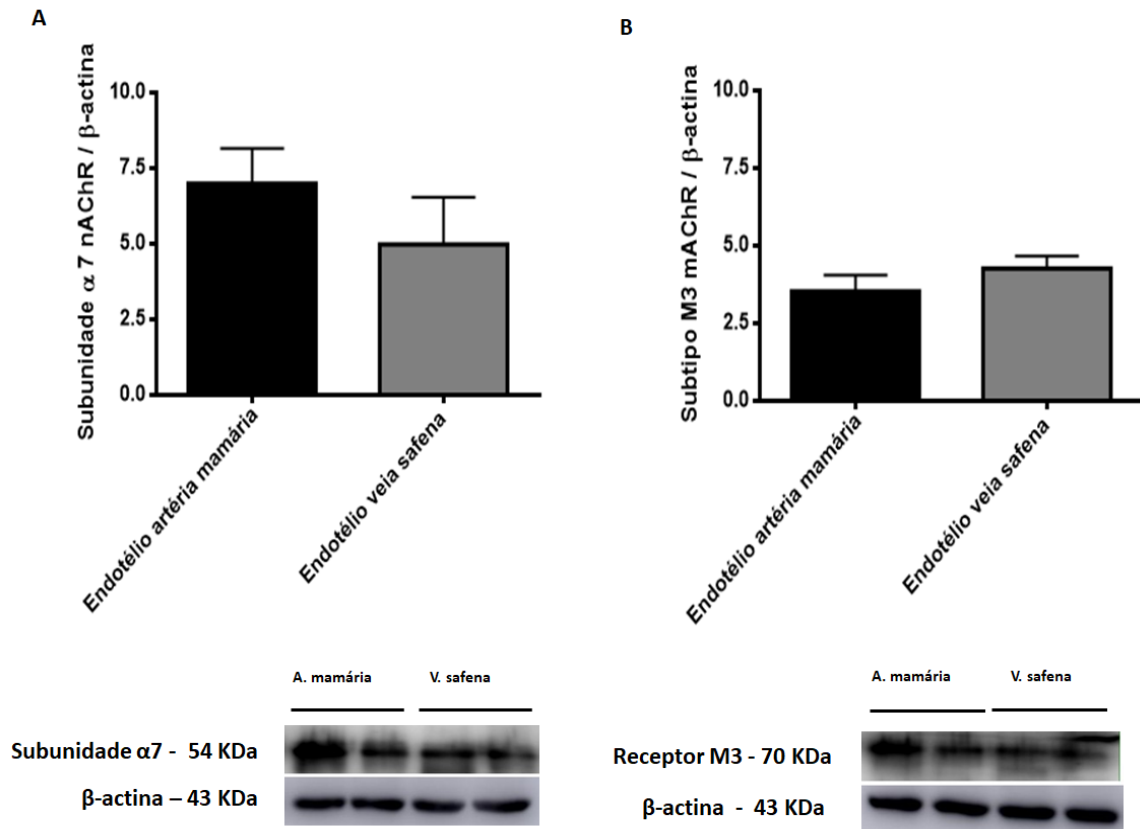


Figura 8: Silenciamento do nAChR $\alpha 7$ por antisense in vivo. A imagem mostra uma membrana representativa de Western blot usando anticorpo anti nAChR $\alpha 7$ (1: 1000; Biotechnology Santa Cruz; fonte:coelho) em animais WT (wide type) e KO após

silenciamento pela técnica de AS-ODN no tempo de 48 e 72h. Os resultados de expressão proteica foram normalizados pelo GAPDH de cada amostra. As imagens das bandas são representativas de 5 experimentos diferentes. Os dados estão expressos como média±EPM de 5 experimentos, comparados por one-way ANOVA seguidos pelos pós-teste de Tukey. ***p<0,001.



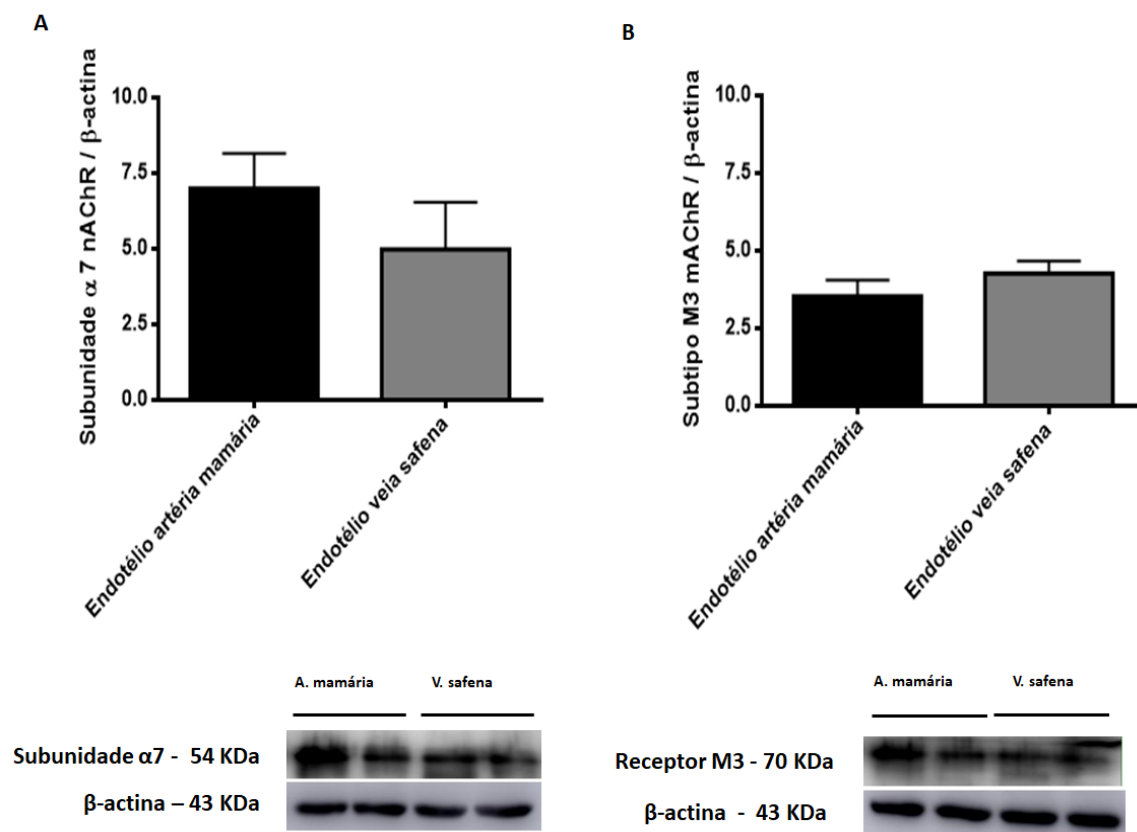


Figura 9: Expressão protéica de $\alpha 7$ nAChR e M3 mAChR no endotélio de artéria mamária e veia safena de humanos. Em A, expressão da subnidade $\alpha 7$ nAChR e em B do subtipo M3 mAChR no endotélio de artéria mamária e veia safena de humanos (n=5). Os valores de expressão protéica foram normalizados pela β -actina de cada amostra. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. Teste t de Student, onde ***p<0,001.

5.3 Participação dos receptores nicotínicos no relaxamento endotélio-dependente da artéria mamária e veia safena da humana.

Já é bem conhecido que a ACh induz vasodilatação dependente de endotélio em uma grande quantidade de vasos de modelos animais e humanos (19, 23, 36, 68, 163) e existe um consenso na literatura de que os mAChRs, principalmente, os do tipo M3 são os responsáveis pelo efeito vasodilatador da ACh (19, 115). No entanto, os nAChRs $\alpha 7$ também estão presentes, tanto na artéria mamária, quanto na veia safena. Por esta razão, nós decidimos testar a hipótese de que os receptores nicotínicos poderiam participar da resposta vasodilatadora induzida pela ACh. Conforme mostra a Figura 10, a

ACh induziu um relaxamento concentração-dependente tanto na artéria mamária quanto na veia safena. Este efeito foi dependente de endotélio funcional, uma vez que em vasos que tiveram o endotélio removido, não foi observado nenhum efeito vasodilatador (Figura 10). O pré-tratamento dos vasos contendo endotélio funcional com atropina (1 μ M), um agonista inverso dos mAChRs, aboliu o relaxamento na veia safena ($E_{m\acute{a}x}$ (%): $1,17 \pm 0,70$; $\log EC_{50}$: $-6,95 \pm 0,61$), bem como na artéria mamária ($E_{m\acute{a}x}$ (%): $2,10 \pm 0,76$; $\log EC_{50}$: $-7,84 \pm 0,29$) (Figura 11A e B). Estes dados nos levam a clássica interpretação da literatura de que os mAChRs são os responsáveis pelo efeito vasodilatador da ACh, uma vez que seu efeito foi abolido pela atropina. No entanto, já é conhecido que a ativação do nAChR $\alpha 7$ permite a transição do canal para um estado aberto promovendo a entrada de cálcio através da membrana plasmática (130, 155). Também, já é bem conhecido que a entrada de cálcio nas células endoteliais promove vasodilatação (19, 21, 23, 35, 36, 164). Considerando os estudos citados e partindo do pressuposto de que existe um sistema colinérgico não-neuronal em vasos humanos e que além dos mAChRs, os nAChRs $\alpha 7$ também estão expressos nesses vasos, avaliamos a possibilidade desses receptores serem funcionais e participarem da resposta vasodilatadora, assim como identificado em aorta de camundongo. No entanto, o DMPP, um agonista não seletivo dos nAChRs e o PNU-282987, agonista seletivo de nAChR $\alpha 7$ não foram capazes de induzir relaxamento na veia safena (Figura 12A e B) ou na artéria mamária (Figura 13A e B). Esses resultados sugerem que a estimulação direta dos nAChRS parece não desencadear uma resposta vasodilatadora tanto na presença de um agonista capaz de induzir a dessensibilização rápida dos receptores (DMPP), como de um agonista seletivo dos nAChR $\alpha 7$ (PNU-282987). Ainda, testamos o efeito da ACh na presença de antagonistas de receptores nicotínicos. De forma bastante interessante, a incubação dos anéis de veia safena com a D-Tubocurarina (100 μ M) ou a Mecamilamina (100 μ M) foi capaz de diminuir a resposta vasodilatadora induzida pela ACh em ~50 e 30 %, respectivamente (Figuras 14A e B). O mesmo perfil de inibição foi observado na artéria mamária. Após incubação com a D-Tubocurarina a resposta vasodilatadora foi diminuída em ~27,0 % e na presença de Mecamilamina em ~42,73% (Figuras 15A e B). Esses dados sugerem uma participação dos nAChRs na resposta vasodilatadora, já que a inibição desses canais representa uma diminuição significativa da resposta vasodilatadora à ACh.

Em conjunto os nossos resultados sugerem que os nAChRs participam da resposta vasodilatadora induzida pela ACh. No entanto, a prévia ativação dos mAChRs é

necessária para a ativação posterior dos nAChRs. Portanto, é possível que 1) haja uma interação física entre os dois receptores e a prévia ativação dos mAChRs ativa os nAChRs; 2) a ativação dos mAChRs ativa uma cascata de sinalização que leva a ativação dos nAChRs. No entanto, é preciso considerar também que no nosso sistema, não existe abertura direta dos nAChRs nem pelo agonista não seletivo de nAChR (DMPP), nem pelo agonista seletivo de nAChR $\alpha 7$ (PNU). Então, é possível emitir a hipótese de que talvez o sítio de ligação do nAChRs dos vasos em estudo não está conformacionalmente exposto para ligação com o agonista.

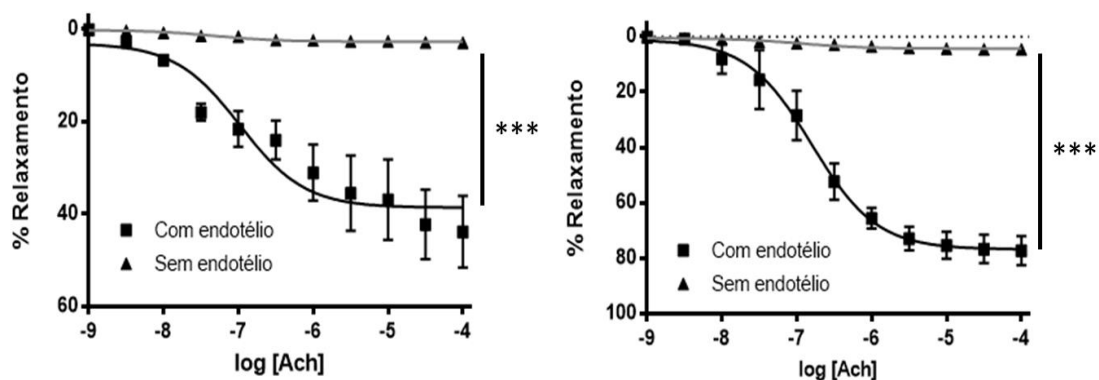


Figura 10: Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela ACh. Em **A**, veia safena (n=5) e **B** artéria mamária (n=5) com endotélio funcional e após remoção mecânica do endotélio, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-6} M$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. *** $p < 0,001$ (two-way ANOVA com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

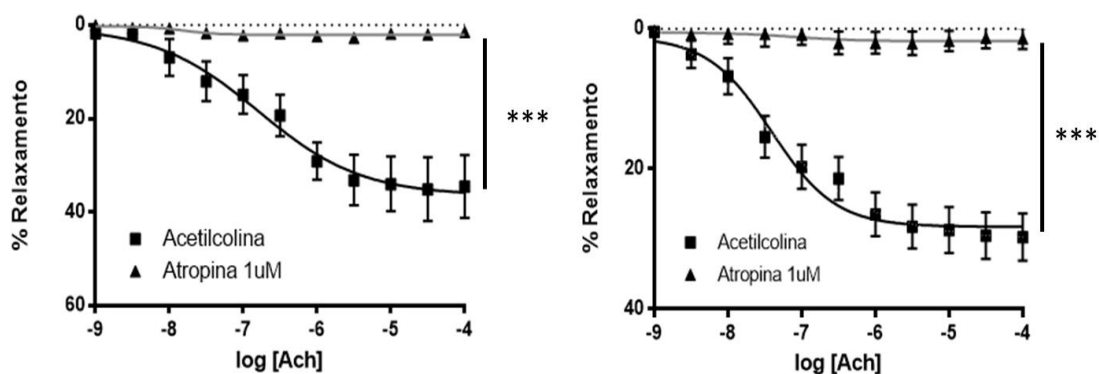


Figura 11: Efeito da atropina no relaxamento endotélio-dependente da veia safena humana e da artéria mamária humana. Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela ACh. Em **A**, veia safena (n=7) e **B** artéria mamária (n=5) com endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-6}M$), na presença ou na ausência de atropina (1 μ M). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. ***p<0,001 (*two-way* ANOVA com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

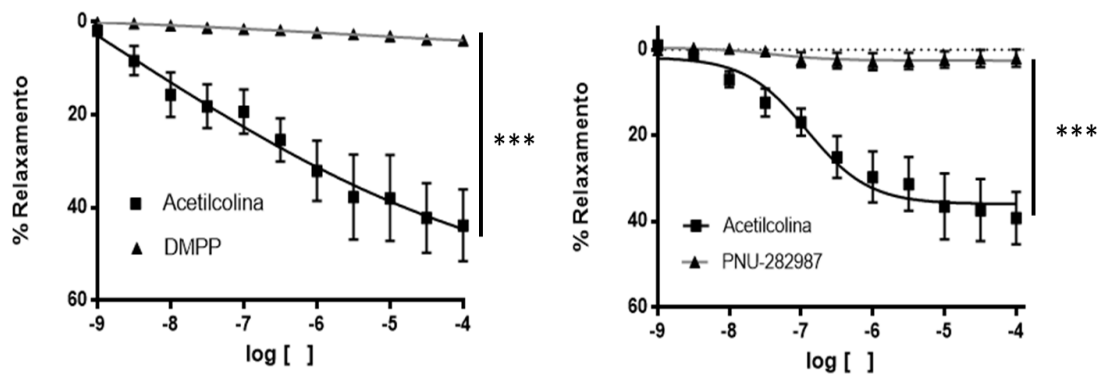


Figura 12: Relaxamento endotélio-dependente associado ao DMPP e ao PNU-282987 na veia safena humana. Curvas concentração resposta cumulativas para o DMPP (agonista não seletivo dos receptores nicotínicos) (**A**) e para o PNU-282987 (agonista seletivo dos receptores nAChR $\alpha 7$) (**B**) na veia safena com endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-6}M$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. ***p<0,001 (*two-way* ANOVA com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

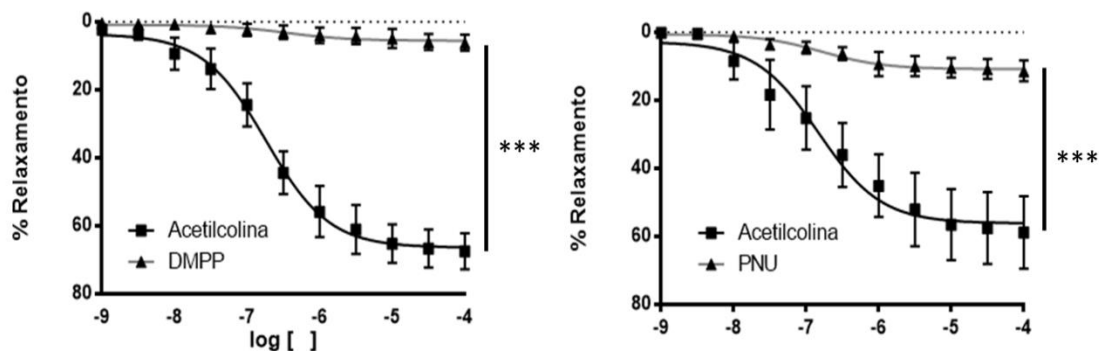


Figura 13: Relaxamento endotélio-dependente associado ao DMPP e ao PNU na artéria mamária humana. Curvas concentração resposta cumulativas para o DMPP (agonista não seletivo dos receptores nicotínicos) (A) e para o (B) PNU-282987 (agonista seletivo dos receptores nAChR $\alpha 7$) (B) na veia safena com endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-6} M$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. *** $p < 0,001$ (*two-way* ANOVA com comparação pós-teste de *BONFERRONI*). *** $P < 0,001$.

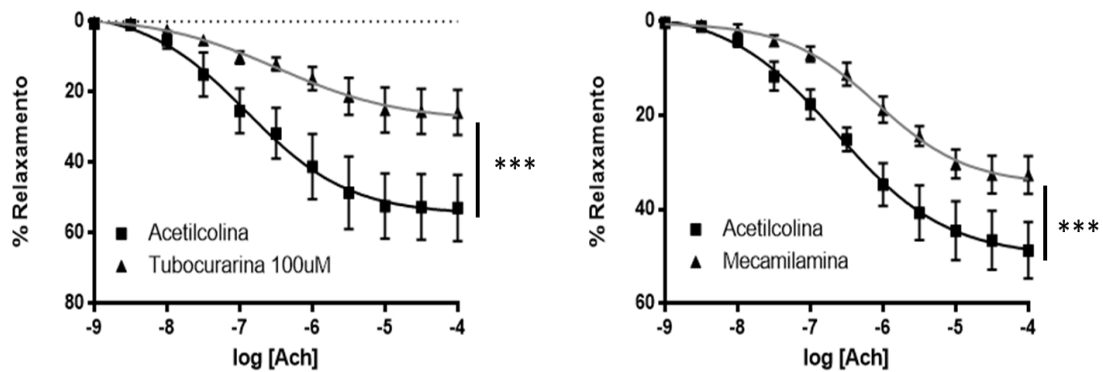


Figura 14: Efeito da D-Tubocurarina e Mecamilamina no relaxamento endotélio-dependente da veia safena humana. Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela ACh, na veia safena ($n=7$) contendo endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-6} M$), na presença ou na ausência de D-Tubocurarina (100 μM) (A) e Mecamilamina (100 μM) (B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. *** $p < 0,001$ (*two-way* ANOVA com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

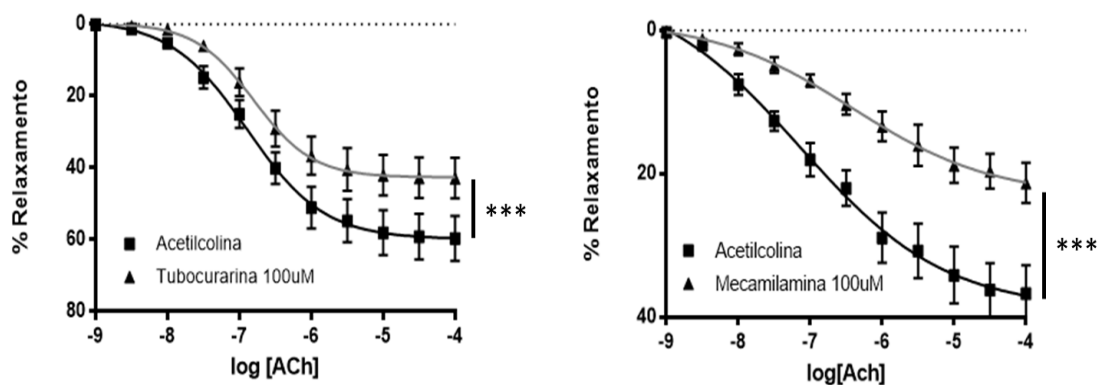


Figura 15: Efeito da D-tubocurarina e mecamilamina no relaxamento endotélio-dependente da artéria mamária humana. Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela ACh, na artéria mamária (n=7) contendo endotélio funcional, pré-contráidas com FEN ($3 \times 10^{-6} \text{M}$), na presença ou na ausência de D-Tubocurarina (100 μM) (**A**) e mecamilamina (100 μM) (**B**). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. *** $p < 0,001$ (*two-way ANOVA* com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

5.4 Co-imunoprecipitação e determinação da expressão protéica de mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$

Partindo dos resultados funcionais e da necessidade de se entender como a ativação dos mAChRs ativa, na sequência, a abertura dos nAChR, testamos a hipótese de que existe uma interação física entre os mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ nas células endoteliais da aorta de camundongo, da artéria mamária e da veia safena, de maneira que o nAChR $\alpha 7$ só estivesse ativo após a ligação do agonista no mAChR. Com esta finalidade utilizamos a técnica de co-imunoprecipitação. A técnica consistiu basicamente na imunoprecipitação do mAChR M3 com posterior marcação do nAChR $\alpha 7$ por western blot para avaliar uma possível interação física entre eles. É possível através dessa técnica, identificar se existe a formação de um imunocomplexo ou uma proximidade muito grande entre duas moléculas, de forma que seja possível precipitá-las juntas e na mesma amostra identificar as duas. Dessa forma, após a realização da técnica foi possível observar que já na condição basal, esses receptores parecem estar ligados fisicamente no endotélio vascular de aorta de camundongos, e que após estímulo com ACh ou muscarina, na presença e na ausência de atropina, a formação do complexo não é alterada (Figura 16A e B). O mesmo acontece na condição basal em humanos (Figura 17).

Esses dados sugerem a existência de uma comunicação direta entre os receptores mAChRs e nAChRs em condições basais e que após estímulo com agonistas não há alteração significativa na proporção de formação de complexos. Dessa forma, esses resultados indicam que fisiologicamente esses receptores parecem estar dimerizados na membrana plasmática das células endoteliais, uma interação pouco conhecida na literatura(53-55) de um receptor canal e um receptor metabotrópico.

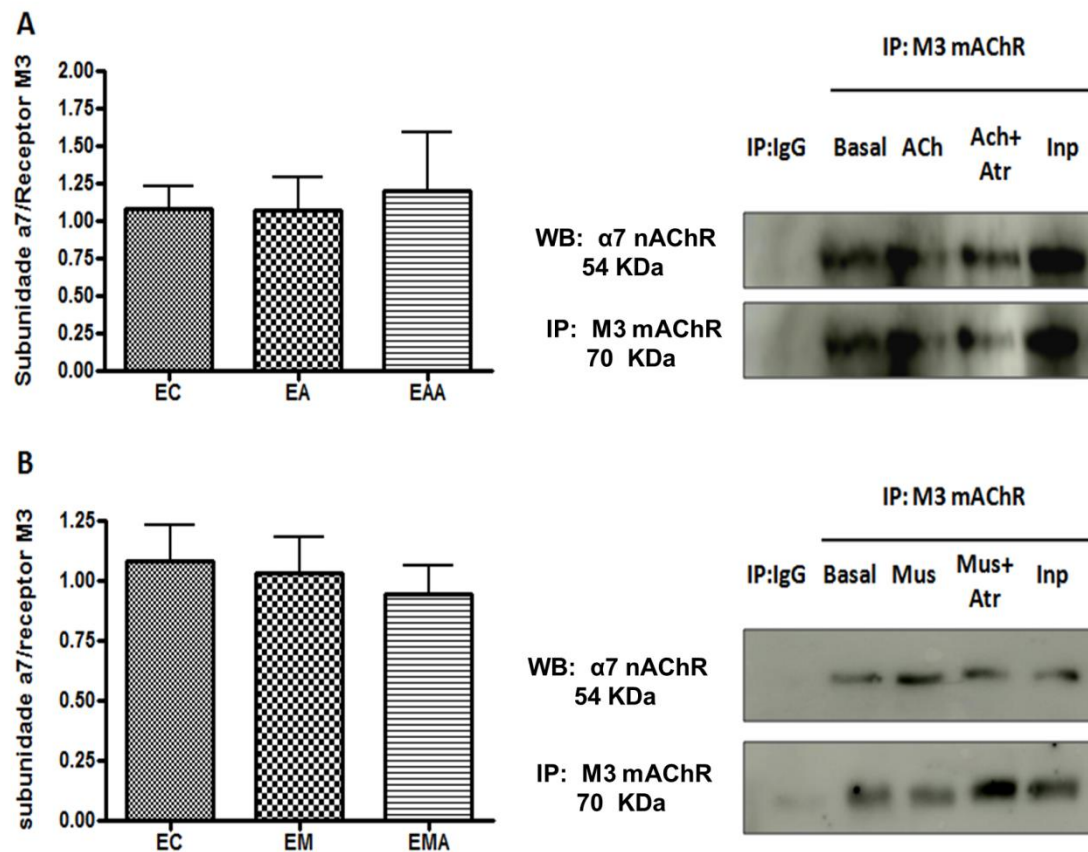


Figura 16: Co-imunoprecipitação dos receptores mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ nas células endoteliais de camundongos. Co-imunoprecipitados de mAChR M3 utilizando anticorpos anti-M3 e detecção por western blotting das bandas específicas de nAChR $\alpha 7$ em célula endotelial de aorta de camundongo e do mAChR M3 após stripping da membrana por 60s. **A:** na condição basal e após estímulos com ACh, ACh pré-tratado com atropina (ACh + Atr). **B:** na condição basal e após estímulo com muscarina (Mus) e muscarina pré-tratado com atropina (Mus + Atr). Extratos celulares foram também imunoprecipitados com soro de rato normal (60ug) (IP:IgG) para avaliar a especificidade dos nossos anticorpos. Inp: Extrato protéico de célula endotelial. WB: Western blot; IP: Imunoprecipitado. Os dados estão expressos como média \pm EPM de 5 experimentos, comparados por one-way ANOVA seguidos pelos pós-teste de Tukey.

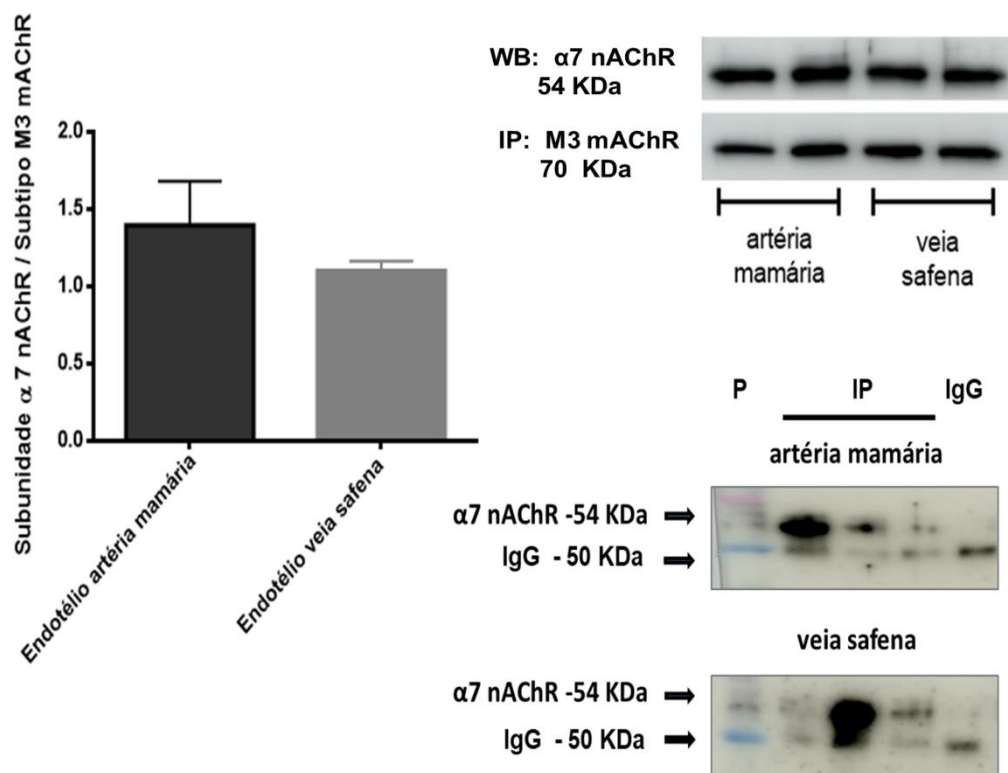


Figura 17: Co-imunoprecipitação dos receptores mACHR M3 e nACHR $\alpha 7$ nas células endoteliais de artéria mamária e veia safena de humanos. Co-imunoprecipitados de mACHR M3 utilizando anticorpos anti-M3 e detecção por western blotting das bandas específicas de nACHR $\alpha 7$ em célula endotelial de artéria mamária e veia safena. Tampão fosfato salino (PBS) foi também imunoprecipitado para avaliar a especificidade dos nossos anticorpos (IgG). P: padrão de peso molecular; IP: Imunoprecipitado; Os dados estão expressos como média±EPM de 5 experimentos, comparados por *t-student* seguidos pelos pós-teste de Tukey.. * P <0,05.

5.5 Avaliação da $[Ca^{2+}]_i$

A vasodilatação dependente de endotélio é mediada de forma importante pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Considerando os resultados funcionais e depois de mostrar que existe uma interação física entre o mACHR M3 e nACHR $\alpha 7$, nossa próxima etapa foi avaliar como seria o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela ativação dos mACHR M3 e nACHR $\alpha 7$. Para isso utilizamos as células EA.hy926, uma linhagem de células endoteliais humanas. Foram utilizados os agonistas ACh, muscarina, nicotina, PNU-282987 e em algumas das

preparações os vasos foram incubados com atropina e α -bungarotoxina e estimulados com muscarina. A α -bungarotoxina, importante antagonista seletivo dos nAChR $\alpha 7$, foi utilizada no intuito de avaliar se o nAChR $\alpha 7$ modularia alterações na $[Ca^{+2}]_i$. Tanto a ACh, quanto a muscarina foram capazes de induzir um aumento da $[Ca^{+2}]_i$. Por outro lado, após incubação com a atropina, a resposta foi consideravelmente diminuída. De forma interessante, a α -bungarotoxina foi capaz de reduzir a $[Ca^{+2}]_i$ induzida pela muscarina em cerca de 40%, sugerindo que os nAChR $\alpha 7$ participam do mecanismo capaz de aumentar a concentração de $[Ca^{+2}]_i$ nas células endoteliais, uma vez que seu bloqueio causa uma diminuição no aumento da $[Ca^{+2}]_i$. A nicotina e o PNU-282987 foram capazes de induzir um pequeno aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em algumas células, cerca de 4,7 e 2,6%, respectivamente. No entanto, considerando a média de todas as células, esse aumento é insignificante. (Figura 18). Esses resultados corroboram com os dados de reatividade vascular, uma vez que a ativação direta do nAChR $\alpha 7$ não aumenta de forma importante a $[Ca^{+2}]_i$ e é necessária uma ativação prévia dos mAChR M3 para que a $[Ca^{+2}]_i$ aumente. De forma interessante, o bloqueio farmacológico com a α -bungarotoxina foi capaz de reduzir o aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em cerca de 40%, e o perfil do aumento do $[Ca^{+2}]_i$ não foi modificado em relação às preparações com estimulação feita somente com muscarina.

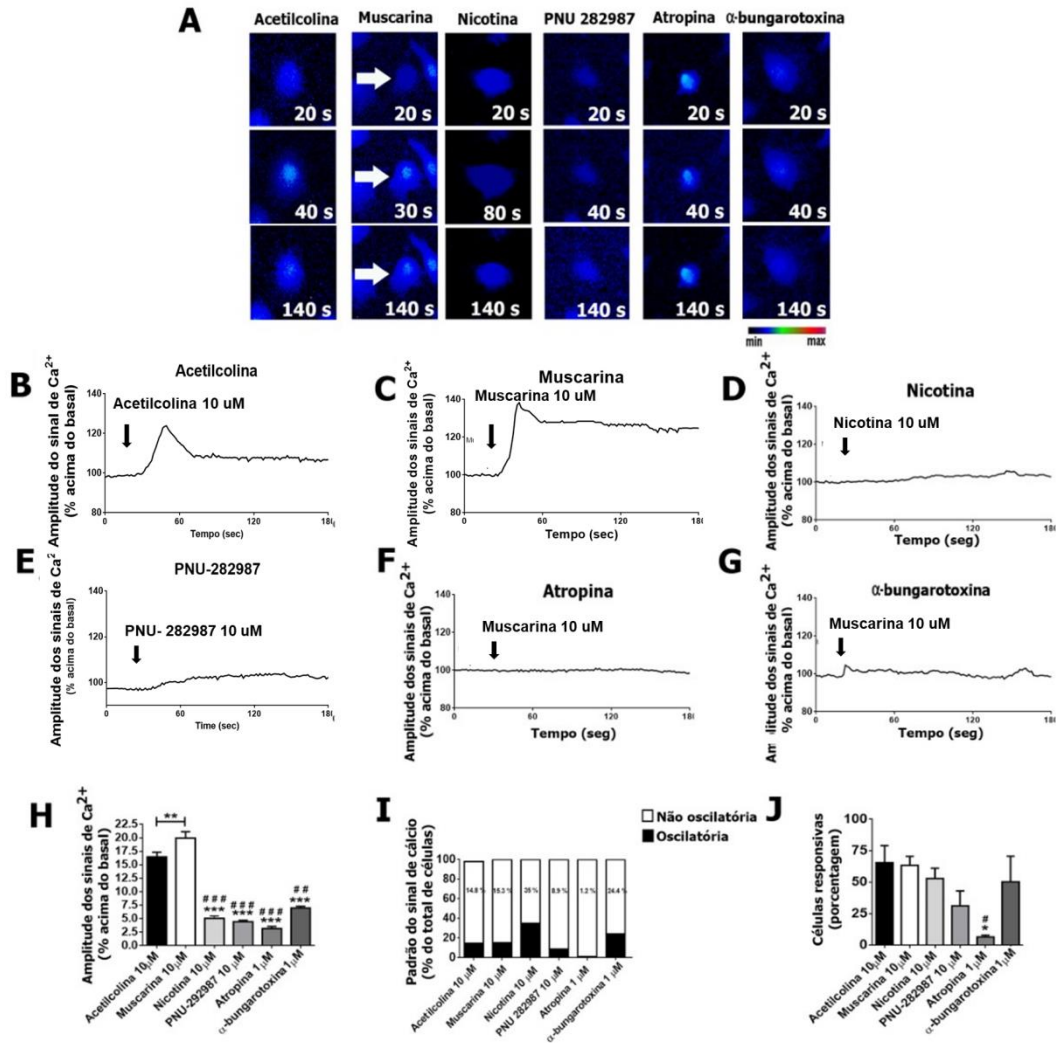


Figura 18: Avaliação da participação dos mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ no aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Representativo de imagens da variação de cálcio intracelular (A). Alterações representativas da variação de fluorescência ao longo do tempo nas células EA.hy926, carregadas com a sonda fluorescente de cálcio Fluo-4 / AM (6 μ M) após estímulo com Ach (10uM) (B), muscarina (10uM) (C), nicotina (10uM) (D) e PNU 282987 (10uM) (E) e preparações incubadas com atropina (1 uM) (F) e α -bungarotoxina (1 uM) (G) e estimuladas com muscarina (10uM) após 10 minutos de incubação. A amplitude do pico de cálcio é afetada pelo tratamento com os bloqueadores farmacológicos (H); Percentagem de células com perfil oscilatório (I). Quantidade média de células responsivas por preparação frente à estimulação com as diferentes drogas (J). Os dados estão expressos como média \pm EPM experimentos, comparados por one-way ANOVA, onde * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001.

5.6. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora.

Considerando que os receptores nAChR $\alpha 7$ são abertos com probabilidade baixa e rapidamente dessensibilizados em milissegundos (99), é intrigante que eles possam participar de forma tão importante de uma resposta vasodilatadora e um aumento de cálcio a longo prazo. Dessa forma, é possível que a abertura dos nAChR $\alpha 7$ possa ativar uma cascata de sinais intracelulares que seja responsável por uma resposta mais duradoura. Interações funcionais entre pequenas proteínas G monoméricas e vários nAChRs foram descritas. Experimentos em queratinócitos indicam que os nAChR $\alpha 7$ via sinalização por Rho GTPases permite maior plasticidade durante a cicatrização de feridas (117). Outro trabalho do mesmo autor mostra que a ativação de nAChRs $\alpha 9$ em células epiteliais parece ativar Rac e Rho GTPases levando à regulação de aderências focais e mudança na morfologia dessas células (165). Por outro lado, a atividade GTPase de Rho/Rac pode regular o direcionamento e a expressão de nAChRs na superfície celular (116). Foi demonstrado que o acoplamento do nAChR $\alpha 7$ a proteínas G heterotriméricas é capaz de modular a motilidade do citoesqueleto e o crescimento estrutural durante o desenvolvimento de neurites por meio da ativação de Rho-A como segundo mensageiro (53, 54).

Nesse sentido, partindo do pressuposto que o nAChR $\alpha 7$ é capaz de interagir com uma variedade de proteínas intracelulares e ativar variadas vias de sinalização, surgiu a hipótese de que em nosso sistema o acoplamento entre o nAChR $\alpha 7$ e o mAChR M3 poderia modular a resposta de Rho-A. A grande questão é como a RhoA estaria regulando o relaxamento vascular. É descrito na literatura que RhoA modula a associação do receptor de inositoltrisfosfato (IP₃R) com o receptor canal transiente potencial (TRPC1) e, portanto, ativa o armazenamento e entrada de Ca²⁺ induzido pela depleção em células endoteliais (73). Sabe-se também que os TRPs têm uma participação importante na regulação do tônus vascular (74, 76, 166-168). Estudos recentes têm demonstrado a importância do subtipo TRPV4 na regulação do tônus vascular (168-171). Canais TRPV4 são expressos em células endoteliais e do músculo liso vascular e podem ser ativadas por numerosos estímulos, incluindo estresse de cisalhamento, calor e ativação por meio de moléculas sinalizadoras, como DAG, PKC e proteína G (74, 168-170). Alguns trabalhos mostram que os TRPV4 parecem desempenhar um papel importante na regulação do tônus vascular e na resposta vasodilatadora, bem como são capazes de interagir com

outros canais de membrana, como o TRPV1 (74, 76, 167-169, 171). Pensando nesse contexto fomos avaliar se a resposta vasodilatadora poderia envolver um mecanismo de sinalização que envolve não só os receptores mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ como também a pequena proteína G Rho-A e os canais transientes de membrana (TRPs). Para tal, nós avaliamos estas duas vias na vasodilatação e no aumento da $[Ca^{+2}]_i$ induzida por ativação de receptores muscarínicos.

5.6.1 Papel da Rho-A e ROCK na resposta vasodilatadora induzida pela ativação dos mAChRs

Pensando que Rho-A poderia estar envolvida no mecanismo da resposta vasodilatadora, avaliamos como seria o perfil da resposta vasodilatadora induzida pela ativação do mAChR em aortas de camundongo após inibição de Rho-A pelo Rhosin (um inibidor do domínio de ligação Rho GEF de Rho-A), e pelo inibidor de ROCK (Y-27632). Foram utilizadas aortas de camundongo para a realização desse experimento em virtude da baixa disponibilidade de vasos humanos. Como se tratava de experimentos que demandariam uma quantidade muito grande de amostras, não foi possível ser realizado com vasos de humanos. A inibição do domínio de ligação Rho GEF de Rho-A foi capaz de provocar uma diminuição significativa na resposta vasodilatadora induzida pela muscarina em anéis de aorta de camundongo (Figura 19A). Por outro lado, o bloqueio de ROCK pelo Y-27632 não reduziu a resposta vasodilatadora (Figura 19B).

Esses dados sugerem que Rho-A parece exercer um papel na regulação do relaxamento vascular induzido pela ativação dos mAChR M3. No entanto, a ROCK parece não participar do mecanismo, uma vez que o bloqueio dessa proteína não causou perda significativa da resposta vasodilatadora.

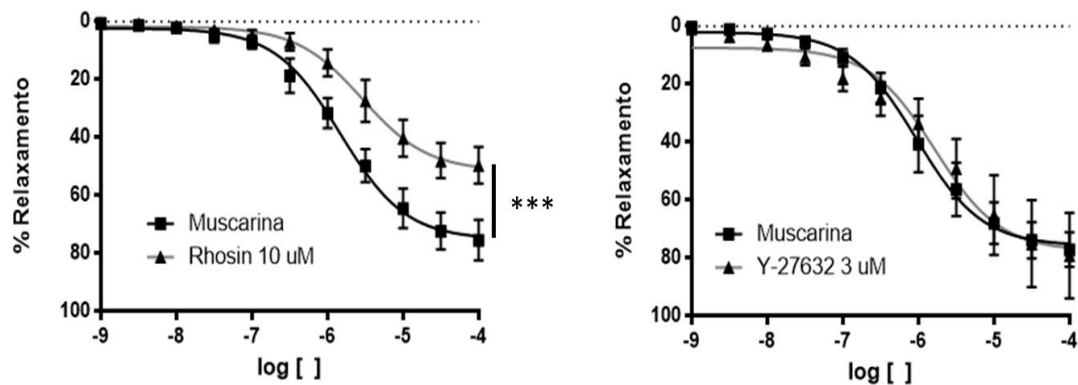


Figura 19. Efeito do Rhosin e do Y-27632 no relaxamento endotélio-dependente na aorta de camundongo. Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela Muscarina em aorta de camundongo com endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-7} M$), na presença ou na ausência de Rhosin (10 μM) (A) e Y-27632 (3 μM) (B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 camundongos. *** $p < 0,001$ (*two-way* ANOVA com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

5.8 Papel dos TRPs na resposta vasodilatadora induzida pela ativação dos mAChRs frente aos inibidores de TRPs

Como descrito anteriormente e considerando que os TRPs também estariam envolvidos no mecanismo de relaxamento iniciado no mAChR, avaliamos se a inibição de TRPs também causaria prejuízo na resposta vasodilatadora. Para isso, foram construídas curvas concentração resposta para a acetilcolina na presença e na ausência de: SKF-96365 (5 μM) bloqueador não seletivo de TRPs; Ruthenium Red (RuR) 30 μM , bloqueador de TRPVs; Lanthanum (20 μM), bloqueador de TRPCs; Gadolinium (20 μM), bloqueador de TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3 e TRPA1 e 2-APB (20 μM), bloqueador de TRPC3, TRPV6 e TRPV7.

O RuR diminuiu significativamente a resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (Figura 20A). O mesmo perfil de inibição foi observado com o 2-APB e o SKF-96365, que foram capazes de reduzir a resposta vasodilatadora em 27,29% e 22,64%, respectivamente.

Na presença do Gadolinium e do Lanthanum também foi observado uma redução significativa da resposta vasodilatadora, de 17,2% para o Gadolinium e de 16,84% para

o Lanthanum. Para avaliar se Rho-A e os canais TRPs participam da mesma via de sinalização, fizemos um experimento utilizando uma associação entre o Rhosin e o RuR, e como observado, não são efeitos adicionais, a associação não representa inibição adicional, sugerindo que esses componentes podem participar da mesma via de resposta. Esses resultados, em conjunto, sugerem que os canais TRPs estão envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela ativação dos receptores mAChRs. Tendo em vista a inibição observada na presença de ambos os inibidores, os achados apontam para uma participação conjunta de TRPCs e TRPVs.

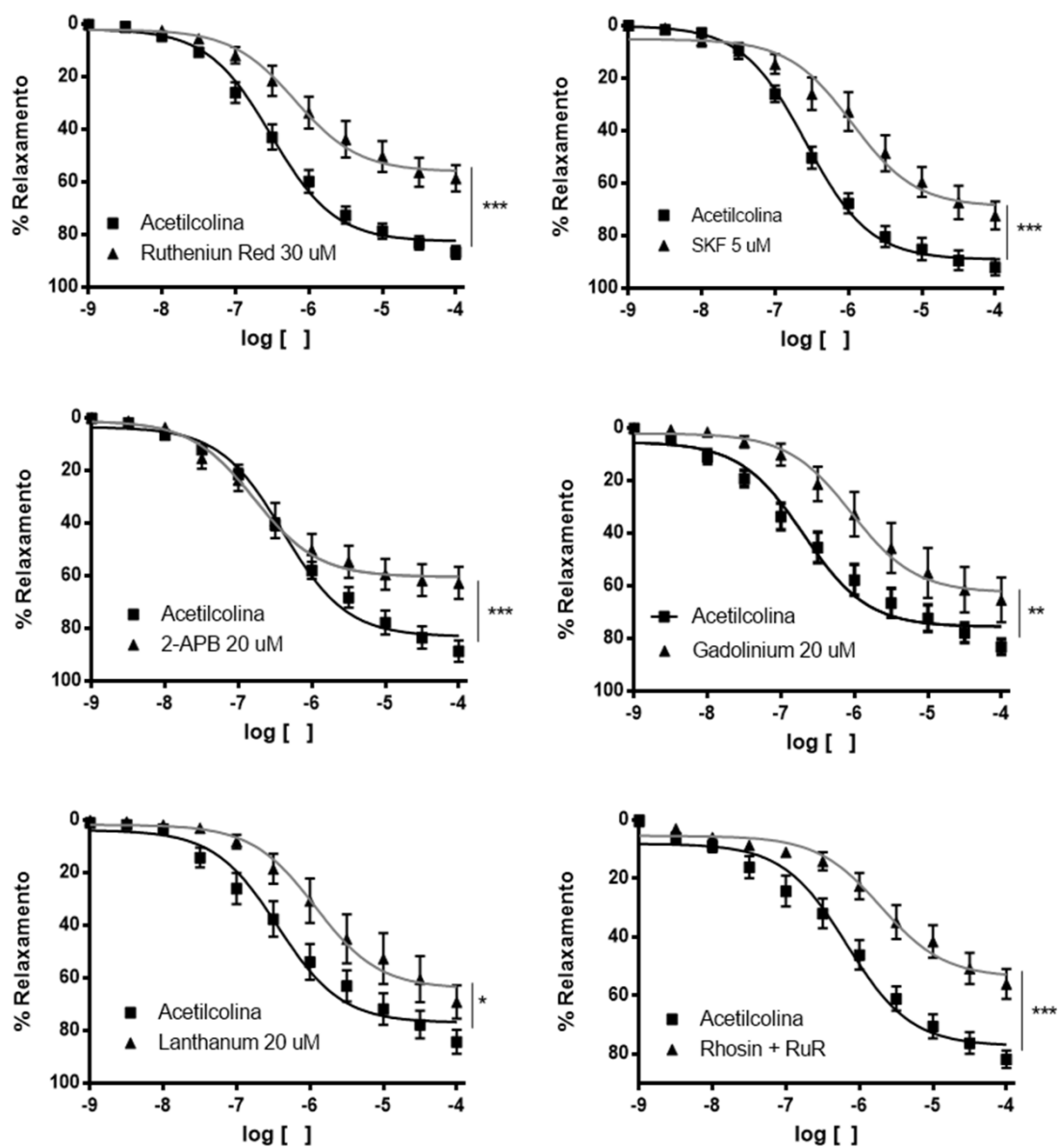


Figura 20. Efeito dos inibidores de TRPs, Ruthenium Red, SKF-96365, 2-APB, Gadolinium, Lanthanum e da associação Rhosin + Ruthenium Red no relaxamento endotélio-dependente na aorta de camundongos. Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela ACh em aorta de camundongo com endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), na presença ou na ausência de Ruthenium Red (30uM) (A), SKF-96365 (5uM) (B), 2-APB (20uM) (C), Gadolinium (20uM) (D), Lanthanum (20uM) (E) e Rhosin + RuR (F). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. *** $p < 0,001$; *** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (*two-way* ANOVA com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

Partindo dos resultados descritos, e levando em consideração que os dados indicam a participação de TRPVs, o próximo passo foi avaliar se o TRPV4, já descrito na literatura no controle do tônus vascular, seria o canal envolvido na resposta. Dessa forma, a ativação dos canais TRPV4 pelo agonista GSK 1016790 A, foi capaz de induzir uma pequena resposta vasodilatadora, cerca de 21,3 % de relaxamento. No entanto, e curiosamente, o bloqueio farmacológico seletivo desses receptores com HC 067047 e GSK 2193874 foi capaz de reduzir a resposta vasodilatadora à ACh em 37,8 % e 19,4 %. Por outro lado, a associação entre a α -bungarotoxina e o GSK 2193874 não representou inibição adicional (Figura 21), sugerindo que TRPV4 e receptores nicotínicos poderiam estar participando da mesma via de sinalização.

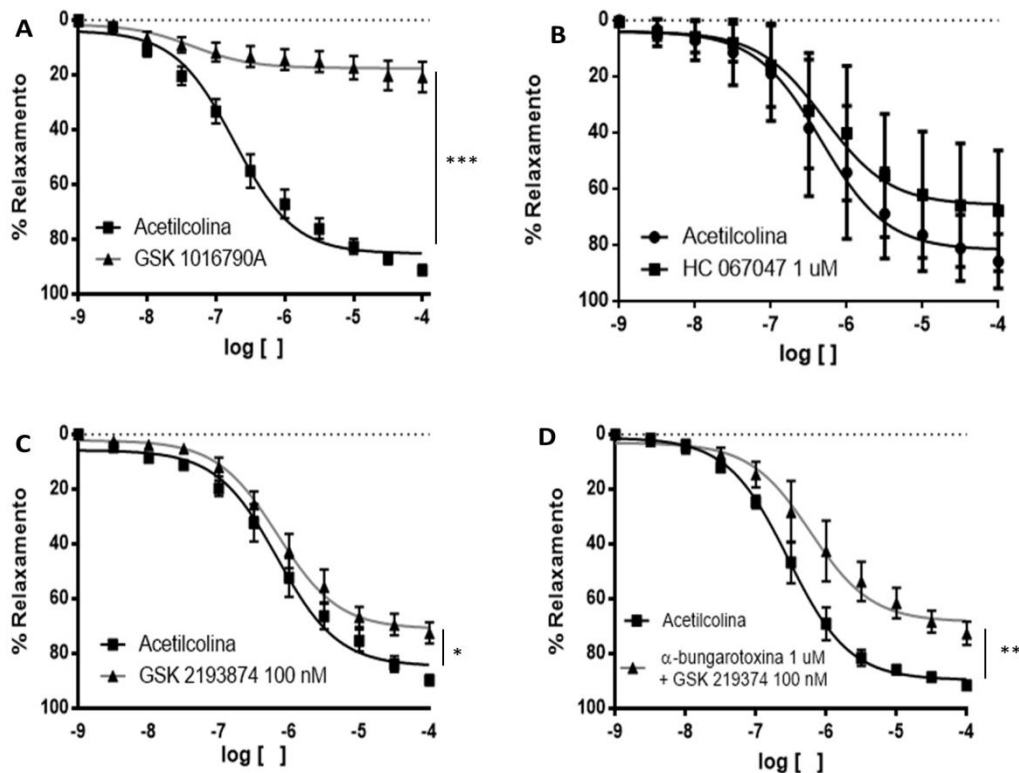


Figura 21. Efeito do agonista seletivos de TRPV GSK 1016790A, dos bloqueadores de TRV4 GSK 2193874 e HC067047 e da associação de GSK 2193874 + α -bungarotoxina no relaxamento endotélio-dependente na aorta de camundongos. Curvas concentração resposta cumulativas induzidas pela ACh em aorta de camundongo com endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ($3 \times 10^{-7} M$), na presença ou na ausência de GSK 1016790A (A), HC067047 (B), GSK 2193874 (C) e GSK 2193874 + α -bungarotoxina (D). Os resultados estão expressos como média \pm EPM de experimentos pareados com segmentos vasculares de 5 indivíduos. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (*two-way ANOVA* com comparação pós-teste de *BONFERRONI*).

5.6.2 Avaliação do papel de Rho-A e dos TRPs no aumento das $[Ca^{2+}]_i$ a induzida pela ativação dos mAChRs

Para avaliar o mecanismo envolvido no aumento das $[Ca^{2+}]_i$ pela ativação dos mAChRs, foram realizadas preparações de células EA.hy926 na presença do agonista seletivo de TRPV4 (GSK 1016790 A), e após estímulo com muscarina na presença dos antagonistas seletivos do TRPV4 HC 067047 e GSK 2193874 e do Rhosin, no intuito de avaliar se Rho-A e TRPV4 também seriam capazes de estimular o aumento das $[Ca^{2+}]_i$

induzida pela ACh. A ativação direta dos TRPV4 representou um pequeno aumento nas $[Ca^{+2}]_i$. Curiosamente, após a inibição de Rho-A e TRPV4 a $[Ca^{+2}]_i$ também esteve reduzida (Figura 22). Esses dados corroboram com os achados de reatividade vascular e dá suporte a ideia de que a resposta vasodilatadora parece envolver um mecanismo complexo de sinalização que envolve não só os receptores mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ como também a pequena proteína G RhoA e os canais transientes de membrana (TRPs);

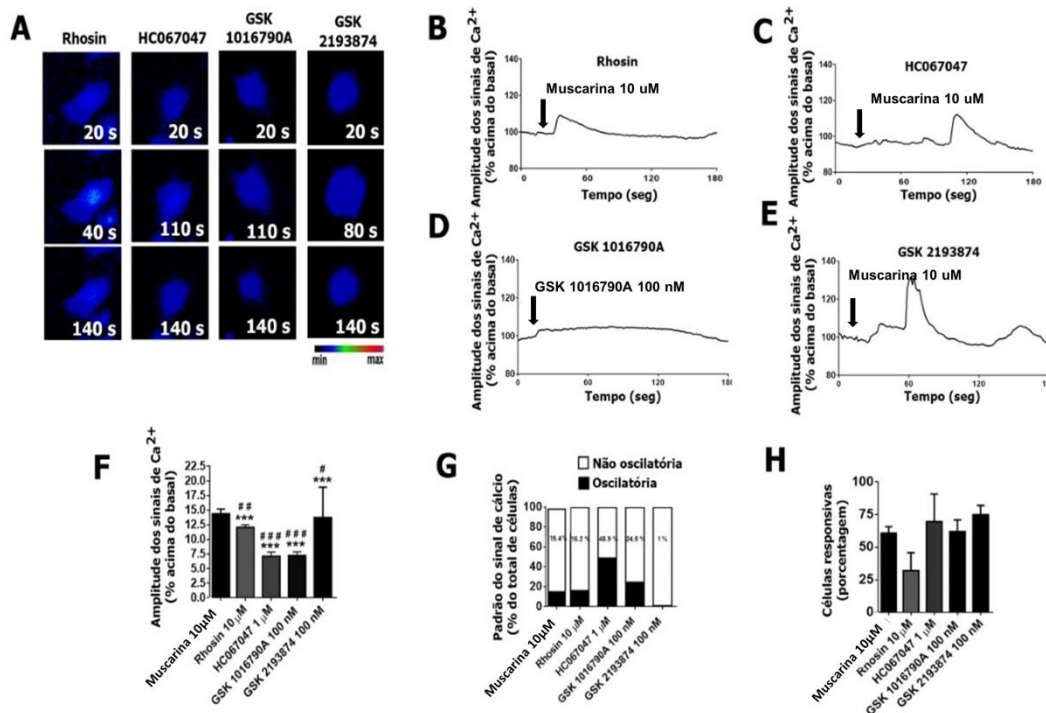


Figura 22: Efeito dos bloqueadores de Rho-A e TRPs na sinalização de cálcio intracelular. Representativo de imagens da variação de cálcio intracelular (A). Alterações representativas da variação de fluorescência ao longo do tempo nas células EA.hy926, carregadas com a sonda fluorescente de cálcio Fluo-4 / AM (6 μ M) em preparações incubadas com Rhosin (10 uM) (B), HC 067047 (1 uM) (C) e GSK 2193874 (100 nM) (E), estimuladas com muscarina (10uM) após 10 minutos de incubação. Foram avaliadas também a variação de fluorescência após estímulo com GSK 1016790A (B). A amplitude do pico de cálcio é afetada pelo tratamento com os bloqueadores farmacológicos (F); Porcentagem de células com perfil oscilatório (G). Quantidade média de células responsivas por preparação frente à estimulação com as diferentes drogas (H). Os dados estão expressos como média \pm EPM experimentos, comparados por one-way ANOVA. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou pela primeira vez a existência de um SCNN em vasos humanos. Os nAChRs $\alpha 7$, como parte deste sistema, estão presentes nas células endoteliais da artéria mamária e veia safena e participa da resposta vasodilatadora dependente da estimulação de mAChRs M3 endoteliais. Esses dados abrem a perspectiva de um papel desempenhado pelo SCNN na regulação do tônus vascular. Nossos resultados também mostraram pela primeira vez uma interação física entre os nAChRs $\alpha 7$ e mAChRs M3 no endotélio vascular. Além disso, sugerimos que, no SCNN esses receptores parecem não assumir o papel clássico de canais iônicos ativados por ligantes, em vez disso, nossos dados sugerem que esses receptores poderiam ativar uma via de sinalização que envolve Rho-A e TRPs.

Nas últimas décadas, a existência de um SCNN tem sido consolidada (6, 24, 32, 33, 42, 85-87, 92, 132, 139). Foi demonstrado que a ACh é sintetizada, em praticamente, todas as células vivas, bem como é atribuído a ela um papel intermediário nas interações de células não neuronais com o ambiente externo, hormônios, fatores de crescimento e citocinas. Por outro lado, todos esses fatores também podem afetar a expressão e a função do SCNN. Componentes do sistema colinérgico foram descritos em células epiteliais das vias aéreas, intestino, pele, urotélio, placenta, córnea, células da granulosa, células endoteliais umbilical humana (HUVEC) e imunológicas. No urotélio (camundongos e humanos), foi demonstrada imunorreatividade positiva ao ChAT usando um anticorpo policlonal, que pode ser pré-absorvido com sucesso com carnitina acetiltransferase (CarAT), outra enzima geradora de ACh (85). O mRNA de ChAT e a proteína ChAT foram demonstrados em células epiteliais e imunes humanas isoladas (32, 40, 82, 92, 134). Outros trabalhos relatam que em células epiteliais das vias aéreas humanas isoladas e queratinócitos humanos cultivados existe atividade da enzima ChAT e que essas células contêm ACh (7, 41). A placenta humana (livre de neurônios colinérgicos), sintetiza, armazena e libera ACh (40). As células sanguíneas humanas (células mononucleares, linfócitos) e linhagens celulares leucêmicas mostram atividade da enzima ChAT e/ou contêm ACh, mesmo em cultura (2, 3, 32, 33, 92, 94). Da mesma forma, a AChE foi detectada como proteína nuclear muito recentemente em células neuronais e não neuronais (172). Nas células HUVEC, já foi demonstrada a expressão de ChAT (PMID: 12628465. Referência). Também deve ser considerado que ambos os precursores da síntese de ACh (colina e acetil-CoA) estão presentes em quase todas as células. O acetil-

CoA é o principal produto do catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios em organismos aeróbicos e, portanto, está presente em praticamente todas as células do organismo. A colina é originária da quebra intracelular de fosfolipídios contendo colina ou da captação de colina extracelular por meio de transportador de colina de baixa ou alta afinidade (CHT1). Este último foi demonstrado nas células musculares epiteliais, uroteliais e endoteliais de ratos e humanos (7, 85, 86, 132, 173). Todos esses trabalhos corroboram os nossos achados de expressão gênica dos componentes de síntese, degradação e transporte da acetilcolina. A síntese de ACh além do sistema nervoso mudou o paradigma de ACh agindo apenas como um neurotransmissor. Os dados do presente estudo mostram que vários componentes do SCNN estão presentes em artéria mamária e veia safena de humanos, reforçando a importância do SCNN já descrito em alguns sistemas biológicos.

O papel fisiológico da ACh nos vasos sanguíneos não inervados foi negligenciado por muito tempo. No entanto, a descoberta do SCNN em vasos nos leva a acreditar em um papel funcional para a ACh nesses tecidos. Existe um conceito bem aceito na literatura de que o relaxamento vascular induzido pela ACh é mediado pela ativação do mAChRs dos subtipos M1, M3 e M5 (5, 6, 35). Curiosamente, a presença de nAChRs em vasos não inervados, como aorta de rato (58) foi descrita. Se eles estão presentes, também poderiam ser funcionais e assumir um papel na vasodilatação nunca antes descrito na literatura. Pesquisas recentes têm detectado a presença de vários subtipos de mAChRs e nAChRs em células não neuronais de mamíferos, indicando um papel regulador autócrino ou parácrino da ACh nesses tecidos (3, 24, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 56). Entretanto, ainda é desconhecida sua função real. Estudos com células endoteliais humanas demonstraram a expressão de nAChRs funcionais e a participação de nAChR $\alpha 7$ na transmissão de sinais de processos biológicos, tais como: proliferação, sobrevivência, migração e formação de tubo em células endoteliais (3, 56, 58, 94). O envolvimento dos nAChRs $\alpha 7$ nesses processos também reflete sua importância em situações fisiológicas, como reparo de feridas e revascularização isquêmica, e patológicas, como na formação de placa aterosclerótica e crescimento tumoral (8). Neste contexto, nosso estudo também foi capaz de demonstrar a expressão de nAChRs $\alpha 7$ em vasos não inervados de humanos. Esse dado é muito importante porque levantou a hipótese de uma possível participação desses receptores na resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida pela ACh. Uma vez expressos, eles poderiam também ser funcionais. De acordo com um estudo publicado por Zou e colaboradores, existem nAChRs funcionais que participam do relaxamento

dependente do endotélio em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (58). No entanto, dados do nosso grupo, ainda não publicados, mostraram que em camundongos normotensos, esses receptores também desempenham um papel importante na vasodilatação, mesmo que a estimulação direta dos mAChRs seja suficiente para o efeito vasodilatador comumente observado (6, 24, 35, 91).

Dessa forma, os dados dos ensaios de reatividade vascular do presente trabalho também mostraram uma participação dos nAChRs na resposta vasodilatadora, uma vez que houve uma diminuição significativa no relaxamento vascular induzido pela ACh na presença de mecamilamina e D-tubocurarina, dois antagonistas de nAChRs. No entanto, é evidente que essa resposta é dependente da ativação prévia dos mAChRs, já que a ativação direta dos nAChRs com o DMPP e o PNU-282987, não foi capaz de promover uma resposta vasodilatadora. Somado a isso, a atropina foi capaz de abolir totalmente a resposta vasodilatadora. Esses achados nos mostram que, embora a resposta vasodilatadora induzida pela estimulação dos mAChRs seja responsável pelo efeito vasodilatador, na ausência dos nAChRs o efeito máximo está diminuído.

O mecanismo pelo qual os nAChRs participam da resposta ainda é desconhecido, mas é possível que exista uma interação física entre os dois receptores. Estudos demonstrando dimerização entre receptores têm sido cada vez mais frequentes. Interações entre GPCRs, incluindo interação entre AT1R e receptor de Ang-II tipo 2 (AT2R) (174), receptor de Ang-II tipo 1(AT1R) e B2R, entre Mas e AT2R (175) e entre Mas e AT1R (176), já são bem conhecidas. Já foi demonstrada também uma interação entre os receptores de dopamina D2 e D3 (177). Usando experimentos de transcomplementação, Maggio e colaboradores forneceram evidências farmacológicas para a formação de heterodímeros entre mAChRs M2 e M3. Mediante co-expressão de mAChRs M2 ou M3 do tipo selvagem a presença um receptor heterodimérico M2/M3foi demonstrada (178). Recentemente, Novi e colaboradores relataram que os receptores M2 e M3 podem interagir fisicamente mostrando que o mAChR M3 pode ser imunoprecipitado junto com o mAChR M2 quando ambos os receptores foram co-expressos em Células COS-7 (179). Significativamente, a heterodimerização de GPCR vem sendo cada vez mais reconhecida como importante para a regulação da função de GPCRs, no que diz respeito ao tráfego de moléculas intracelulares, ajuste fino e modificação de sinais (180-182). Além de dimerização de GPCRs, alguns autores têm sugerido uma heterodimerização da enzima conversora de angiotensina (ECA) com o receptor Mas e o receptor de angiotensina 2 (AT2R) (183). Já foi demonstrada a formação

de um complexo entre a isoforma somática da ECA com o receptor de bradicinina B2 (B2R), o que sugere que a interação também pode ser possível com outros tipos de GPCRs (184). Contrapondo aos estudos mencionados e levando em consideração que até o momento foi demonstrado interação entre GPCRs, e GPCRs e alguns tipos de enzimas, nossos estudos mostraram pela primeira vez uma interação entre um receptor metabotrópico e um receptor ionotrópico. Pela técnica de co-imunoprecipitação conseguimos mostrar uma possível interação física entre o mAChR M3 e o nAChR $\alpha 7$, e que o dímero contribui para a resposta vasodilatadora.

O nAChR $\alpha 7$ está envolvido na transmissão de sinais de processos biológicos, tais como: proliferação, sobrevivência, migração e formação de tubo em células endoteliais, como descrito anteriormente (3, 56, 58, 94). Dentre os nAChRs ele é o mais permeável ao cálcio (101, 185). Mostramos a presença dele pela técnica de Western blot em artéria mamária e veia safena de humanos. Se ele está presente e deixa passar cálcio, ele poderia estar participando da resposta vasodilatadora. É conhecido que o cálcio é importante no relaxamento vascular dependente de endotélio mediado pela ACh. Pelas razões expostas nós avaliamos se o nAChR $\alpha 7$ contribuiria com o aumento da $[Ca^{+2}]_i$. Escolhemos trabalhar com a muscarina, no intuito de garantir que a resposta se iniciava nos mAChRs. De forma interessante, o bloqueio farmacológico com a α -bungarotoxina foi capaz de reduzir o aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em cerca de 40%. No entanto, a estimulação dos receptores com PNU-282987, não foi capaz de promover alterações significativas na $[Ca^{+2}]_i$. Esses dados sugerem que o nAChR $\alpha 7$ estaria contribuindo com o aumento da $[Ca^{+2}]_i$ e, associados aos resultados de reatividade vascular, mostram evidências de sua participação na resposta vasodilatadora. Estes dados também corroboram os dados de reatividade vascular de que a ativação da via nicotínica é feita via ativação prévia do mAChR.

Já existem indícios na literatura de uma interação entre proteína G e receptores ionotrópicos. A presença de uma alça M3-M4, que possui um sítio de ligação com várias proteínas G, contribui para uma ação mútua entre nAChRs e GPCRs (51-55, 125, 186). Neste sentido, já foi descrito uma ligação da proteína G ao receptor de glicina 1 (GlyR1) com a alça M3-M4 (186). Uma mutação no GPBC no GlyR1 humano aboliu a ligação à proteína G nas células HEK 293 (187). Um alinhamento da sequência proteica da alça M3-M4 revela uma conservação do GPBC no nAChR $\alpha 7$. Uma mutação desses resíduos em $\alpha 7$ nAChRs atenua a interação com proteínas G e reduz a capacidade do receptor de ativar a liberação de cálcio pela fosfolipase C (PLC) e trifosfato de inositol (IP_3) em resposta à colina. Esses achados mostram um papel no acoplamento da proteína G na

sinalização de nAChR $\alpha 7$ (53). Outro estudo usando um modelo de inflamação na linhagem microglial mostrou uma interação entre nAChRs $\alpha 7$ e várias subunidades da proteína G, sugerindo um papel essencial para o acoplamento da proteína G na função dos receptores nicotínicos nesse tecido (55). Esses achados dão suporte a ideia de uma possível interação entre os mAChRs M3 e nAChRs $\alpha 7$.

Porém considerando que os receptores nAChR $\alpha 7$ são abertos com probabilidade baixa e rapidamente dessensibilizados em milissegundos, é intrigante que eles possam participar de forma tão importante para uma resposta de longo prazo. De fato, em muitos casos é provável que a condução iônica através do estado aberto sozinho seja insuficiente para explicar o transiente de cálcio observado em condições de estimulação onde o transiente se estende bem além do tempo do influxo de Ca^{2+} (51, 53-55, 188). É descrito na literatura que RhoA modula a associação do receptor de inositol trifosfato (IP3R) com o receptor canal transiente potencial (TRPC1) e, portanto, ativa o armazenamento e entrada de Ca^{2+} induzido pela depleção em células endoteliais (73). Além disso, a RhoA pode estar envolvida na sinalização celular de uma diversidade de processos fisiológicos (54, 73, 116, 117) e já é bem conhecido que vários tipos de TRPs são moduladores importantes do tônus vascular. Algumas vias de influxo de Ca^{2+} que estimulam vasodilatação dependente de endotélio permaneceram pouco desconhecidas até a descoberta de canais TRPs (189). Hoje, a participação de TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPC3 e TRPC4 na vasodilatação dependente do endotélio já é bem aceita (74, 168, 189, 190). Os canais TRPV4 do músculo liso e do endotélio estão criticamente envolvidos na mediação da vasodilatação arterial em resposta a fatores derivados do endotélio (190). Por exemplo, o TRPV4 regula a vasodilatação induzida por compostos de ácido epoxieicosatrienóico (EETs). O EET induz um aumento da corrente de K^+ mediado por BKCa resultando em hiperpolarização e vasodilatação do músculo liso. Portanto, é proposto que os TRPV4 formam um complexo de sinalização de Ca^{2+} com receptores de rianodina e canais de BKCa para induzir uma hiperpolarização muscular e dilatação arterial. (191). Vários estudos também dão suporte a possibilidade de que os TRPV4 também estejam envolvidos na dilatação induzida pelo fluxo em resposta ao shear stress (74, 166, 168, 190-193). Foi demonstrado que o acoplamento do nAChRs $\alpha 7$ às proteínas G heterotriméricas modula a ativação de Rho-A, a motilidade citoesquelética e o crescimento estrutural em neurites (54). Pensando nisso, nosso grupo avaliou a hipótese desses receptores estarem ativando uma via de sinalização envolvendo pequena proteína G (RhoA) e TRPs. Nossos dados mostraram que após a inibição farmacológica

de rho-A a resposta vasodilatadora esteve reduzida. Somado a isso nossos achados mostram um possível envolvimento dos TRPs, em especial o subtipo TRPV4 na resposta vasodilatadora à ACh, já que o bloqueio farmacológico desses canais também leva a uma diminuição da resposta vasodilatadora dependente de endotélio após a estimulação com ACh. Ainda, nosso grupo mostrou que TRPV4 e nAChRs $\alpha 7$ parecem participar da mesma via de sinalização, já que a inibição conjunta dessas moléculas não apresenta um efeito somatório.

Em resumo, nossos dados mostram a presença de um SCNN em vasos humanos não-inervados, incluindo o receptor nAChRs $\alpha 7$ que participa da resposta vasodilatadora à ACh. A participação dos nAChRs $\alpha 7$ envolve uma heterodimerização com os receptores mAChRs M3. Neste sentido a estimulação prévia dos mAChRs M3 ativa os nAChRs $\alpha 7$ e que pode envolver uma via de sinalização dependente de Rho-A e TRPs. Finalmente, esperamos que a compreensão do envolvimento dos nAChRs na vasodilatação e sua interação com os mAChRs, possa contribuir para um melhor entendimento do controle vasomotor e manutenção da funcionalidade vascular. Dessa forma, esses receptores representam uma alternativa na busca de novas ferramentas farmacológicas para o tratamento de doenças cardiovasculares.

7. RESUMO DOS RESULTADOS

Em resumo nossos resultados sugerem que:

- 1) Existe componentes do SCNN na artéria mamária e veia safena de humanos necessários a síntese, transporte e degradação da ACh, além de mAChRs M3 e nAChR $\alpha 7$;
- 2) O bloqueio dos mAChRs abole a resposta vasodilatadora em artéria mamária e veia safena de humanos e a estimulação direta dos nAChRs não induz efeito vasodilatador. No entanto, o bloqueio dos nAChRs diminui significativamente a resposta vasodilatadora;
- 3) Os nAChR $\alpha 7$ e os mAChR M3 estão, no estado basal, ligados fisicamente e/ou estão extremamente próximos para co-imuprecipitarem juntos tanto nas células endoteliais de artéria mamária e veia safena de humanos quanto em aorta de camundongos;
- 4) O nAChR $\alpha 7$ está envolvido no aumento da $[Ca^{+2}]_i$, já que o bloqueio farmacológico com a α -bungarotoxina foi capaz de reduzir esse aumento.
- 5) A resposta vasodilatadora parece envolver um mecanismo de sinalização que envolve não só os receptores mAChR M3 e nAChR $\alpha 7$ como também a pequena proteína G Rho-A e os TRPs.

8. CONCLUSÃO

Os dados deste trabalho, em conjunto, mostram que existe um SCNN na veia safena e na artéria mamária de humanos. Mais importante, estes dados mostram que os nAChR $\alpha 7$ participam da resposta vasodilatadora dependente de endotélio mediada pela ACh. O mecanismo parece não envolver uma ativação direta dos nAChR $\alpha 7$, mas sim uma ativação do mAChRs M3 que fariam parte de um complexo formado pela heterodimerização dos dois receptores. Ainda, nossos dados sugerem que a resposta vasodilatadora parece envolver um mecanismo de sinalização que envolve ativação da pequena proteína G Rho-A e de canais transientes de membrana (TRPs).

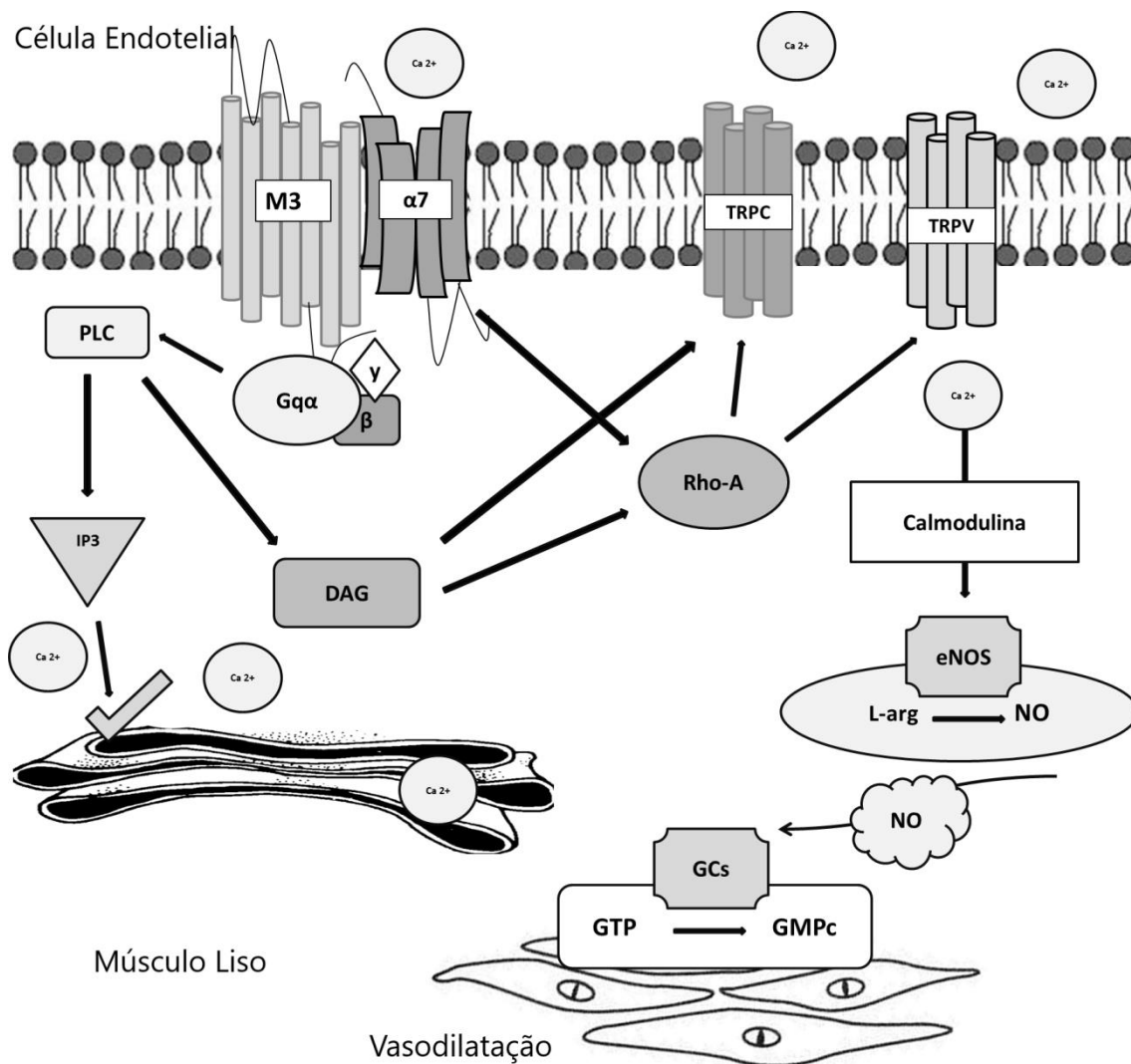


Figura 22: Resposta vasodilatadora associada à ACh modulada pela heterodimerização entre mAChRs M3 e nAChR $\alpha 7$. A resposta vasodilatadora associada à ACh parece envolver uma cascata de sinalização que se inicia com a ativação dos mAChRs M3. Os nAChR $\alpha 7$ e os mAChR M3 estão, no estado basal, ligados fisicamente e/ou estão extremamente próximos e juntos são responsáveis pela resposta vasorelaxante. Esse mecanismo complexo de sinalização parece também envolver a ativação da pequena proteína G Rho-A e de canais transientes de membrana (TRPs).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dale HH, Dudley HW. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J Physiol.* 1929;68(2):97-123.
2. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(1):127-34.
3. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci.* 2017;134(1):1-21.
4. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1027-32.
5. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(2):52-4.
6. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(3):198-205.
7. Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA, Kummer W. Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta.* 2005;26(10):735-46.
8. Arias HR, Richards VE, Ng D, Ghafoori ME, Le V, Mousa SA. Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(7):1441-51.
9. Marrero MB, Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R. Application of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists in inflammatory diseases: an overview. *Pharm Res.* 2011;28(2):413-6.
10. Santanam N, Thornhill BA, Lau JK, Crabtree CM, Cook CR, Brown KC, et al. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;225(2):264-73.
11. Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2013;137(1):22-54.
12. Ruggieri MR, Braverman AS, Vegesna AK, Miller LS. Nicotinic receptor subtypes mediating relaxation of the normal human clasp and sling fibers of the upper gastric sphincter. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(7):1015-25.

13. Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(2):96-108.
14. Shorey-Kendrick LE, Ford MM, Allen DC, Kuryatov A, Lindstrom J, Wilhelm L, et al. Nicotinic receptors in non-human primates: Analysis of genetic and functional conservation with humans. *Neuropharmacology.* 2015;96(Pt B):263-73.
15. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol.* 2017.
16. Ladinsky H, Schiavi GB, Monferini E, Giraldo E. Pharmacological muscarinic receptor subtypes. *Prog Brain Res.* 1990;84:193-200.
17. Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:633-73.
18. Jaiswal N, Lambrecht G, Mutschler E, Tacke R, Malik KU. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;258(3):842-50.
19. Boulanger CM, Morrison KJ, Vanhoutte PM. Mediation by M3-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol.* 1994;112(2):519-24.
20. Sastry BV. Human placental cholinergic system. *Biochem Pharmacol.* 1997;53(11):1577-86.
21. Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006;26(3):219-33.
22. Wang H, Lu Y, Wang Z. Function of cardiac M3 receptors. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2007;27(1):1-11.
23. Gericke A, Sniatecki JJ, Mayer VG, Goloborodko E, Patzak A, Wess J, et al. Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(5):H1602-8.
24. Wessler IK, Kirkpatrick CJ. Activation of muscarinic receptors by non-neuronal acetylcholine. *Handb Exp Pharmacol.* 2012(208):469-91.
25. Gentry PR, Kokubo M, Bridges TM, Cho HP, Smith E, Chase P, et al. Discovery, synthesis and characterization of a highly muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)-selective M5-orthosteric antagonist, VU0488130 (ML381): a novel molecular probe. *ChemMedChem.* 2014;9(8):1677-82.

26. Radu BM, Osculati AMM, Suku E, Banciu A, Tsenov G, Merigo F, et al. All muscarinic acetylcholine receptors (M1-M5) are expressed in murine brain microvascular endothelium. *Sci Rep.* 2017;7(1):5083.
27. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7(7):833-9.
28. Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest.* 2002;110(4):527-36.
29. Chen DJ, Gao FF, Ma XK, Shi GG, Huang YB, Su QX, et al. Pharmacological and functional comparisons of $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ -nAChRs and $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs heterologously expressed in the human epithelial SH-EP1 cell line. *Acta Pharmacol Sin.* 2018.
30. Alcaïno C, Musgaard M, Minguez T, Mazzaferro S, Faundez M, Iturriaga-Vasquez P, et al. Role of the Cys Loop and Transmembrane Domain in the Allosteric Modulation of $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Biol Chem.* 2017;292(2):551-62.
31. Macklin KD, Maus AD, Pereira EF, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287(1):435-9.
32. Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci.* 2003;72(18-19):2055-61.
33. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol.* 2008;154(8):1558-71.
34. Gao XL, Yin GD, Bing YH, Jin YZ, Jin QH. [Cardiovascular change induced by central hypertonic saline are accompanied by GABA release in awake rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2009;25(4):462-6.
35. Islam MZ, Watanabe Y, Nguyen HT, Yamazaki-Himeno E, Obi T, Shiraishi M, et al. Vasomotor effects of acetylcholine, bradykinin, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, histamine and angiotensin II on the mouse basilar artery. *J Vet Med Sci.* 2014;76(10):1339-45.
36. Jaiswal N, Jaiswal RK, Malik KU. Muscarinic receptor-mediated prostacyclin and cGMP synthesis in cultured vascular cells. *Mol Pharmacol.* 1991;40(1):101-6.

37. Norel X, Angrisani M, Labat C, Gorenne I, Dulmet E, Rossi F, et al. Degradation of acetylcholine in human airways: role of butyrylcholinesterase. *Br J Pharmacol.* 1993;108(4):914-9.
38. Morris D. The choline acetyltransferase of human placenta. *Biochem J.* 1966;98(3):754-62.
39. Cooke JP, Ghebremariam YT. Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18(7):247-53.
40. Wessler I, Roth E, Schwarze S, Weikel W, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, et al. Release of non-neuronal acetylcholine from the human placenta: difference to neuronal acetylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001;364(3):205-12.
41. Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Wessler I. Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci.* 2007;80(24-25):2181-5.
42. Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Meurs H, Wessler I. The non-neuronal cholinergic system: basic science, therapeutic implications and new perspectives. *Life Sci.* 2012;91(21-22):969-72.
43. Montalbano AM, Di Sano C, Chiappara G, Riccobono L, Bonanno A, Anzalone G, et al. Cigarette smoke and non-neuronal cholinergic system in the airway epithelium of COPD patients. *J Cell Physiol.* 2017.
44. Bader S, Diener M. Segmental differences in the non-neuronal cholinergic system in rat caecum. *Pflugers Arch.* 2018;470(4):669-79.
45. Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(6):673-80.
46. Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.* 1993;13(2):596-604.
47. Reuben M, Boye S, Clarke PB. Nicotinic receptors modulating somatodendritic and terminal dopamine release differ pharmacologically. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):39-49.
48. Clementi F, Fornasari D, Gotti C. Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):3-10.
49. Perry E, Martin-Ruiz C, Lee M, Griffiths M, Johnson M, Piggott M, et al. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):215-22.

50. Si ML, Lee TJ. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors on cerebral perivascular sympathetic nerves mediate choline-induced nitrenergic neurogenic vasodilation. *Circ Res.* 2002;91(1):62-9.
51. Nordman JC, Kabbani N. An interaction between $\alpha 7$ nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 22):5502-13.
52. Nordman JC, Kabbani N. Microtubule dynamics at the growth cone are mediated by $\alpha 7$ nicotinic receptor activation of a G α q and IP3 receptor pathway. *FASEB J.* 2014;28(7):2995-3006.
53. King JR, Nordman JC, Bridges SP, Lin MK, Kabbani N. Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Biol Chem.* 2015;290(33):20060-70.
54. King JR, Kabbani N. Alpha 7 nicotinic receptor coupling to heterotrimeric G proteins modulates RhoA activation, cytoskeletal motility, and structural growth. *J Neurochem.* 2016;138(4):532-45.
55. King JR, Gillevet TC, Kabbani N. A G protein-coupled $\alpha 7$ nicotinic receptor regulates signaling and TNF- α release in microglia. *FEBS Open Bio.* 2017;7(9):1350-61.
56. Wu JC, Chruscinski A, De Jesus Perez VA, Singh H, Pitsiouni M, Rabinovitch M, et al. Cholinergic modulation of angiogenesis: role of the 7 nicotinic acetylcholine receptor. *J Cell Biochem.* 2009;108(2):433-46.
57. Lee J, Cooke JP. Nicotine and pathological angiogenesis. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1058-64.
58. Zou Q, Leung SW, Vanhoutte PM. Activation of nicotinic receptors can contribute to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;341(3):756-63.
59. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(9):e108-e14.
60. Munch PA. Endothelium-mediated and direct actions of acetylcholine on rabbit aortic baroreceptors. *Circ Res.* 1994;74(3):422-33.
61. Blitzer ML, Lee SD, Creager MA. Endothelium-derived nitric oxide mediates hypoxic vasodilation of resistance vessels in humans. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):H1182-5.

62. Fabricius AM, Oser A, Diegeler A, Rauch T, Mohr FW. Endothelial function of human vena saphena magna prepared with different minimally invasive harvesting techniques. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;18(4):400-3.
63. Chalon S, Tejura B, Moreno H, Urae A, Blaschke TF, Hoffman BB. Role of nitric oxide in isoprenaline and sodium nitroprusside-induced relaxation in human hand veins. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;47(1):91-8.
64. Capettini LS, Cortes SF, Lemos VS. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol.* 2010;643(2-3):260-6.
65. Durán WN, Breslin JW, Sánchez FA. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010;87(2):254-61.
66. Gohar EY, El-gowilly SM, El-Gowell HM, El-Demellawy MA, El-Mas MM. PI3K/Akt-independent NOS/HO activation accounts for the facilitatory effect of nicotine on acetylcholine renal vasodilations: modulation by ovarian hormones. *PLoS One.* 2014;9(4):e95079.
67. Silva JF, Correa IC, Diniz TF, Lima PM, Santos RL, Cortes SF, et al. Obesity, Inflammation, and Exercise Training: Relative Contribution of iNOS and eNOS in the Modulation of Vascular Function in the Mouse Aorta. *Front Physiol.* 2016;7:386.
68. Endlich PW, Aires RD, Gonçalves RL, Costa ED, de Paula Arantes Ângelo J, Alves LF, et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide effect in grafts used in human coronary bypass surgery. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(10):1015-26.
69. Biel V, Novák J, Pluháček L, Špác J. Endothelial function, its relation to arterial hypertension and the possibility of its modulation. *Vnitr Lek.* 2018;64(7-8):762-70.
70. Parnavelas JG, Kelly W, Burnstock G. Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature.* 1985;316(6030):724-5.
71. Moncada S, Palmer RM. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol.* 1991;15(1):16-9.
72. Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2001;60(6):1201-9.
73. Mehta D, Ahmmed GU, Paria BC, Holinstat M, Voyno-Yasenetskaya T, Tiruppathi C, et al. RhoA interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and

transient receptor potential channel-1 regulates Ca²⁺ entry. Role in signaling increased endothelial permeability. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33492-500.

74. Baylie RL, Brayden JE. TRPV channels and vascular function. *Acta Physiol (Oxf).* 2011;203(1):99-116.

75. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 37a-37d.

76. Goedicke-Fritz S, Kaistha A, Kacik M, Markert S, Hofmeister A, Busch C, et al. Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/K(Ca) in caveolae of endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 2015;94(7-9):391-400.

77. Sturtzel C. Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1003:71-91.

78. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991;21(4):361-74.

79. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.

80. Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* 1992;145(3):201-27.

81. Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem.* 1991;266(35):23790-5.

82. Tucek S. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol.* 1982;322:53-69.

83. van Koppen CJ, Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther.* 2003;98(2):197-220.

84. Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, et al. Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology.* 2004;145(5):2498-506.

85. Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, et al. Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol.* 2007;51(4):1042-53.

86. Wolf-Johnston AS, Hanna-Mitchell AT, Buffington CA, Shinde S, Roppolo JR, Mayer E, et al. Alterations in the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in esophageal epithelium. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1065-9.

87. Guo J, Wang L, Xu H, Che X. Expression of non-neuronal cholinergic system in maxilla of rat in vivo. *Biol Res.* 2014;47:72.

88. Liu Q, Whiteaker P, Morley BJ, Shi FD, Lukas RJ. Distinctive Roles for $\alpha 7^*$ - and $\alpha 9^*$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors in Inflammatory and Autoimmune Responses in the Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:287.
89. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(4):338-49.
90. Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Kummer W, Wessler I. Recent progress in revealing the biological and medical significance of the non-neuronal cholinergic system. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(1):1-7.
91. Wessler I, Michel-Schmidt R, Dohle E, Kirkpatrick CJ. Release of acetylcholine from murine embryonic stem cells: effect of nicotinic and muscarinic receptors and blockade of organic cation transporter. *Life Sci.* 2012;91(21-22):973-6.
92. Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(2):186-92.
93. Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells. *Life Sci.* 2012;91(21-22):981-5.
94. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1085.
95. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med.* 2005;201(7):1113-23.
96. Si ML, Lee TJ. Presynaptic $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors mediate nicotine-induced nitric oxidergic neurogenic vasodilation in porcine basilar arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298(1):122-8.
97. Eglen RM, Choppin A, Watson N. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(8):409-14.
98. Picciotto MR, Caldarone BJ, Brunzell DH, Zachariou V, Stevens TR, King SL. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacol Ther.* 2001;92(2-3):89-108.

99. Uteshev VV, Meyer EM, Papke RL. Activation and inhibition of native neuronal alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic ACh receptors. *Brain Res.* 2002;948(1-2):33-46.
100. Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, et al. Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol.* 2002;540(Pt 2):425-34.
101. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:699-729.
102. Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49:57-71.
103. Zhang C, Zhou P, Yuan T. The cholinergic system in the cerebellum: from structure to function. *Rev Neurosci.* 2016;27(8):769-76.
104. Forsgren S. Presence of ChAT mRNA and a very marked $\alpha 7$ nAChR immunoreaction in the synovial lining layer of the knee joint. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1043-7.
105. Yang B, Lin H, Xu C, Liu Y, Wang H, Han H, et al. Choline produces cytoprotective effects against ischemic myocardial injuries: evidence for the role of cardiac m3 subtype muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Physiol Biochem.* 2005;16(4-6):163-74.
106. Okuda T, Haga T. High-affinity choline transporter. *Neurochem Res.* 2003;28(3-4):483-8.
107. Kuryatov A, Olale FA, Choi C, Lindstrom J. Acetylcholine receptor extracellular domain determines sensitivity to nicotine-induced inactivation. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):11-21.
108. Papke RL, Meyer E, Nutter T, Uteshev VV. alpha7 receptor-selective agonists and modes of alpha7 receptor activation. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):179-95.
109. Dajas-Bailador F, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(6):317-24.
110. Curtis BJ, Plichta JK, Blatt H, Droho S, Griffin TM, Radek KA. Nicotinic acetylcholine receptor stimulation impairs epidermal permeability barrier function and recovery and modulates cornified envelope proteins. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1070-6.
111. Zoli M, Pistillo F, Gotti C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology.* 2015;96(Pt B):302-11.

112. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):279-90.
113. Lanzafame AA, Christopoulos A, Mitchelson F. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels.* 2003;9(4):241-60.
114. Zholos AV, Zholos AA, Bolton TB. G-protein-gated TRP-like cationic channel activated by muscarinic receptors: effect of potential on single-channel gating. *J Gen Physiol.* 2004;123(5):581-98.
115. Khurana S, Yamada M, Wess J, Kennedy RH, Raufman JP. Deoxycholytaurine-induced vasodilation of rodent aorta is nitric oxide- and muscarinic M(3) receptor-dependent. *Eur J Pharmacol.* 2005;517(1-2):103-10.
116. Kumari S, Borroni V, Chaudhry A, Chanda B, Massol R, Mayor S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Biol.* 2008;181(7):1179-93.
117. Chernyavsky AI, Arredondo J, Qian J, Galitovskiy V, Grando SA. Coupling of ionic events to protein kinase signaling cascades upon activation of alpha7 nicotinic receptor: cooperative regulation of alpha2-integrin expression and Rho kinase activity. *J Biol Chem.* 2009;284(33):22140-8.
118. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004;74(6):363-96.
119. Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(7):703-11.
120. Molas S, Dierssen M. The role of nicotinic receptors in shaping and functioning of the glutamatergic system: a window into cognitive pathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;46 Pt 2:315-25.
121. Stokes C, Treinin M, Papke RL. Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(8):514-23.
122. Millar NS, Harkness PC. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Mol Membr Biol.* 2008;25(4):279-92.
123. Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F, Gotti C. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(8):1063-73.
124. Crespi A, Colombo SF, Gotti C. Proteins and chemical chaperones involved in neuronal nicotinic receptor expression and function: an update. *Br J Pharmacol.* 2018;175(11):1869-79.

125. King JR, Ullah A, Bak E, Jafri MS, Kabbani N. Ionotropic and Metabotropic Mechanisms of Allosteric Modulation of. *Mol Pharmacol*. 2018;93(6):601-11.
126. Fucile S. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*. 2004;35(1):1-8.
127. Palma E, Maggi L, Barabino B, Eusebi F, Ballivet M. Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits. *J Biol Chem*. 1999;274(26):18335-40.
128. Criado M, Valor LM, Mulet J, Gerber S, Sala S, Sala F. Expression and functional properties of $\alpha 7$ acetylcholine nicotinic receptors are modified in the presence of other receptor subunits. *J Neurochem*. 2012;123(4):504-14.
129. Wu J, Liu Q, Tang P, Mikkelsen JD, Shen J, Whiteaker P, et al. Heteromeric $\alpha 7\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(7):562-74.
130. Corradi J, Bouzat C. Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol*. 2016;90(3):288-99.
131. Dolezal V, Tucek S. The synthesis and release of acetylcholine in normal and denervated rat diaphragms during incubation in vitro. *J Physiol*. 1983;334:461-74.
132. Pfeil U, Haberberger RV, Lips KS, Eberling L, Grau V, Kummer W. Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci*. 2003;72(18-19):2087-90.
133. Yamada T, Inazu M, Tajima H, Matsumiya T. Functional expression of choline transporter-like protein 1 (CTL1) in human neuroblastoma cells and its link to acetylcholine synthesis. *Neurochem Int*. 2011;58(3):354-65.
134. Erickson JD, Varoqui H, Schäfer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, et al. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem*. 1994;269(35):21929-32.
135. Kummer W, Lips KS, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(2):219-34.
136. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*. 2007;24(7):1227-51.
137. Israël M, Dunant Y. Acetylcholine release. Reconstitution of the elementary quantal mechanism. *J Physiol Paris*. 1998;92(2):123-8.

138. Fischer J, Bouadjar B, Heilig R, Huber M, Lefèvre C, Jobard F, et al. Mutations in the gene encoding SLURP-1 in Mal de Meleda. *Hum Mol Genet.* 2001;10(8):875-80.
139. Beckmann J, Lips KS. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology.* 2013;92(5-6):286-302.
140. Kalashnyk OM, Gergalova GL, Komisarenko SV, Skok MV. Intracellular localization of nicotinic acetylcholine receptors in human cell lines. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1033-7.
141. Wessler I, Michel-Schmidt R, Brochhausen C, Kirkpatrick CJ. Subcellular distribution of choline acetyltransferase by immunogold electron microscopy in non-neuronal cells: placenta, airways and murine embryonic stem cells. *Life Sci.* 2012;91(21-22):977-80.
142. Chiba S, Tsukada M. Possible involvement of muscarinic M1 and M3 receptor subtypes mediating vasodilation in isolated, perfused canine lingual arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23(9):839-43.
143. Norel X, Walch L, Costantino M, Labat C, Gorenne I, Dulmet E, et al. M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. *Br J Pharmacol.* 1996;119(1):149-57.
144. Pesić S, Jovanović A, Grbović L. Muscarinic receptor subtypes mediating vasorelaxation of the perforating branch of the human internal mammary artery. *Pharmacology.* 2001;63(3):185-90.
145. Ryberg AT, Selberg H, Soukup O, Gradin K, Tobin G. Cholinergic submandibular effects and muscarinic receptor expression in blood vessels of the rat. *Arch Oral Biol.* 2008;53(7):605-16.
146. Elhusseiny A, Hamel E. Muscarinic--but not nicotinic--acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(2):298-305.
147. Yamada M, Lamping KG, Duttaroy A, Zhang W, Cui Y, Bymaster FP, et al. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):14096-101.
148. Long C, Chen MF, Sarwinski SJ, Chen PY, Si M, Hoffer BJ, et al. Monoamine uptake inhibitors block alpha7-nAChR-mediated cerebral nitrenergic neurogenic vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(1):H202-9.

149. Si ML, Long C, Chen MF, Lee TJ. Estrogen prevents β -amyloid inhibition of sympathetic $\alpha 7$ -nAChR-mediated nitroergic neurogenic dilation in porcine basilar arteries. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;203(1):13-23.
150. Lee RH, Liu YQ, Chen PY, Liu CH, Chen MF, Lin HW, et al. Sympathetic $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs mediate cerebral neurogenic nitroergic vasodilation in the swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(2):H344-54.
151. Rakhilin S, Drisdell RC, Sagher D, McGehee DS, Vallejo Y, Green WN. $\alpha 7$ receptors contain alpha7 subunits in two different disulfide-bonded conformations. *J Cell Biol*. 1999;146(1):203-18.
152. Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol*. 2000;393(1-3):279-94.
153. Biaggi-Labiosa NM, Avilés-Pagán E, Caballero-Rivera D, Báez-Pagán CA, Lasalde-Dominicci JA. Engineering $\alpha 4\beta 2$ nAChRs with reduced or increased nicotine sensitivity via selective disruption of consensus sites in the M3-M4 cytoplasmic loop of the $\alpha 4$ subunit. *Neuropharmacology*. 2015;99:273-84.
154. Wang J, Kuryatov A, Sriram A, Jin Z, Kamenecka TM, Kenny PJ, et al. An Accessory Agonist Binding Site Promotes Activation of $\alpha 4\beta 2^*$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Biol Chem*. 2015;290(22):13907-18.
155. Andersen ND, Nielsen BE, Corradi J, Tolosa MF, Feuerbach D, Arias HR, et al. Exploring the positive allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic receptors from a single-channel perspective. *Neuropharmacology*. 2016;107:189-200.
156. Jiang Y, Dai A, Zhou Y, Peng G, Hu G, Li B, et al. Nicotine elevated intracellular Ca^{2+} in rat airway smooth muscle cells via activating and up-regulating $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(2):389-401.
157. Koga M, Kanaoka Y, Ohkido Y, Kubo N, Ohishi K, Sugiyama K, et al. Varenicline aggravates plaque formation through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in ApoE KO mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455(3-4):194-7.
158. Shapira OM, Xu A, Aldea GS, Vita JA, Shemin RJ, Keaney JF. Enhanced nitric oxide-mediated vascular relaxation in radial artery compared with internal mammary artery or saphenous vein. *Circulation*. 1999;100(19 Suppl):II322-7.
159. Muir AD, McKeown PP, Bayraktutan U. Role of gender, smoking profile, hypertension, and diabetes on saphenous vein and internal mammary artery endothelial

relaxation in patients with coronary artery bypass grafting. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(3):199-205.

160. Gonçalves RL, Lugnier C, Keravis T, Lopes MJ, Fantini FA, Schmitt M, et al. The flavonoid dioclein is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. *Eur J Pharmacol*. 2009;620(1-3):78-83.

161. Franca A, Carlos Melo Lima Filho A, Guerra MT, Weerachayaphorn J, Loiola Dos Santos M, Njei B, et al. Effects of Endotoxin on Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Human Cholangiocytes. *Hepatology*. 2019;69(2):817-30.

162. Pinho JF, Medeiros MA, Capettini LS, Rezende BA, Campos PP, Andrade SP, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase- δ up-regulates L-type Ca^{2+} currents and increases vascular contractility in a mouse model of type 1 diabetes. *Br J Pharmacol*. 2010;161(7):1458-71.

163. Varnavas VC, Kontaras K, Glava C, Maniotis CD, Koutouzis M, Baltogiannis GG, et al. Chronic skeletal muscle ischemia preserves coronary flow in the ischemic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(4):H1229-35.

164. Kracun S, Harkness PC, Gibb AJ, Millar NS. Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function. *Br J Pharmacol*. 2008;153(7):1474-84.

165. Chernyavsky AI, Arredondo J, Vetter DE, Grando SA. Central role of $\alpha 9$ acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp Cell Res*. 2007;313(16):3542-55.

166. Seki T, Goto K, Kiyohara K, Kansui Y, Murakami N, Haga Y, et al. Downregulation of Endothelial Transient Receptor Potential Vanilloid Type 4 Channel and Small-Conductance of Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels Underpins Impaired Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Hypertension. *Hypertension*. 2017;69(1):143-53.

167. Ma X, Du J, Zhang P, Deng J, Liu J, Lam FF, et al. Functional role of TRPV4-KCa2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertension*. 2013;62(1):134-9.

168. Filosa JA, Yao X, Rath G. TRPV4 and the regulation of vascular tone. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;61(2):113-9.

169. Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, et al. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem.* 2002;277(16):13569-77.
170. Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B, Suzuki M, Janssens A, Voets T, et al. Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res.* 2005;97(9):908-15.
171. Marrelli SP, O'neil RG, Brown RC, Bryan RM. PLA2 and TRPV4 channels regulate endothelial calcium in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1390-7.
172. Santos SC, Vala I, Miguel C, Barata JT, Garção P, Agostinho P, et al. Expression and subcellular localization of a novel nuclear acetylcholinesterase protein. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25597-603.
173. Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, de Groat WC, Birder LA. Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci.* 2007;80(24-25):2298-302.
174. Porrello ER, Pflieger KD, Seeber RM, Qian H, Oro C, Abogadie F, et al. Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles. *Cell Signal.* 2011;23(11):1767-76.
175. Leonhardt J, Villela DC, Teichmann A, Münter LM, Mayer MC, Mardahl M, et al. Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension.* 2017;69(6):1128-35.
176. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* 2005;111(14):1806-13.
177. Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, et al. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem.* 2001;276(32):30308-14.
178. Maggio R, Barbier P, Colelli A, Salvadori F, Demontis G, Corsini GU. G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291(1):251-7.
179. Novi F, Stanasila L, Giorgi F, Corsini GU, Cotecchia S, Maggio R. Paired activation of two components within muscarinic M3 receptor dimers is required for recruitment of beta-arrestin-1 to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19768-76.

180. Gaitonde SA, González-Maeso J. Contribution of heteromerization to G protein-coupled receptor function. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;32:23-31.
181. Parmentier M. GPCRs: Heterodimer-specific signaling. *Nat Chem Biol*. 2015;11(4):244-5.
182. Vilardaga JP, Agnati LF, Fuxe K, Ciruela F. G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4215-20.
183. Abrie JA, Moolman WJA, Cozier GE, Schwager SL, Acharya KR, Sturrock ED. Investigation into the Mechanism of Homo- and Heterodimerization of Angiotensin-Converting Enzyme. *Mol Pharmacol*. 2018;93(4):344-54.
184. Chen Z, Deddish PA, Minshall RD, Becker RP, Erdös EG, Tan F. Human ACE and bradykinin B2 receptors form a complex at the plasma membrane. *FASEB J*. 2006;20(13):2261-70.
185. Dani JA. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol*. 2015;124:3-19.
186. Kabbani N, Nordman JC, Corgiat BA, Veltri DP, Shehu A, Seymour VA, et al. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *Bioessays*. 2013;35(12):1025-34.
187. Yevenes GE, Moraga-Cid G, Guzmán L, Haeger S, Oliveira L, Olate J, et al. Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors. *J Biol Chem*. 2006;281(51):39300-7.
188. Kabbani N, Nichols RA. Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39(4):354-66.
189. Nilius B, Droogmans G, Wondergem R. Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? *Endothelium*. 2003;10(1):5-15.
190. Earley S, Pauyo T, Drapp R, Tavares MJ, Liedtke W, Brayden JE. TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(3):H1096-102.
191. Liedtke WB, Heller S. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. 2007.
192. Ma X, Qiu S, Luo J, Ma Y, Ngai CY, Shen B, et al. Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca²⁺ influx. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):851-8.

193. Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, et al. TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(2):H466-76.

Anexo 1

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido

I INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa tem o objetivo de estudar a função de vasos humanos e correlacionar os resultados obtidos com análises laboratoriais e bioquímicas. Os resultados obtidos nos permitirá dar uma noção de que maneira podemos interferir no relaxamento ou contração dos vasos, além de avaliar a possível presença de determinadas substancias na circulação sanguínea. Estas substancias são importantes porque podem facilitar o diagnóstico de possíveis eventos cardíacos além de nos esclarecer condições fisiopatológicas já instauradas (hiperlipidemia,diabetes...). Para coletar estes vasos precisamos utilizar as sobras da cirurgia que você irá se submeter. Necessitamos também que seja coletado uma amostra de 5 a 10ml sangue. Deixamos claro que o material que utilizaremos é de descarte, ou seja, a porção dos vasos que serão removidos pelo cirurgião. Desta forma você irá contribuir para este estudo concordando em doar este material para que a pesquisa seja realizada.

II SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

III BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará inúmeros benefícios importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O conhecimento do funcionamento dos vasos retirados de material de descarte da cirurgia poderá ajudar no desenvolvimento de medicamentos utilizados no combate a hipertensão arterial, infarto ou acidentes vasculares cerebrais. As dosagens laboratoriais realizadas com o sangue coletado evidenciará a presença de substancias relacionadas a possíveis patologias, nos permitindo um diagnóstico mais preciso, o início precoce do tratamento adequado e o acompanhamento da evolução do paciente.

IV RISCOS

Uma vez que serão utilizados somente material de descarte, ou seja, as sobras dos vasos removidos para o processo cirúrgico, a coleta deste material não oferecera riscos ao paciente. Durante a coleta de sangue um pequeno hematoma pode surgir na região onde o sangue foi removido. No entanto será aproveitado o mesmo acesso para a administração de medicamentos, assim não haverá a necessidade de nenhuma perfuração adicional para a coleta de sangue.

V RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está previsto qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos através de incentivos a pesquisas provenientes de instituições de fomento.

VI DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. Nesta pesquisa utilizaremos somente material de descarte, ou seja, as sobras dos vasos removidos na cirurgia, não sendo realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

VII TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, voluntariamente, concordo com os propósitos de coletar uma amostra do meu sangue e que o descarte do material biológico proveniente da minha cirurgia tumoral seja utilizado para fins de pesquisa científica. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo a minha saúde. Declaro também que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para participação neste estudo.

Belo

Horizonte,.....de.....de.....

Assinatura do voluntário:

Telefones e endereço para contato:

Profa Virgínia Lemos: Tel: 3409-2950, celular: 31-87826096 e-mail: vslemos@icb.ufmg.br

Lucas Ferreira Alves: Tel: 3409-2515, celular: 37-991562445 e-mail: lucas.feal@hotmail.com

COEP (Comitê de Ética em Pesquisa): Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG - Brasil 31270-901 Telefone: 3409-4592.