

1) INTRODUÇÃO:

1.1) Fatores Neurotróficos com ênfase no fator de crescimento neural:

Os fatores neurotróficos constituem grupo heterogêneo de polipeptídeos solúveis, que permitem sobrevivência, diferenciação, manutenção e, quando possível, a regeneração axonal nos sistemas nervosos central (SNC) e periférico (SNP), agindo através de receptores específicos (HALEGOUA et al., 1991; DA-SILVA;1995; TERENCEHI,1999; RICHARDSON et al., 1999). Podem ser sintetizados tanto por neurônios como células efetadoras periféricas. Dessa forma, podem agir de forma parácrina e autócrina (BLOTNER & BAUMGARTEN, 1994; ACHESON & LINDSAY, 1996; MENDELL, 1996).

Em processos de degeneração de fibras nervosas do SNC e SNP, os níveis dos fatores neurotróficos diferem dos encontrados no tecido não lesado (HEUMANN et al., 1987a; MEYER et al., 1992; FUNAKOSHI et al., 1993; MARTINELLI, 2001). Após secção ou diminuição de fibras nervosas periféricas, a expressão de fatores neurotróficos encontra-se significativamente aumentada, com retorno aos padrões normais após a regeneração axonal (MARTINELLI et al 2002, revisão em BOYD & GORDON, 2003).

No SNC, apesar da riqueza em fatores neurotróficos, a capacidade de regeneração é considerada baixa por diferentes motivos, como ausência de matriz extracelular e fatores inibitórios ativos presentes no microambiente neuronal (revisão em FENRICH & GORDON, 2004). Ao contrário, o SNP apresenta condições favoráveis à regeneração. A presença da matriz extracelular é fator significativo no processo de regeneração de fibras nervosas periféricas. Células alvo de neurônios, além de células de Schwann, fibroblastos e macrófagos podem constituir suporte trófico. Diversos fatores expressos por essas células são importantes no processo

regenerativo com atividades inibidoras e estimuladoras (HEUMANN et al., 1987b; SCULTY & OTTEN, 1995; BRECKNEL, 1996). Por suas inúmeras ações, os fatores neurotróficos têm sido muito explorados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Várias estratégias experimentais também são norteadas para a compreensão detalhada de suas ações como agentes terapêuticos (ANAND, 1996; LINDSAY, 1996 LEWIN & BARDE, 1996; TERENCEHI, 1999, CHAO, 2003; AIRAKSINEM & SAARMA, 2002).

Os fatores neurotróficos compõem duas principais famílias: a das neurotrofinas (NT) e a do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), cujos componentes podem atuar de forma isolada ou conjuntamente nos processos de regeneração de fibras nervosas lesadas (revisão em RICHARDSON, 1991; CHAO, 2003; HOUENOU et al, 1996; AIRAKSINEN & SAARMA, 2002).

A família das NT compreende peptídeos com grande homologia estrutural sintetizados inicialmente como pró-neurotrofinas. Estas são clivadas para a formação de proteínas biologicamente ativas, apresentando-se então, como homodímeros covalentes (IBAÑES, 1998). Os principais componentes dessa família são: o fator de crescimento neural, NGF (revisão em SOFRONIEW et al., 2001; ALOE 2004); o fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF (BARDE et al.,1982); a NT-3 (HOHN et al., 1990) e a NT-4/5 (BERKEMEIER et al., 1991; HALLBOOK et al., 1991). Dois membros adicionais foram identificados apenas em peixes, NT-6 (GOTZ et al., 1994) e NT-7 (LAI et al., 1998).

As neurotrofinas exercem múltiplas ações já descritas em neurônios e em células efetadoras, possuindo afinidade por duas classes de receptores: os pertencentes à família tirosina-cinases (TrkA, TrkB e TrkC) e o receptor p75 da superfamília de receptores para fator de necrose tumoral (TNF). Este último faz parte

de uma família de moléculas de superfície que inclui Fas, CD95, CD40, CD30 e CD27 (SCULLY & OTTEN, 1995). Todas as neurotrofinas descritas ligam-se ao receptor p75, porém, com diferentes cinéticas de ligação e menor afinidade em relação aos receptores Trk (MCDONALD & CHAOS, 1995; TERENCEHI, 1999; IBAÑES, 1998). Os receptores Trk têm como característica a presença de domínios tirosina-cinases desencadeadores da transdução de sinais intracelulares. Sofrem dimerização induzida pelo ligante, ativando múltiplos sinais que promovem manutenção e sobrevivência neuronal através da autofosforilação de domínios específicos (BARBACID, 1995; GARGANO et al., 1997; SCULLY & OTTEN, 1995). NGF liga-se ao Trk-A ;o BDNF e a NT-4/5 ligam-se à TrkB e NT-3 liga-se à TrkC e alternativamente ao TrkA (revisões em BOYD & GORDON, 2003; CHAO, 2003) .

KAPLAN et al. (2000) analisaram diferentes vias de sinalização intracitoplasmáticas, comparando a atuação diferencial dos receptores TrkA e TrkB em neurônios simpáticos. TrkA desencadeia predominantemente a ativação de fosfatidilinositol-3-cinase (IP3-K) garantindo sobrevivência, enquanto TrkB pode desencadear vias distintas de sinalização pela ativação de IP3-K ou cinase ativada por mitógeno (MAPK). Além disso, ocorre atuação de diferentes proteínas adaptadoras e fatores adicionais (LEE et al., 2001). O receptor p75 também pode ser visto como modulador, podendo alterar a especificidade da ligação dos receptores Trk. Em camundongos mutantes, a ausência de p75 desencadeia expressão exacerbada de NT-3 que, por sua vez, pode compensar baixos níveis de NGF sintetizados por neurônios simpáticos. Nesse aspecto, o NT-3 garante sobrevivência neuronal através da ligação e ativação de receptores TrkA (BRENAAM et al., 1999) . Estudos *in vitro* e com camundongos transgênicos demonstram que a expressão de p75 confere maior seletividade de ligação e maior intensidade de atuação dos

receptores Trk. Embora o receptor p75 e os receptores Trk não tenham capacidade de ligação entre si, existem evidências da formação de complexos interativos entre eles na ausência de ligantes (BIBEL et al., 1999; BENEDETTI et al., 1993).

Dentre as diferentes NT, o NGF é a mais estudada. Membro protótipo da família é constituído de 118 aminoácidos e possui peso molecular de 130 Kda. Sua molécula é composta de 3 subunidades (α, β, γ). A subunidade β é a responsável pela atividade biológica e a subunidade γ é uma protease responsável pela transformação do transcrito pró-NGF em sua forma ativa. A subunidade α não apresenta função conhecida (revisão em SOFRONIEW et al., 2001). O NGF foi isolado, purificado e identificado como fator difusível, promotor de sobrevivência e crescimentos de neuritos provenientes de neurônios simpáticos e sensitivos no experimento clássico de Rita Levi-Montalcini e Viktor Hamburger (1953). Desempenha papel essencial no desenvolvimento, diferenciação, manutenção e sobrevivência de neurônios simpáticos e sensitivos derivados da crista neural (LEVI-MONTALCINI & ANGELETI, 1968; THOENEN & BARDE; HALEGOUA et al., 1991). A expressão e afinidade de ligação aos receptores, bem como a duração e intensidade dos eventos celulares desencadeados pela sua ativação conferem especificidade da atuação do NGF sobre células efetadoras ou neurônios (PATAPOUTIAN & REICHARDT, 2001; LEE et al., 2001; revisão em CHAO, 2003).

Muitos estudos comprovam ações desempenhadas pelo NGF no SNC, em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, núcleo caudado e putâmen (revisão em SOFRONIEW et al., 2001). No SNC de adultos, está implicado em processos de plasticidade, não sendo identificada atividade para sobrevivência neuronal a não ser para neurônios colinérgicos. Regula o tamanho do corpo celular, sua arborização dendrítica e sua conectividade (RUSH et al., 1997; MENDELL, 2001). No SNP, suas

ações podem ser analisadas em neurônios simpáticos e sensitivos derivados da crista neural (JOHNSON et al., 1989; SILOS-SANTIAGO et al., 1995). O NGF também pode estar envolvido com apoptose desses neurônios simpáticos e sensitivos (SCULLY & OTTEN, 1995). Os efeitos promovidos pela ligação do NGF em células gliais, como oligodendrócitos e células de Schwann, são reconhecidos como pró-apoptóticos, quando procedentes da ligação com p75, mas dependem da intensidade de ligação e interação com os receptores Trk (revisões em CHAO, 2003; BOYD & GORDON, 2003)

Células efetadoras, situadas em órgãos-alvo diversos, podem ser fonte de NGF. Sabe-se que o complexo NGF/receptor Trk é endocitado pela terminação nervosa e acumulado no pericário através de transporte axonal retrógrado (KORSHING & THOENEN, 1985; HEUMANN et al., 1984; 1987a), e que o nível de NGF sintetizado pelo órgão-alvo correlaciona-se com a densidade de sua inervação simpática (SHELTON & REICHARD, 1984; RICHARDSON, 1991; IEDA et al., 2003). Diversos tipos celulares são capazes de produzir NGF durante o desenvolvimento e na vida adulta. Dentre eles, podemos citar queratinócitos, melanócitos, células musculares lisas, fibroblastos, células de Schwann. Também ocorre síntese de NGF em órgãos como gônadas, tireóide, paratireóide e em glândulas exócrinas como as glândulas salivares (revisão em SOFRONIEW et al., 2001). Cardiomiócitos de camundongos *in vitro* também secretam NGF (FURUKAWA et al., 1984; KAYE et al., 2000, IEDA et al., 2004). A glândula salivar submandibular de roedores é tipicamente órgão fonte de NGF (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1971), sendo este produzido e armazenado por células dos túbulos contorcidos granulosos. Também pode ser sintetizado, estocado e liberado por mastócitos (GRESIK et

al.1996; LEON et al., 1994; BONINI et al., 1999; SHOOTER, 2001; ALOE, 2004 e 2002).

LOCKHART e colaboradores (1997) demonstraram que o NGF é capaz de potencializar a transmissão sináptica entre neurônios simpáticos e cardiomiócitos. Os níveis teciduais de NGF obtidos em extratos de átrios e ventrículos apresentam aumento significativo após processos de simpatectomia química ou em outras condições de desnervação simpática também ocorre tal aumento (VO & TOMLINSON,1999; MARTINELLI et al., 2001; EKSTRON & REINHOLD, 2003)

O NGF também possui papel comunicador entre o sistema imune e nervoso ocorrendo aumento significativo dos níveis teciduais e séricos de NGF em respostas inflamatórias, doenças auto-imunes, e reações alérgicas podendo, dessa maneira, agir como modulador (revisões em ALOE, 1999, 2005; BONINI et al., 1999; ODDIAH et al., 1998). Em mastócitos, pode atuar como fator mitogênico e indutor de desgranulação, estimulando também a expressão de citocinas como IL-6 (LEON et al., 1994; TAM et al., 1997; MARSHAAL et al., BONINI et al., 1999). Sabe-se que macrófagos situados no sistema nervoso central são capazes de produzir NGF *in vitro*. Monócitos e macrófagos do sangue periférico sintetizam constitutivamente NGF e aumentam a expressão de seus receptores, quando expostos a agentes inflamatórios como lipopolissacarídeos (HEUMANN et al.,1987b; CAROLEO et al., 2001; MALLAT et al.,1989). Em eosinófilos, o NGF capacita sua viabilidade e atividade e também atua como fator indutor de mudança do perfil sanguíneo para o tecidual (HAMADA et al., 1996; SOLOMON et al., 1998). Eosinófilos são capazes de sintetizar, armazenar e liberar BDNF e NT-3 (NOGA et al., 2003). O NGF tem ação comprovada sobre linfócitos B garantindo sobrevivência e sua síntese por essas células após a ativação (TORCIA et al., 1996). Algumas classes de linfócitos T

ativados também secretam NGF e expressam TrkA (EHRARD et al., 1993; LAMBIASE et al., MOALEN et al., 2001). O NGF também gera mudança de conformação de plaquetas e promove crescimento de colônias e diferenciação de precursores mielóides (SCULTY & OTTEN, 1995).

Os efeitos do NGF estão relacionados à ativação de diferentes vias bioquímicas, como ativação da via proteíno-cinase ativada por mitógeno (MAPK) e da via inositolfofostato-3 (IP3) com inativação de proteínas apoptóticas BAD e BAX da família Bcl-2 via trKA (DATTA et al., 1997; GLEBOVA & GINTY, 2005). Ainda foi descrita a ativação da via fosfolipase tipo C γ (PLC γ) que gera diacilglicerol (DAG) e IP3 induzindo liberação de cálcio de estoques celulares intracitoplasmáticos. A ativação via p75 é menos compreendida, mas pode resultar em produção de ceramidas, ativação de NF κ B ou ativação de cinases reguladoras como JNK (LEE et al., 2001; CHAO, 2003).

1.2) Endotelinas e seus receptores:

As endotelinas (ET) são peptídeos vasoativos, isolados primeiramente como moléculas vasoconstritoras em células endoteliais de suínos *in vitro* (YANAGISAWA et al., 1988). Após sua descoberta, três isoformas foram descritas: ET-1, ET-2 e ET-3 sendo codificadas diferencialmente em três genes diferentes. As ET são derivadas de moléculas precursoras denominadas pré-pró-endotelinas com 203 aminoácidos, que posteriormente são convertidas em pró-endotelinas. Estas podem então ser clivadas por complexos enzimáticos específicos, semelhantes à furina-convertases, dando origem à grande endotelina com 38 aminoácidos. Esta molécula intermediária e inativa, pode ser hidrolisada através da atuação de enzimas conversoras de endotelinas (ECEs 1,2,3) originando então ET biologicamente ativas. Além de

propriedades cardiovasculares, ET podem atuar também durante o desenvolvimento, em fenômenos gastrointestinais e hormonais, bem como em diferentes patologias (revisões em LUSCHER & BARTON, 2000; GIANESSI et al., 2001).

ET-1 é produzida por células endoteliais, por cardiomiócitos, astrócitos, células renais, alguns tipos neuronais e células intestinais, entre outras. Possui atividades vasoconstritoras, homeostáticas, ionotrópicas (coração) e mitogênicas. Podem também alterar o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso simpático (SNS). ET-2 também possui atividade vasoconstritora e é produzida por astrócitos, células intestinais e renais, bem como, em menor extensão, por células cardíacas, placenta e útero. ET-3 é encontrada em altas concentrações no cérebro, no trato gastrointestinal, nos pulmões e rins. Possui capacidade vasoconstritora reduzida (revisão em GIANESSI et al., 2001).

As endotelinas possuem dois tipos de receptores que se encontram amplamente distribuídos em mamíferos: ET-A e ET-B. Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G, possuindo sete domínios transmembrana. ET-1 e ET-2 possuem maior afinidade pelo receptor ET-A do que ET-3, enquanto todas as três isoformas possuem afinidades similares para o receptor ET-B. No sistema cardiovascular ET-A é mais abundante em células musculares lisas, cardiomiócitos e fibroblastos (SAKURAI-YAMASHITA et al., 1997 a; SUGO et al., 2001).

As atividades vasoconstritoras são mediadas principalmente por ET-A em células musculares lisas. Receptores ET-B presentes em células musculares lisas vasculares também possuem capacidade vasoconstritoras, mas receptores localizados em células endoteliais possuem atividades vasodilatadoras através da liberação de fatores como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (ZHANG et al., 1998).

No coração, as endotelinas participam do crescimento e força de contração das fibras musculares cardíacas (ZOLK et al., 2004; PATEL & KOS, 2005). A utilização de antagonistas e agonistas de receptores ET-A e/ou ET-B bem como o uso de inibidores de ECEs têm sido de grande utilidade no estudo da síntese e dos efeitos de ET. Assim, confirmou-se o envolvimento de endotelinas em várias doenças como insuficiência cardíaca congestiva (BORGESON et al., 1998), infarto do miocárdio (BERGER et al., 2003) e hipertensão arterial (BARTON et al., 1998), entre outras. O bloqueio de receptores ET-A restaura a função endotelial mediada por NO e inibe aterosclerose em camundongos (WENSEL et al., 1998). O bloqueio dual de receptores de endotelinas controla arritmias cardíacas em ratos (CROCKETT et al., 2001).

Agonistas e antagonistas de receptores ETA e ETB também vêm sendo utilizados em estudos sobre expressão de fatores neurotróficos. Utilizando-se antagonistas de receptores ET-B (BQ788), KOYAMA e colaboradores (2002) observaram que a ET-1 estimula a expressão de GDNF em astrócitos de ratos *in vitro*. A administração de agonista de receptor ET-B aumenta a expressão de GDNF e BDNF no cérebro de ratos e estimula a expressão de NT-3 em astrócitos de ratos *in vitro* e *in vivo* (KOYAMA et al., 2003, 2005).

O fármaco Bosentan (Ro-47-0203) é antagonista não peptídico dos receptores ET-A e ET-B de endotelinas, e tem sido utilizado em vários modelos experimentais (IGLARZ et al., 2001; OSTROWSKI et al., 2003; RICH & McLAUGHLIN, 2003, GONON et al., 2004;). É também descrita sua utilização no tratamento de doenças cardiovasculares e respiratórias (LUSCHER & BARTON, 2000). A afinidade deste antagonista pelo receptor ET-A é cerca de 100 vezes maior do que para o receptor ET-B *in vitro*. Após a administração oral, a concentração plasmática máxima é

alcançada em cerca 3 a 5 horas (revisão em CHENG, 2003). O bosentan causa decréscimo na pressão cardíaca sistólica e possui ação vasodilatadora nas coronárias em doenças cardiovasculares.(WENZEL et al., 1998; GONON et al., 2005).

Apesar da reconhecida importância de fatores neurotróficos para a sobrevivência e manutenção de neurônios, como recentemente comentado (HEMPSTEAD, 2005), pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam a expressão desses fatores. No intuito de identificar reguladores da síntese de NGF, IEDA et al. (2004) mostraram evidências de que ET-1 regula a expressão de NGF em cardiomiócitos *in vitro*. Essa regulação acontece através de receptores ET-A e envolve $G_i\beta\gamma$, PKC, família Src, EGFR, p38MAPK, AP-1 e cinases reguladas por sinais extracelulares. Os níveis de noradrenalina, a densidade de inervação simpática cardíaca e expressão de NGF é significativamente reduzida em camundongos deficientes em ET1 $-/-$. Neste mesmo estudo, a exacerbação da expressão cardíaca de genes codificadores de NGF em camundongos ET1 $-/-$, auxiliou no aumento da inervação simpática. Tais achados indicam que ET-1 pode regular a expressão de NGF em cardiomiócitos e cumpre papel crítico na inervação cardíaca.

1.3) Simpatectomia química pela 6-OHDA:

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma neurotoxina captada por terminações nervosas simpáticas que, assim, são seletivamente degeneradas sem que ocorra lesão de pericários neuronais em gânglios, pelo menos após o período neonatal. Apresenta efeito em curto prazo com desaparecimento ou redução da inervação simpática noradrenérgica e da captação da noradrenalina pelas terminações

nervosas, sendo esses efeitos dose-dependentes (JONSSON, 1971). As terminações simpáticas recuperam-se gradualmente após a interrupção do tratamento. Vem sendo utilizada em larga escala em estudos sobre degeneração e regeneração de fibras nervosas simpáticas em diferentes órgãos (JONSSON & SACHS, 1970; NYGREN et al., 1971; TRANZER & RICHARDS, 1971; GLOSTER & DIAMOND, 1995; MARTINELLI et al., 2002;).

A 6-OHDA possui ação diferencial em órgãos distintos sendo o coração e a íris, órgãos bastante susceptíveis à sua ação (JONSON & SACHS, 1970; MALMFORS, 1971; BJERRE et al., 1974). LOREZ et al. (1995) demonstraram degeneração significativa com posterior regeneração de fibras lesadas na íris e no coração de ratos. BJERRE et al. (1974) analisaram o efeito do anticorpo anti-NGF na dinâmica de regeneração de axônios noradrenérgicos após o tratamento por 6-hidroxidopamina. A simpatectomia química acompanhada do tratamento com soro anti-NGF causa pronunciada inibição da regeneração de fibras nervosas simpáticas em vários órgãos analisados, entre eles coração e glândulas submandibulares. Também observaram recuperação parcial na glândula submandibular com distribuição irregular de fibras noradrenérgicas parenquimatosas cinco dias após o tratamento com 6-OHDA, na ausência de soro anti-NGF. No coração mostraram que a reinervação ocorre até dois meses após a simpatectomia, havendo diferenças cinéticas entre átrios e ventrículos.

VO & TOMLINSON (1999) sugerem a participação de NGF na regeneração de fibras nervosas simpáticas no átrio de ratos adultos lesados pela 6-OHDA. GLOSTER & DIAMOND (1995), no entanto, afirmam que a regeneração de fibras nervosas simpáticas após o tratamento com 6-OHDA é independente de NGF, devendo estar relacionada a mecanismos unicamente associados ao corpo neuronal.

2) JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1) Justificativa:

Resultados anteriores obtidos no Laboratório de Neurobiologia (MARTINELLI et al., 2001 e 2002) mostraram que no coração de ratos jovens, o tratamento com 6-OHDA (100mg/Kg) em dose única, provoca total desaparecimento de fibras e terminações 3 horas após o tratamento. A recuperação da inervação inicia-se no átrio aos sete dias após a simpatectomia, pois observa-se em alguns animais, o reaparecimento de poucas fibras fluorescentes, geralmente associadas aos grandes troncos que acompanham vasos sanguíneos. No ventrículo o início da regeneração ocorre 30 dias após o tratamento com 6-OHDA. Há aumento significativo nos níveis de NGF em átrios e ventrículos 30 dias após a simpatectomia química (MARTINELLI, 2001).

BJERRE et al. (1974) observaram a ocorrência de degeneração e regeneração da inervação simpática parenquimatosa nas glândulas salivares submandibulares de camundongos cinco dias após o tratamento com 6-OHDA.

Poucos estudos analisaram a ação de ETs sobre a expressão de diferentes fatores neurotróficos. IEDA e colaboradores (2004) observaram que ET-1 regula a expressão de NGF em cardiomiócitos primários *in vitro*. Em camundongos ET^{-/-} encontraram evidências de que ET-1 desempenha ações importantes na inervação simpática do coração. Os níveis de noradrenalina, a densidade da inervação simpática e os níveis de NGF nestes camundongos encontraram-se significativamente reduzidos. Exacerbando-se a expressão dos genes codificadores de NGF, nestes mesmos camundongos, observou-se recuperação parcial da inervação cardíaca.

Outros fatores como BDNF; NT-3 e mesmo GDNF em astrócitos do SNC de murinos também podem ser regulados por ETs (KOYAMA et al. 2003 e 2005).

Na glândula salivar submandibular não há qualquer estudo sobre o controle da expressão de NGF. Nosso interesse neste órgão centra-se no fato do NGF ser produzido e estocado nas células dos túbulos contorcidos granuloso (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1971; BJERRE et al., 1977; revisão em GRESIK et al., 1996). Por outro lado, não há estudos sobre o papel de ETs nas glândulas submandibulares durante a regeneração de fibras nervosas simpáticas ou sobre sua possível atuação na síntese de NGF.

No presente trabalho, dois órgãos ricamente inervados por fibras nervosas noradrenérgicas, coração e glândulas salivares submandibulares (revisão em SHOOTER, 2001; GLEBOVA & GINTY, 2004) foram analisados com o objetivo de iniciar estudos sobre a participação de ETs no processo regenerativo de fibras nervosas simpáticas.

2.2) Objetivo geral:

O presente trabalho tem como objetivo verificar os níveis teciduais de NGF em condições de regeneração de terminações nervosas simpáticas, após simpatectomia química por 6-OHDA, usando-se ratos tratados ou não com bosentan, antagonista dos receptores ET-A e ET-B de endotelinas.

2.3) Objetivos Específicos:

No coração (átrios e ventrículos) e glândulas salivares submandibulares de ratos Holtzman jovens simpatectomizados e controles, tratados ou não com bosentan pretendemos:

1. Verificar reaparecimento, bem como a densidade de fibras nervosas noradrenérgicas através da técnica de fluorescência induzida pelo ácido glioxílico, durante a primeira semana após a simpatectomia pela 6-OHDA;
2. Quantificar os níveis teciduais da proteína NGF através de ELISA nos diferentes tempos, após a simpatectomia e se possível correlacioná-los com o grau de reinervação ou desnervação.

3) MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1) Animais:

Utilizaram-se ratos Holtzman isogênicos jovens (31 dias), criados no biotério de ratos do Departamento de Morfologia e ratos não isogênicos fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CeBIO-ICB). Ratos tratados com bosentan ou com seu diluente, foram sacrificados em diferentes períodos após a administração de 6-OHDA diluída em solução anti-oxidante (simpatectomia química) ou apenas da solução anti-oxidante (falsa simpatectomia).

3.2) Tratamento com bosentan:

Bosentan (Ro-47-0203/029), antagonista não peptídico dos receptores ETA e ETB de endotelinas foi gentilmente cedido pela Actelion Pharmaceuticals Ltd (Suíça). A droga foi diluída em goma arábica a 5% e administrada por gavagem diariamente na dose de 100 mg/Kg de peso corporal até o dia de sacrifício. Ratos controles de mesma idade receberam apenas o veículo (goma arábica a 5%). O tratamento com bosentan iniciou-se 48 horas antes da injeção de 6-OHDA. Os ratos foram pesados diariamente para eventuais correções de dose.

3.3) Simpatectomia química:

A simpatectomia química foi realizada através de injeção subcutânea de 6-OHDA (Sigma, St Louis, USA) em dose única (100 mg/ Kg de peso corporal) em veículo antioxidante contendo salina a 0,9% e ácido ascórbico a 0,1%. Em ratos controles de mesma idade administrou-se apenas o veículo.

3.4) Sacrifício:

Os animais foram sacrificados com 3 e 7 dias após a simpatectomia química que correspondem ao 5º e 9º dia de tratamento com bosentan ou veículo. Os animais foram anestesiados via injeção intraperitoneal de 2,2,2 tribromoetanol (250 mg/100g de peso corporal) para a retirada de fragmentos de glândula salivar submandibular, átrios e ventrículos. Um grupo complementar de ratos também foi analisado para análise da inervação noradrenérgica 24 horas após de tratamento com 6-OHDA. Os fragmentos foram utilizados para estudo da inervação simpática (fluorescência induzida pelo ácido glioxílico), para quantificação dos níveis teciduais de NGF através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

3.5) Fluorescência induzida pelo ácido glioxílico para localização de catecolaminas:

Foi utilizado o método preconizado por DE LA TORRE (1980), modificado por COTTLE et al., (1985). Fragmentos de glândulas salivares submandibulares, aurículas e ventrículos direitos foram colocadas no suporte de tecido contendo gotas de solução salina à 0,9% e congelados à -30° no criostato. Cortes com 30 (µm de espessura) foram distendidos sobre lâminas de vidro. As secções foram então mergulhadas em solução de ácido glioxílico à 2% em tampão fosfato a 0,25 M, com sacarose a 0,2 M em pH 7,4 por 30 minutos e secadas em corrente de ar frio por 15 a 20 minutos. Os cortes foram então cobertos com óleo mineral e mantidos em estufa a 60°C por 30 minutos. Após a montagem, as lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência Axioplan Zeiss, equipado com lâmpada a vapor de mercúrio (HBO 100W).

3.6) Quantificação da proteína NGF:

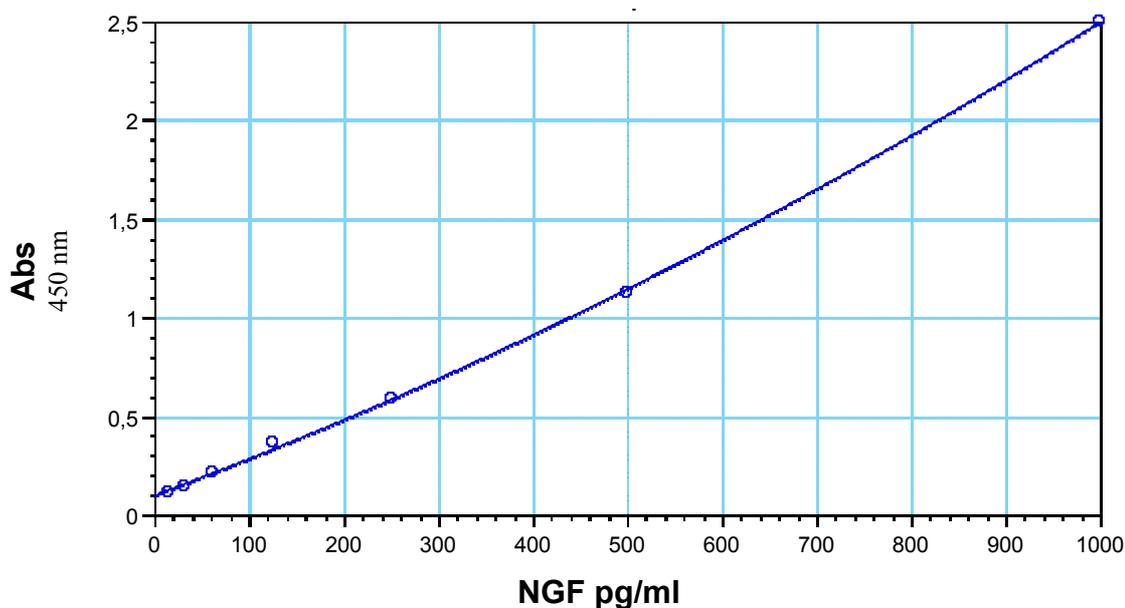
Glândulas salivares submandibulares e amostras de átrio e ventrículo direito foram imediatamente congeladas em gelo seco e estocadas à -80°C até processamento. Para a extração da proteína, as amostras foram trituradas em tampão de lise contendo: Tris HCl à 20mM, NaCl à 137mM (pH 8,0); NP40 à 15%, glicerol à 10%, Aprotinina A 1mM, EDTA 10mM, E-64 10mM e vanadato de sódio 0,5mM para inibição de proteases e fosfatases. A homogeneização foi feita através de ultra-som por aproximadamente 60 segundos à 4°C . O produto da lise foi centrifugado à 1200 rpm por 20 minutos à 4°C sendo o sobrenadante, então, coletado e estocado à -80°C até o momento das dosagens.

Os níveis teciduais de NGF foram obtidos através de ELISA sanduíche, utilizando-se o kit DuoSet (R&D, Minneapolis USA) para quantificação de β -NGF solúvel de rato e a metodologia proposta por BENNET et al., 1999.

Foram utilizadas placas MaxiSorp Nunc (Nalge Nunc International, Dinamarca) para dosagens dos níveis de NGF. A sensibilização da placa pelo anticorpo de captura anti-NGF de rato obtido em cabra na concentração de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ diluído em tampão fosfato salina estéril (PBS) pH 7,2-7,4 se deu por uma noite. Após a lavagem da placa por 3 vezes com solução de lavagem contendo PBS (pH 7,2-7,4) adicionada de Tween 20 à 0,005%, foi aplicada a solução de bloqueio de sítios inespecíficos (PBS/BSA 1%, azida sódica 0,05%, e sacarose 5%) por no mínimo 1 h. Após bloqueio, foram adicionadas as amostras obtidas de cada órgão diluídas na proporção de 1:4 em PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA). As amostras foram incubadas em duplicata durante 2h. Após lavagem, o anticorpo de detecção foi adicionado na proporção de 100 ng/ml em solução de PBS/BSA a 1% e incubado por 2 h. Lavou-se novamente a placa três vezes e então aplicou-se a

solução de Streptavidina conjugada com biotina diluída na proporção de 1:200 em solução de PBS/BSA 1% durante 20 minutos no escuro. Finalmente, a placa foi novamente lavada três vezes e para a revelação, aplicou-se a solução de substrato (peróxido de hidrogênio) na proporção de 1:1, com reagente tetrametilbenzidina por 20 minutos para a revelação. O bloqueio da reação foi feito com solução de ácido sulfúrico 2 N e a leitura feita com absorvância de 450 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices). As concentrações teciduais de NGF foram expressas em pg/mg de proteína total. Essas foram quantificadas pelo método de BRADFORD et al. (1976). O padrão da curva de calibração foi obtido através de diluições seriadas de 1:2. Para cada placa foi obtida curva de calibração, com limite máximo de detecção de 1000 pg/ml.

Gráfico 1: Curva de Calibração para ELISA (NGF)



3.7) Análise estatística:

Para comparar os níveis de NGF dos diferentes grupos foram realizados testes de normalidade (Barllets para variância) e análises baseadas no programa ANOVA seguidos de teste t de *Student*, para comparação entre as médias através do programa GraphPad Software Prism, versão 3.0. Em todos os testes estatísticos, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05.

3.8) Documentação Fotográfica:

Para a documentação fotográfica utilizou-se microscópio Axioplan-2 com programa KS400-3.0 da Zeiss equipado com lâmpada de mercúrio HBO de 100W para a captação de imagens e impressão em papel de qualidade fotográfica.

4) RESULTADOS:

4.1) Inervação simpática do coração e da glândula salivar submandibular:

No coração de ratos controles tratados com os veículos de bosentan e 6-OHDA, o parênquima de átrios e ventrículos apresentou-se rico em terminações nervosas varicosas fluorescentes regularmente distribuídas. A inervação vascular (arteríolas) também foi observada, constatando-se presença de troncos nervosos (FIG. 1A). Vinte e quatro horas e três dias após o tratamento com 6-OHDA, átrios e ventrículos encontraram-se totalmente desprovidos de terminações nervosas noradrenérgicas e mesmo de troncos nervosos (FIG. 1B). No átrio, após sete dias de tratamento com 6-OHDA, a maioria dos animais simpatectomizados ainda não apresentavam indícios de regeneração de fibras simpáticas. Em alguns animais, verificou-se o início do processo de regeneração pela presença de fibras nervosas simpáticas perivascularres (FIG. 1C). Nos ventrículos de ratos simpatectomizados não foram observadas fibras nervosas simpáticas em nenhum dos períodos testados. O tratamento com bosentan ou seu veículo não provocou alterações nos padrões de inervação ou desnervação acima descritos.

Nas glândulas salivares submandibulares de todos ratos não simpatectomizados (tratados com o veículo antioxidante da 6-OHDA ou bosentan) notou-se a inervação vascular e terminações nervosas varicosas ao redor de adenômeros e ductos intralobulares. Troncos nervosos perivascularres também foram observados (FIG. 2A). Vinte e quatro horas após o tratamento com 6-OHDA, houve total desaparecimento da inervação parenquimatosa (FIG. 2B). A recuperação da inervação noradrenérgica glandular ocorreu de maneira acelerada em relação à dos átrios, pois três dias após a simpatectomia química, o parênquima glandular apresentou raros troncos vasculares fluorescentes e poucas terminações nervosas

FIGURA 1

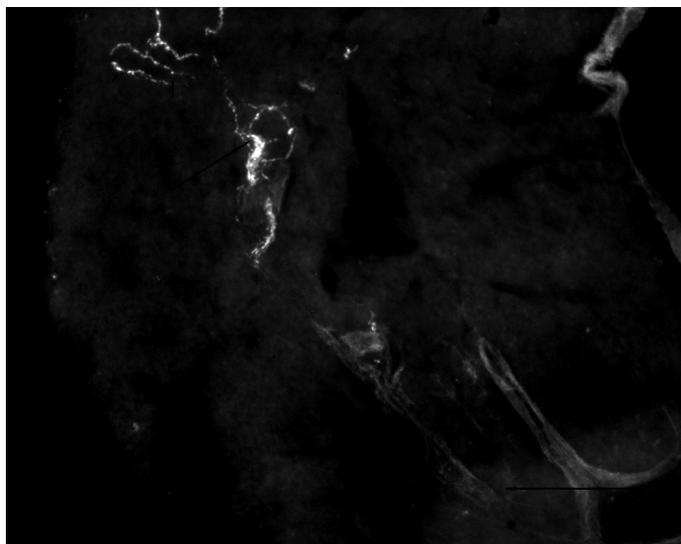
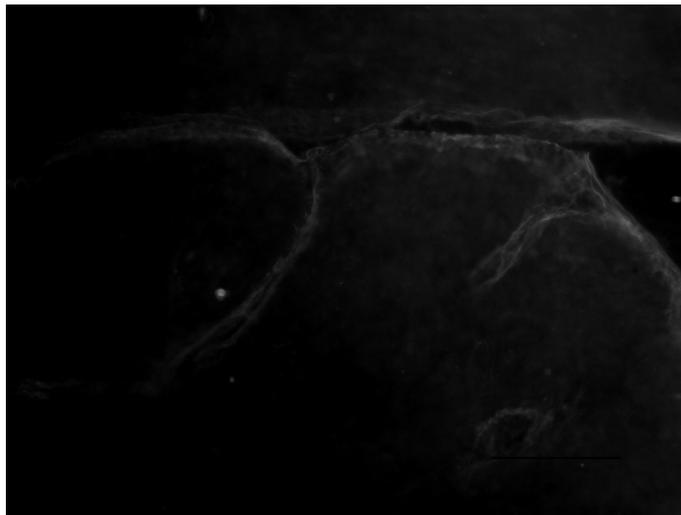
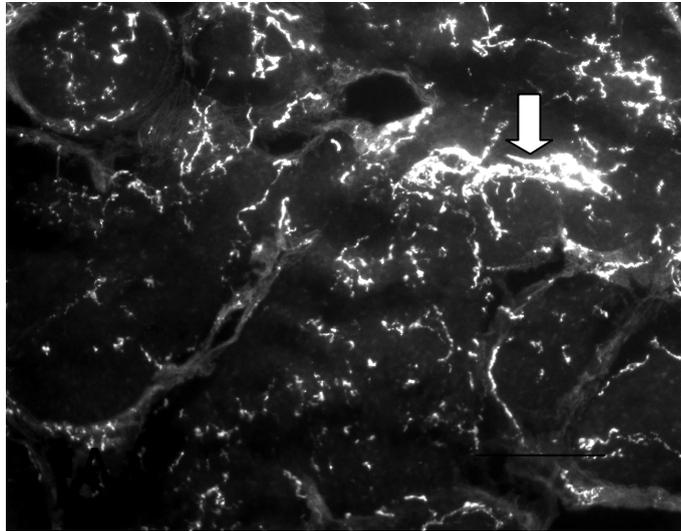


FIGURA 1

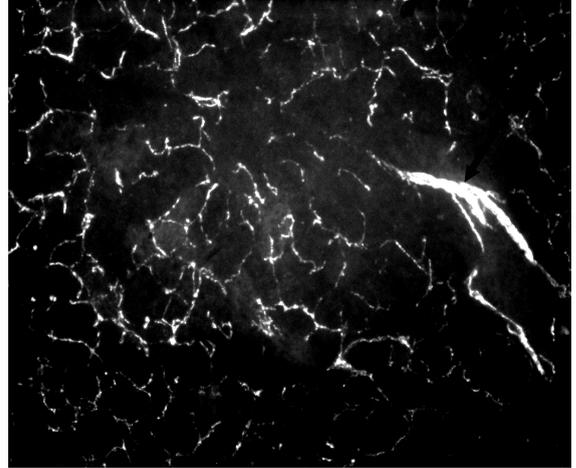
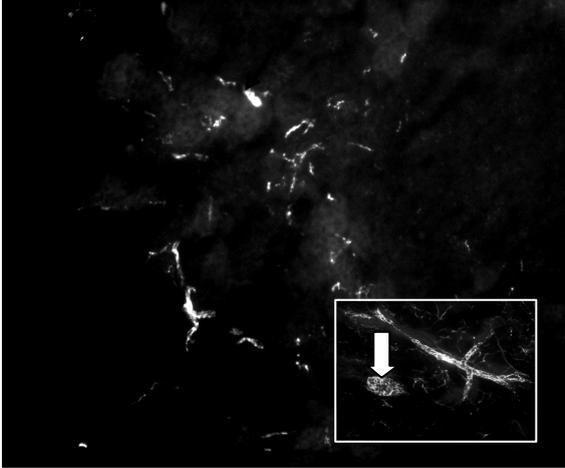
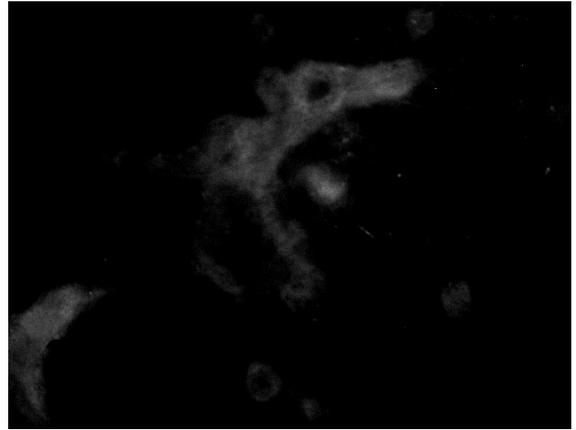
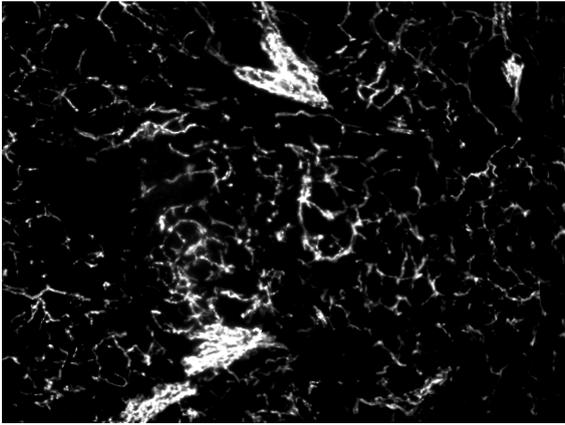
Fotomicrografias de secções de átrios de ratos controle ou simpatectomizado, tratados ou não com bosentan. Técnica de fluorescência induzida pelo ácido glioxílico para demonstração de catecolaminas (Barra 100 µm)

1A- Rato controle tratado com veículos (de 6-OHDA e de bosentan). Observa-se parênquima ricamente innervado por terminações nervosas noradrenérgicas. A seta indica inervação vascular e troncos perivasculares.

1B- Rato simpatectomizado sacrificado 3 dias após o tratamento com 6-OHDA. Nota-se total ausência de fibras noradrenérgicas parenquimatosas e vasculares.

1C- Rato simpatectomizado e tratado com bosentan, sacrificado 7 dias após o tratamento com 6-OHDA. A seta indica tronco vascular. Algumas terminações nervosas varicosas também são vistas (cabeças de setas).

FIGURA 2



2C

FIGURA 2

Fotomicrografias de secções de glândulas salivares submandibulares de ratos controles ou simpatectomizados. Técnica de fluorescência induzida pelo ácido glioxílico para catecolaminas (Barra 100 µm)

2A- Rato controle tratado com veículos (de 6-OHDA e bosentan). Nota-se a nítida presença de troncos vasculares (setas) e terminações parenquimatosas que envolvem adenômeros e ductos.

2B- Rato simpatectomizado sacrificado após 24 horas de tratamento com 6-OHDA. Nota-se completa desnervação parenquimatosa e vascular.

2C- Rato simpatectomizado 3 dias após o tratamento com 6-OHDA. Vêem-se algumas terminações nervosas varicosas e troncos nervosos próximo à vasos sanguíneos (setas). No detalhe (retângulo) destaca-se arteríola inervada e filete de fibras nervosas.

2D- Rato simpatectomizado tratado com bosentan sacrificado 7 dias após o tratamento com 6-OHDA. Nota-se parênquima glandular semelhante à animais controles com presença de tronco perivascular (seta).

parenquimatosas (FIG. 2C). Aos sete dias, as glândulas submandibulares apresentavam parênquima semelhante aos de animais controles e/ou tratados com veículos com raras áreas ainda desnervadas (FIG. 2D) O tratamento com bosentan ou seu veículo não alterou o processo de desnervação ou de recuperação de terminações nervosas descritos acima.

4.2) Níveis de NGF no coração:

O tratamento com bosentan não alterou os níveis de NGF em átrios e ventrículos de ratos controles (não simpatectomizados). Três dias após o tratamento com 6-OHDA, não houve diferenças significativas nos níveis de NFG entre os diferentes grupos tanto nos átrios quanto nos ventrículos (GRÁF. 2 A e B).

Sete dias após simpatectomia por 6-OHDA, os níveis de NGF nos átrios de animais isogênicos tratados com veículo, apresentaram-se significativamente aumentados em relação a ratos controles tratados apenas com o veículo ou bosentan (GRÁF. 3A). O tratamento com bosentan em ratos simpatectomizados bloqueou a elevação dos níveis de NGF atriais, induzida pelo tratamento com 6-OHDA. Já nos ventrículos de ratos simpatectomizados, não foi detectado aumento nos níveis de NGF quer em relação aos controles ou ao grupo simpatectomizado tratado com bosentan (GRÁF. 3B)

Em ratos não isogênicos, o grupo submetido ao tratamento com 6-OHDA e tratados com bosentan apresentou diminuição significativa na concentração atrial de NGF em relação à ratos simpatectomizados tratados com veículo, 7 dias após a simpatectomia química (GRÁF. 4A). Nos ventrículos não houve diferenças significativas dos níveis de NGF entre os diferentes grupos analisados (GRÁF. 4B).

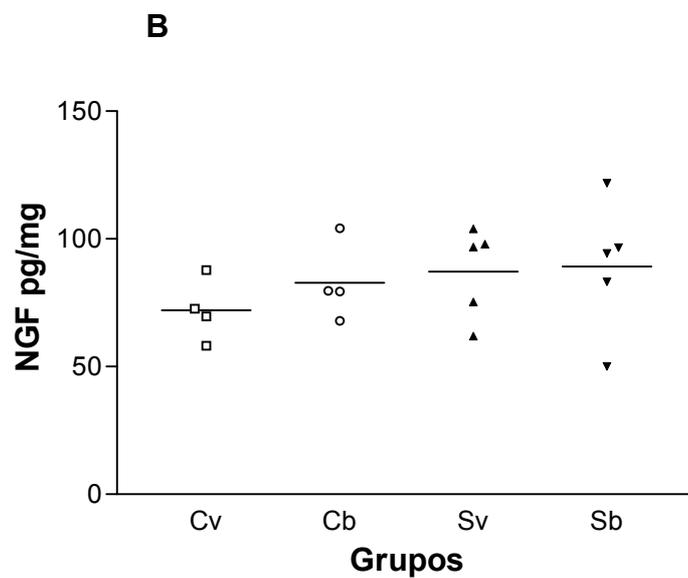
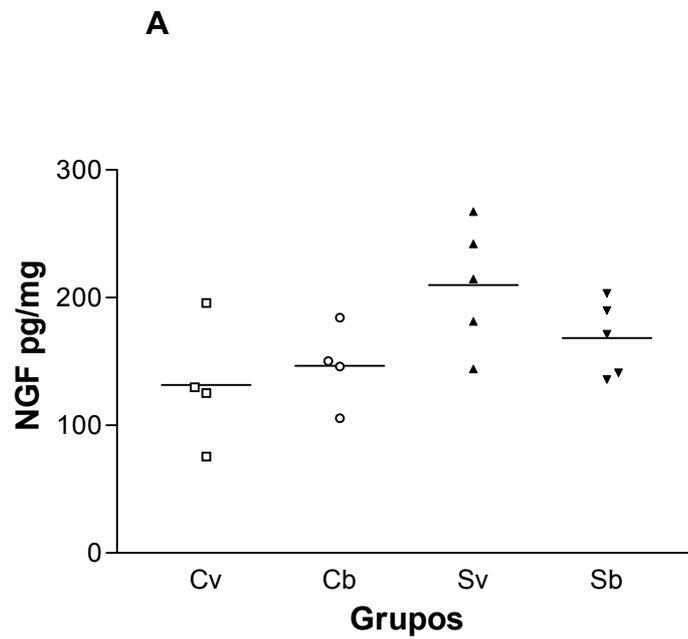


GRÁFICO 2- Níveis de NGF em átrios (A) e ventrículos (B) nos diferentes grupos de ratos isogênicos, 3 dias após a simpatectomia por 6-OHDA. Grupos controles (C) e simpatectomizados (S) foram tratados com veículos (Cv e Sv) ou bosentan (Cb e Sb). Todos os animais controles receberam ácido ascórbico a 1% em salina a 0,9% (veículo da 6-OHDA). $p > 0,05$ (ANOVA seguido de teste t de *Student*). Média representada pela linha horizontal em cada coluna.

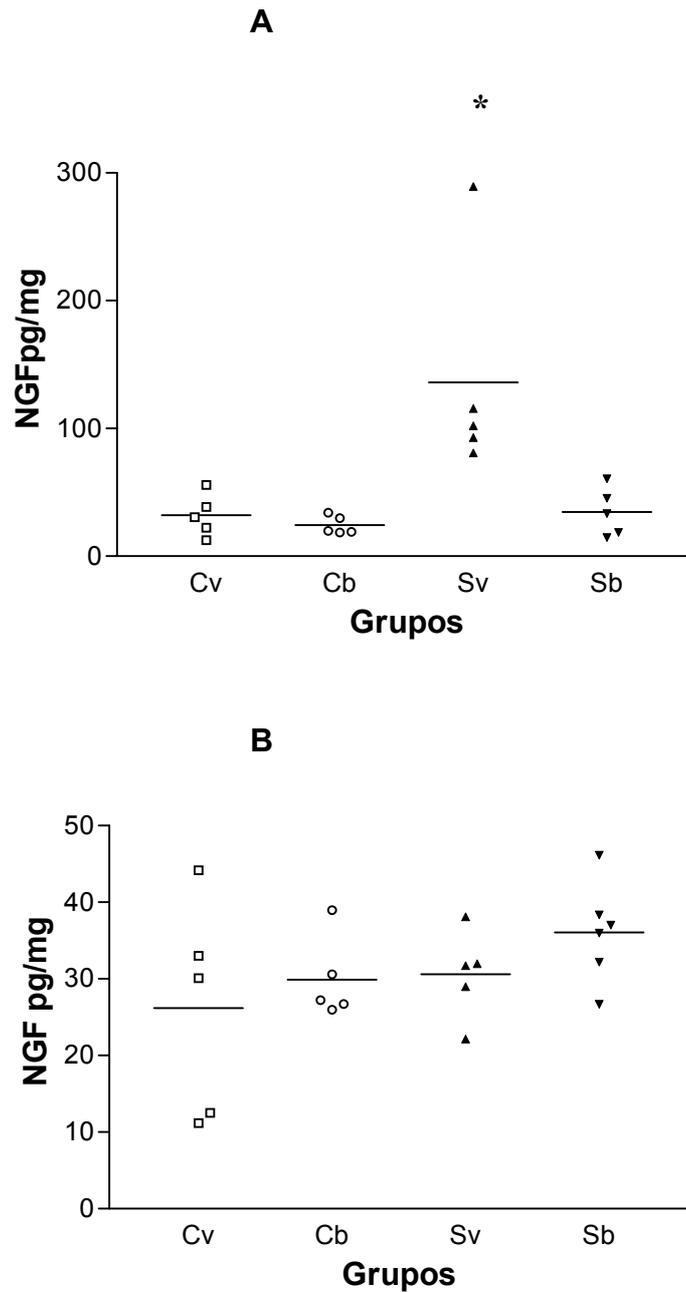


GRÁFICO 3- Níveis de NGF em átrios (A) e ventrículos (B) nos diferentes grupos de ratos isogênicos, 7 dias após a simpatectomia por 6-OHDA. Grupos controles (C) e simpatectomizados (S) foram tratados com veículos (Cv e Sv) ou bosentan (Cb e Sb). Todos os animais controles receberam ácido ascórbico a 1% em salina a 0,9% (veículo da 6-OHDA). * $p < 0,05$ (ANOVA seguido de teste t de *Student*) em comparação com os demais grupos. Médias representadas pela linha horizontal.

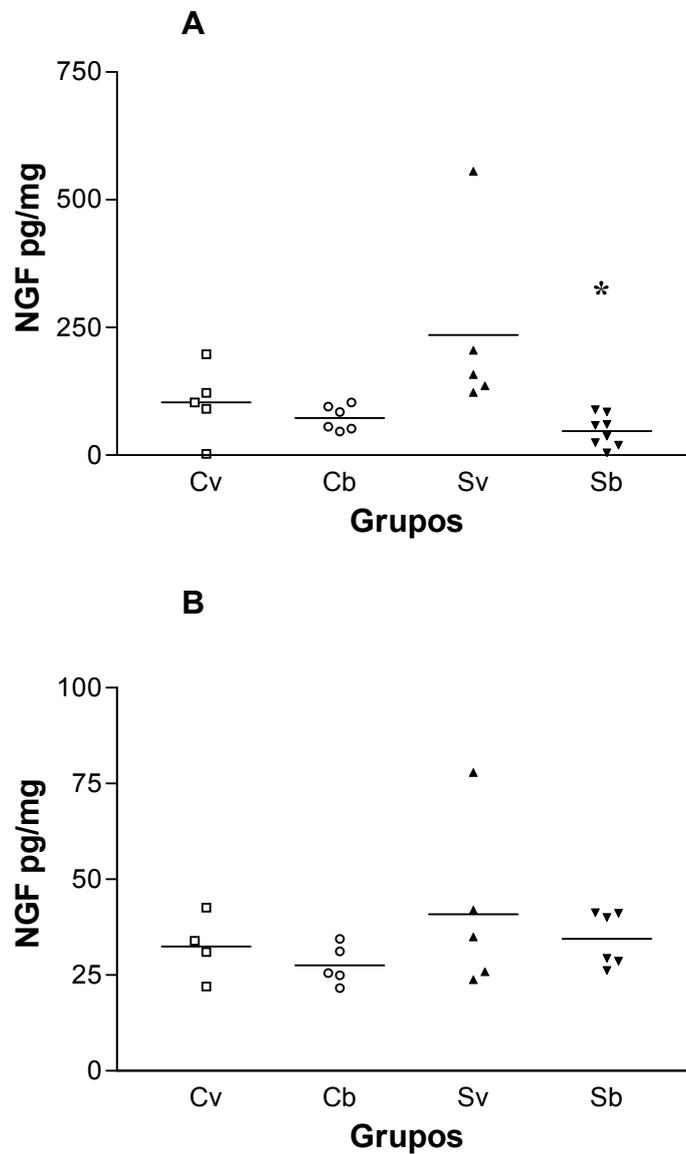


GRÁFICO 4- Níveis de NGF em átrios (A) e ventrículos (B) nos diferentes grupos de ratos não isogênicos, 7 dias após a simpatectomia por 6-OHDA. Grupos: controles (C) e simpatectomizados (S) tratados com veículos (Cv e Sv) ou bosentan (Cb e Sb). Todos os animais controles receberam ácido ascórbico a 1% em salina a 0,9% (veículo da 6-OHDA). * $p < 0,05$ (ANOVA seguido de teste t de Student) em relação ao grupo simpatectomizado tratado com veículo (Sv). Linhas horizontais representam as médias.

4.3) Níveis de NGF em glândulas submandibulares

Nas glândulas submandibulares de ratos isogênicos, os níveis de NGF não sofreram alterações significativas nos diferentes grupos quer aos 3 dias (GRÁF. 5A), quer aos 7 dias (GRÁF. 5B) após a simpatectomia. No entanto aos 3 dias, em glândulas submandibulares de ratos controles tratados com bosentan, não se detectou NGF com a técnica utilizada. Em 3 dos 5 animais simpatectomizados e tratados com bosentan os níveis também mantiveram-se não detectáveis. Esse quadro não se repetiu aos 7 dias.

Em animais não isogênicos, o NGF glandular foi dosado somente aos 7 dias. Não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos analisados (GRÁF. 6) e em todas as glândulas os níveis de NGF estavam dentro dos limites de detecção da técnica.

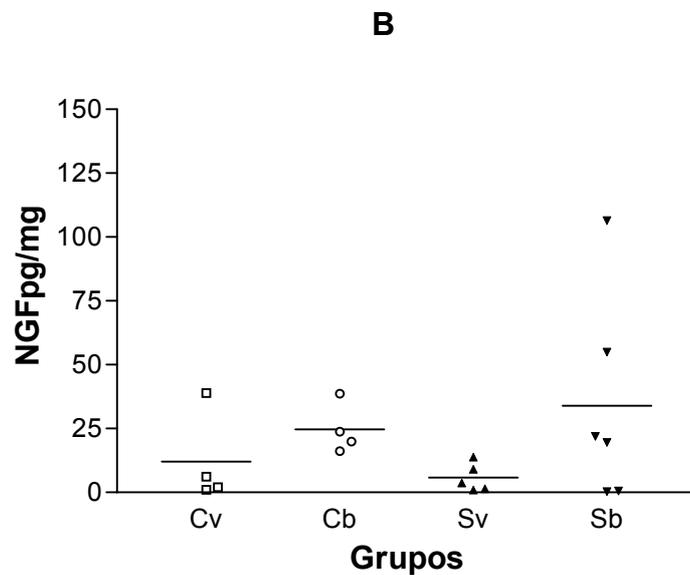
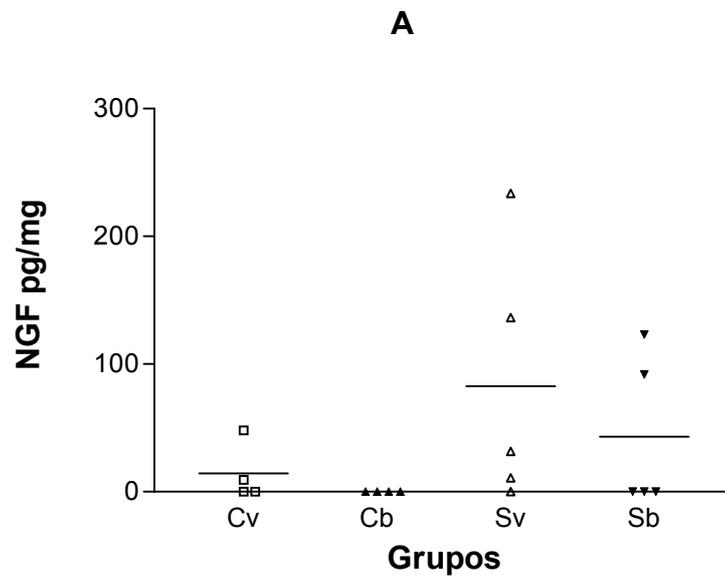


GRÁFICO 5- Níveis de NGF em glândulas salivares submandibulares nos diferentes grupos de ratos isogênicos 3 dias (A) e 7 dias (B) após a simpatectomia por 6-OHDA. Grupos controles (C) e simpatectomizados (S) tratados com veículos (Cv e Sv) ou bosentan (Cb e Sb). Todos os animais controles receberam ácido ascórbico a 1% em salina a 0,9% (veículo da 6-OHDA). $p > 0,05$ (ANOVA seguido de teste t de *Student*) entre os diferentes grupos. Linhas horizontais representam médias.

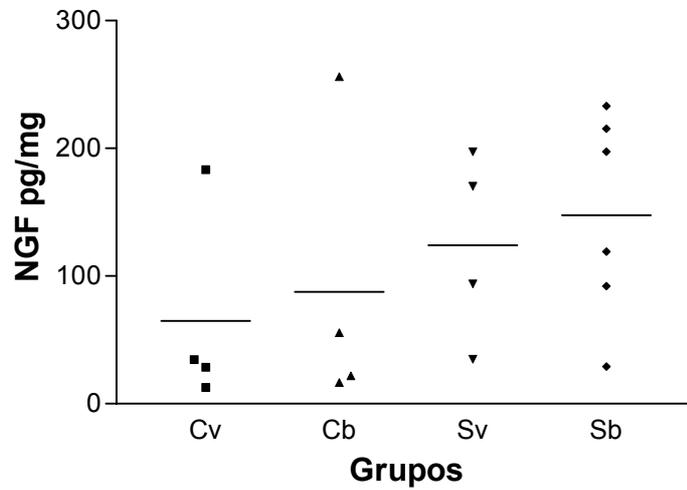


GRÁFICO 6- Níveis de NGF em glândulas salivares submandibulares nos diferentes grupos de ratos não isogênicos, 7 dias após a simpatectomia por 6-OHDA. Grupos controles (C) e simpatectomizados (S) tratados com veículos (Cv e Sv) ou bosentan (Cb e Sb). Todos os animais controles receberam ácido ascórbico a 1% em salina a 0,9% (veículo da 6-OHDA). $p > 0,05$ (ANOVA seguido de teste t de *Student*) entre os diferentes grupos. Linhas horizontais representam as médias.

5) DISCUSSÃO:

No presente trabalho, buscamos testar o envolvimento de endotelinas sobre a expressão de NGF no coração e glândulas salivares submandibulares de ratos, dois órgãos ricamente inervados por fibras nervosas noradrenérgicas (revisões em GARRET, 1987; TUNE, 2004; GLEBOVA & GINTY, 2004). Para isso, utilizamos dois procedimentos: a simpatectomia química com 6-OHDA e o tratamento com antagonista dual de receptores ET-A e ET-B de endotelinas.

Vários autores já descreveram a ação rápida e intensa da 6-OHDA sobre o coração, gerando perda total de fibras e terminações nervosas noradrenérgicas (MALFORMS, 1971; JONSSON & SACHS, 1974; LOREZ et al., 1975), seguida de recuperação após 2 meses (JONSSON & SACHS, 1970, 1974; DE CHAMPLAIN (1971). Em nosso estudo, a presença ou ausência de fibras nervosas noradrenérgicas cardíacas e glandulares pôde ser analisada através da técnica de fluorescência induzida pelo ácido glicoxílico, com alta sensibilidade e especificidade para catecolaminas, preconizada por DE LA TORRE (1980), modificado por COTTLE et al. (1995). Após 24 horas e 3 dias de tratamento com 6-OHDA, foi observada total ausência de fibras simpáticas noradrenérgicas em átrios e ventrículos. Sete dias após o tratamento, a maioria dos animais simpatectomizados e/ou tratados com bosentan não apresentou sinais de regeneração de fibras simpáticas. Em alguns animais simpatectomizados, tratados ou não com bosentan, raras áreas apresentaram início da regeneração pela presença de troncos nervosos simpáticos e poucas terminações nervosas. Nossos dados comprovam os obtidos por MARTINELLI et al., (2002), usando-se a mesma dose de 6-OHDA e ratos de

mesma idade. Neste estudo, a recuperação de fibras simpáticas parenquimatosas apresentou cinética diferente em átrios e ventrículos. O início da regeneração ventricular só foi observado 1 mês após o tratamento e sua regeneração completa foi observada após 2 meses. O atraso na recuperação da inervação ventricular em relação à atrial foi também verificado por BJERRE et al., (1974) em camundongos tratados com 6-OHDA, sendo a cinética de recuperação acompanhada até dois meses após a simpatectomia. Esse atraso na recuperação de fibras nervosas simpáticas poderia ser explicado, em parte, pelo fato da inervação simpática chegar primeiro aos átrios. A inervação simpática de ambas regiões provem principalmente do gânglio estrelado e do gânglio cervical superior (PARDINI et al., 1990; GLEBOVA & GINTY, 2005). Apesar de utilizarem doses diferentes de 6-OHDA (2 doses de 68 mg/Kg), para LOREZ et al. (1975), em ratos adultos não há regeneração total das fibras nervosas noradrenérgicas no átrio mesmo 205 dias após o tratamento.

A demora na recuperação da inervação simpática parece não ser de todo prejudicial para a função cardíaca, já que segundo VO & TOMLISON (1999) essas são normalmente reassumidas mesmo com recuperação incompleta de terminações nervosas, após simpatectomia química pela 6-OHDA.

BJERRE et al. (1974) também analisou os efeitos da 6-OHDA sobre a inervação noradrenérgica das glândulas salivares submandibulares de camundongos através de método de fluorescência induzida por gás formaldeído para noradrenalina endógena. Após 24h de tratamento, a percentagem de fibras nervosas parenquimatosas apresentou-se significativamente reduzidas em relação a camundongos controles. Três semanas após o tratamento, os ratos simpatectomizados já apresentavam total recuperação da inervação noradrenérgica parenquimatosa, com raros axônios pré-terminais vistos ao longo de vasos e ductos

5 dias após o tratamento com 6-OHDA. Nossos achados confirmam a rápida recuperação da inervação simpática na glândula submandibular, já que 3 dias após a simpatectomia química, a glândula apresentou poucas fibras fluorescentes e, aos 7 dias, a inervação parenquimatosa já era bastante semelhante à de animais controle, com poucas áreas ainda desnervadas. De fato, a inervação da glândula submandibular provêm principalmente do gânglio cervical superior que se coloca bem próximo à glândula (GLEBOVA & GINTY, 2005). Isso poderia talvez explicar a reinervação parenquimatosa noradrenérgica acelerada neste órgão em comparação com o coração.

A quantificação de NGF por ELISA em coração de ratos isogênicos demonstrou aumento significativo dos níveis atriais, sete dias após simpatectomia química. No grupo não isogênico ocorreu tendência ao aumento de NGF em ratos simpatectomizados tratados com veículo em relação aos outros grupos. Não constatamos diferenças nos níveis ventriculares de NGF entre os diferentes grupos, três e sete dias após simpatectomia, nem mesmo comparando ratos controles com simpatectomizados. Os níveis de NGF encontrados nos átrios foram mais elevados em relação aos ventrículos, confirmando também dados já observados em nosso laboratório. Em dados ainda não publicados, MARTINELLI et al. (2001) observaram que os níveis de NGF ventriculares apresentaram aumento significativo um mês após simpatectomia pela 6-OHDA.

Neste presente trabalho utilizamos o antagonista de receptores ET-A e ET-B em ratos submetidos ou não ao tratamento com 6-OHDA ou veículos, para dosagem dos níveis de NGF no coração e glândulas salivares submandibulares. Nesta última estrutura, ainda não existem estudos que comprovem a existência de receptores

para endotelinas. Porém, citam-se ductos contorcidos granulados como produtores de endotelinas (revisão em GRESIK et al., 1996)

O tratamento com bosentan impediu a elevação dos níveis atriais de NGF induzida pela simpatectomia, tanto em ratos isogênicos quanto em ratos não isogênicos. Portanto, nossos dados indicam participação de receptores ET-A e ET-B de endotelinas na expressão de NGF pelo tecido atrial. IEDA et al. (2004) demonstraram que a utilização de antagonista de receptor ET-A (BQ 123) e antagonista dual de receptores ET-A e ET-B (TAK044), gerou diminuição significativa do NGF por cardiomiócitos *in vitro*, após pré-tratamento do meio por 2 horas e posteriormente com ET-1. Nesse estudo, o uso dos antagonistas causou diminuição significativa dos níveis de NGF expressos pelos cardiomiócitos em relação à cardiomiócitos controles tratados apenas com ET-1. Neste estudo, os autores propõe que ET-1 atua na expressão de NGF principalmente via receptores ET-A e $G_i\beta\gamma$. Por outro lado, MOCHETTI et al., 1989 demonstraram que a via cAMP-PKA está envolvida no aumento de NGF em astrocitomas mediado por β -adrenoreceptores.

Em nenhum dos períodos e grupos analisados, observamos diferenças significativas nos níveis de NGF nas glândulas submandibulares. Em alguns animais tratados com bosentan, os níveis de NGF não foram detectados principalmente 3 dias após a simpatectomia química. Assim, pode-se especular que, na glândula, se houver papel exercido por ET, este pode ser fugaz. Além disso, há a possibilidade de secreção endócrina ou parácrina de NGF armazenado nos ductos granulados induzida pela lesão neuronal, o que poderia diminuir a necessidade de síntese do fator.

Durante a realização deste trabalho, iniciamos estudos para a identificação de células sintetizadoras de NGF no coração e em glândula submandibular. Constatamos imunorreatividade para NGF em cardiomiócitos e nos ductos contorcidos granuloso e mastócitos das glândulas submandibulares, não existindo diferenças significativas entre os diferentes grupos. A localização imunohistoquímica de NGF em células dos ductos granuloso e mastócitos da glândula submandibular já havia sido assinalada por nosso grupo (PAPARIDIS, 2005). Resta verificar se a imunorreatividade na glândula submandibular sofre alteração algumas horas após a simpatectomia.

O tratamento com bosentan não impediu o aparecimento dos primeiros sinais de reinervação atrial aos 7 dias após a simpatectomia. Em estudos anteriores verificamos que o GDNF é produzido por cardiomiócitos e seus níveis aumentam após a simpatectomia química (MARTINELLI et al., 2002). É possível que a elevação dos níveis de GDNF compensem de alguma forma o bloqueio da síntese de NGF induzido pelo bosentan. Este aspecto será objeto de investigação futura.

Nossos dados, até agora obtidos, sugerem papel relevante de ET na fase inicial da regeneração de terminações simpáticas do coração, 7 dias após a simpatectomia. Entretanto, novos estudos complementares deverão ser realizados em outros períodos após a simpatectomia para desvendar mais detalhes sobre a cinética de recuperação da inervação noradrenérgica e da expressão de NGF em ventrículos (20 e 30 dias após simpatectomia) e em glândulas submandibulares (12 e 24 horas após a simpatectomia).

6) CONCLUSÕES:

- 1- Após a simpatectomia química, a recuperação da inervação simpática ocorre rapidamente (uma semana) em glândulas submandibulares, não tendo sido possível detectar alteração significativa dos níveis glandulares de NGF.
- 2- No coração, a recuperação das terminações nervosas atriais é mais lenta em relação ao observado na glândula submandibular, sendo possível verificar elevação dos níveis de NGF aos 7 dias após a simpatectomia química em ratos isogênicos.
- 3- Nos ventrículos que continuam totalmente desnervados 7 dias após a simpatectomia química, não foi possível detectar alteração nos níveis de NGF.
- 4- O uso de bosentan, antagonista dos receptores ET-A e ET-B de endotelinas, inibiu a elevação dos níveis de NGF atriais tanto em ratos isogênicos como em não isogênicos, indicando papel de endotelinas através de seus receptores, no controle da síntese de NGF no início da regeneração axonal após simpatectomia.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ACHESON, A. & LINDSAY, R.M. 1996. Non-target-derived roles of the neurotrophins. *Philos. Trans. Biol. Sci.*, **351**: 417-422.
- AIRAKSTEIN, M.S.; SAARMA, M. 2002. The GDNF Family: Signaling, biological functions and therapeutic value. *Nature Rev. Neurosc.* **3** 383-394.
- ALOE, L. 1999. Rita Levi-Montalcini: A brief biographic view of past and present studies on nerve growth factor. *Micr .Res.Tech.*, **45**: 207-209.
- ALOE, L. 2004. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol.*, **14**: 395-399.
- ANAND, P.; TERENCE, G.; BIRCH, R.; WELLMER, A.; CEBARDAUM, J.M.; LINDSAY, R.M.; WILANS-CHESNUT, R.E.; SINCROPI, D.V. 1997. Endogenous NGF and CTNF levels in human peripheral nerve injury. *Neuroreport*, **8**: 1935-1938
- ANGELETTI, P.U; LEVI-MONTALCINI, R. 1970. Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **65**: 114-121.
- BARBACID, M. 1995. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**: 148-155.
- BARDE, Y.A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *J. EMBO*, **1**: 549-553.

- BARTON, M.; d'USCIO, L.V.; SHAW, S.; MUNTER, J.; LUSCHER T.F. 1998. ETA receptor blockage prevents increased tissue endothelin-1 vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, **31**: 499-504.
- BENNET, A.D; TAGLIALATELA, G.; PEREZ-POLO, R.; HULSEBOSCH, C.E. 1999. NGF levels decrease in the spinal cord and dorsal root ganglion after spinal hemisection. *Neuroreport*, **10**: 889-893.
- BERGER, R.; PACHER, R. 2003. The role of the endothelin system in myocardial infarction-new therapeutic targets, *Eur. Heart J.* **24**: 294-6.
- BERKEMEIER, L.R.; WINSLOW, J.W.; KAPLAN, D.R.; NIKOLIES, K.; GOEDEL, D. V.; ROSENTHAL, A. 1991. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trkA and trkB. *Neuron* **7**: 857-866.
- BIBEL, M. & BARDE Y. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Develop.*, **14**: 2919-2937.
- BJERRE, B. O.; BJORKLUND, A.; EDWARDS, C. 1974. Axonal regeneration of peripheral adrenergic neurons: effects of antiserum to nerve growth factor in mouse. *Cell Tiss. Res.*, **148**: 441:476.
- BLOTTNER, D & BAUMGARTEN, H.G. 1994. Neurotrophin and regeneration in vivo. *Acta Anat.*, **150**: 235-245.
- BONINI, S.; LAMBIASE, A.; BONINI, S.; LEVI-SCHAFFER, F.; ALOE, L. 1999. Nerve growth: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodeling. *Arch. Allergy Immunol.*, **118**: 159-162.
- BORGESON, D.D.; GRANTHAM, A.; WILLIAMSON, E.E. 1998. Chronic oral endothelin type A receptor antagonism in experimental heart failure. *Hypertension*, **31**:766-770.

- BOYD, J.G.; GORDON, T. 2003. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury, *Mol. Neurobiol.*, **27**:277-323.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- BRECKNEL, J.E.; FAWCET, J.W. 1996. Axonal regeneration. *Biol. Ver.*, **71**:227-255
- CAROLEO ,M.; COSTA, N.; BRACCI-LAUDIERO, L.; ALOE,L. 2001
Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS over expression NGF and NGF receptors. *J. Neuroimmunol.*, **113**: 193-201.
- CHAO, V.M. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nature Rev.*, **4**:299-309.
- CROCKETT, T.R.; SCOTT, G.A.; MCGOWAN, N.W.A. 2001. Anti-arrhythmic and electrophysiological effects of the endothelin receptor antagonists, BQ-123 and PD 191721. *Eur. J. Pharm.*, **432**:71-77.
- DA SILVA, C. 1995. Fatores Neurotróficos: estrutura, funções e aplicações clínicas. *Atual. Neuroc.*, **1**: 1-19.
- EHINGER, B; FALCK, B; PERSSON, H. SPORRONG, B. 1968. Adrenergic and cholinesterase containing neurons of the heart. *Histochemie*, **16**: 197-205.
- FENRICH, K; GORDON, T. Axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems; current, issues and advances. *Can.J.Neurol. Sci*, 2004; 31:142-156.
- FRISÉN, J. 1997. Determinants of axonal regeneration. *Histol. Histopathol.*,**12**: 857-868.

- FUNAKOSHI, H.; FRISEN, J.; BARBANY, G.; TIMMUSKY, T.; ZACHRISSON, O.; VERGE, V.M.K.; PERSSON, H. 1993. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of sciatic nerve. *J. Cell Biol.*, **123**:455-465
- FURUKAWA, Y.; FURUKAWA, S.; SATOYOSHI, E.; HAYASHI, K. 1984 Nerve growth factor secreted by mouse rat cells in culture. *J.Biol. Chem.*, **259**: 1259-1264.
- GARGANO, N; LEDVI, A.; ALEMA, S. 1997. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and trkA receptors. *J. Neurosci.Res.*, **50**: 1-12.
- GARRET, J R.1987. The proper role of nerves in salivary secretion: *Rev. J. Dent. Res.*, **66**: 387-397.
- GIANESSI, D.; DEL R. S.; VITALE R.L. 2001. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol. Res.* **43**: 111:126.
- GLEBOVA N.O.; GINTY D.D. 2004. Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation In Vivo. *J. Neurosc.*, **24**: 743-751.
- GLOSTER, A. & DIAMOND, J. 1995. NGF-dependent and NGF-independent recovery of sympathetic function after chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine. *J. Comp. Neurol.*, **359**:586:594.
- GONON, A.T; ERBAS D.; BROISERSEN, A.; VALEN, G.; DERNOW, J. 2004. Nitric oxide mediates protective effect of endothelin receptor antagonism during myocardial ischemia and reperfusion. *AJP- Heart Circulat. Phisiol.* **286**:1767-1774.

- GOTZ R.; KOSTER R.; WINKLER, C.; RAULF, E.; LOTTSPREICH, F.; SCHARTL, M.; THOENEN, H. 1994. Neurotrophin-6 is a new member of the neurotrophin family. *Nature* **372**: 266-269
- GRESIK, E.W.; HOSOI, K.; KURIHARA, K.; MARUYAMA, S.; UEHA, T. 1996. The Rodent granular convoluted tubule cell - an update. *Eur. J. Morph*, **34**:221-224.
- HALEGOUA, S; ARMSTRONG, R.C.; FREMER, N.E. 1991. Dissecting the mode of action of neuronal growth factor. In: BOYHWELL, M. ed. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **165**:119-170.
- HAMADA, A., WATANABE, N., OHTORNO, H., MATSUDA, H. 1996. Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Brit J. Hematol.*, **93**: 299-302.
- HANCOCK, J.C.; HOOVER, D.B.; HOUGLAND, M.W. 1987. Distribution of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in the rat heart. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **19**: 59-65.
- HEARN, J. C.; MURPHY, M.; NEWGREEN. 1998. GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons In Vitro. *Develop.Biol.*, **197**: 93-105.
- HEMPSTEAD, B. L. 2004. Sculpting organ innervation. *J. Clin. Invest.* **113** : 811-813.
- HEUMANN, R.; ILNDHOLM, D.; BANDTLKOW,C.; MEYER, M; RADEKE, M.J.; MISKO,T.P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H. 1987b. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 8735-8739.

- HUMPEL C.; LINDQVIST, E.; OLSON, L.1993. Detection of nerve growth factor mRNA in rodent salivary glands with digoxigenin- and P-labeled Oligonucleotides: Effects of Castration and Sympathectomy. *J. Histochem. Cytochem.*, **41**: 703-708.
- HOUENOU, L.J.; OPPENHEIM, R.W; LI, L; LO, A.C.; PREVETE, D.1996. Regulation of spinal motoneuron survival by GDNF during development and following injury. *Cell Tiss. Res.*, **286**: 219-223.
- IBÁÑEZ, C.F.; 1998. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *TINS*, **21**: 438-444.
- IEDA, M.; FUKUDA, K; HISAKA, Y; KIMURA, K.; KAWAGUCHI, H; FUJITA, J; SHIMODA,K; TAKESHITA, E; OKANO, H; KURIHARA, Y.;KURIHARA, H.; ISHIDA, J.; FUKAMIZU, A.; FEDEROFF H.J.; OGAWA, S. 2004. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J. Clin. Inv.*, **113**: 876-884.
- IGLARZ, M.; SILVESTRE, J.S.; DURIEZ, M.; HENRION, D.; LEVY, B.I. 2001. chronic blockade of endothelin receptors improves ischemia-induced angiogenesis in rat hindlimbs through activation of vascular endothelial growth factor pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**: 1598-1603.
- JHONSON, E.M; OSBORNE, P.A. TANIUCHI, M. 1989. Destruction of sympathetic and sensory neurons in the developing rat by a monoclonal antibody against the nerve growth factor (NGF) receptor. *Brain Res.*, **478**:166-170.
- JONSSON, G. & SACHS, C. 1970. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **9**: 141-155

- JONSSON, G & SACHS, C. 1974. Histochemical and neurochemical studies on adrenergic nerves regenerated after chemical sympathectomy produced by 6-hydroxydopamine. In: FUGIWARA & TANAKA, eds., *Amine Fluorescence Histochemistry*, C. Igaku Shoiss Ltd, Tokio. pp 67-61.
- JONSSON, G. 1971a. Studies on the uptake and accumulation of 6-hydroxydopamine in adrenergic nerves. IN: MALMFORS, T & THOENEN, H. eds, 6-hydroxydopamine and catecholamine neurons, North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London. pp 243-256
- JONSSON, G. 1971b. Effects of 6-hydroxydopamine on uptake, storage, and subcellular distribution of noradrenaline. In: MALMFORS, T. & THOENEN, H. eds, 6-hydroxydopamine and catecholamine neurons , North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London. pp 87-100.
- KAYE, D.M.; VADDADI, G.; GRUSKIN, S.L.; DU, X.J.; ESLER, M.D. 2000. Reduced myocardial nerve growth factor expression in human experimental heart failure. *Circ. Res.*, **86**: e80-e84.
- KOYAMA, Y.; TSUJIKAWA, K.; MATSUDA, T.; BABA, A. 2003. Endothelin-1 stimulates glial cell line-derived neurotrophic factor expression in cultured rat astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**:1101-1105.
- KOYAMA, Y.; TSUJIKAWA, K.; MATSUDA, T.; BABA, A. 2001. Intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor agonist increases expressions of GDNF and BDNF in rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, **18**: 887-894.
- LAI K.; FU W.Y.; IP F.C.; IP, N.Y. 1998. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol. Cell. Neurosci.*, **11**: 64-76.

- LADIWALA U., LACHANCE, C., SIMONEAU, S.J.J., BHAKAR, A., BARKER, P.A., ANTEL, J.P. 1998. p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: Signaling without cell death in response to NGF. *J. Neurosci.*, **18**: 1297-1304.
- LEE, F.S., KIM, A.H., KHURSIGARA, G. CHAO, M. 2001. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Current Op. Neurobiol.*, **11**: 281-286.
- LEON, A.; BURIANI, A.; DAL TOSO, R.; FABRIS, M.; ROMANELLO, S.; ALOE, L.; LEVI-MONTALCINI, R. 1994. Mast cells synthesize, store and release nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **91**:3739-3743.
- LERMAN, A., FREDRIC, L.; HILDEBRAND, Jr., M.; KENETH B.; MARGULIES; BRIAN O' MURCHU, M.D.; MARK A. PERRELA, M.D.; HEUBLEIN D.M.; SCHWAB, M.D.; BURNETT, Jr., M.D; 1990. Endothelin: A New Cardiovascular Regulatory Peptide. *Mayo Clin. Proc.*, **65**: 1441-1455.
- LEVI-MONTALCINI, R. & HAMBURGER, V.A. 1953. A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, **123**: 233-287.
- LEVI-MONTALCINI, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, **237**:1154-1162.
- LEWIN, G.R. & BARDE, Y.A. 1996. Physiology of neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**: 289-317.

- LINDSAY, R.M.; THOENEN, H; BARDE, Y.A. 1985. Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. *Dev. Biol.*, **122**: 319-328.
- LOREZ, H.P.; JUN, H.; BATHOLIN, G. 1975. Degeneration and regeneration of adrenergic nerves in mesenteric blood vessels, iris and atrium of the rat after 6-hydroxydopamine injection. *J. Neurocytol.*, **4**: 157-176.
- LUSCHER, T.F.; BARTON, M. 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists. Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, **7**: 2-13.
- MALLAT, M; HOULGATTE, R.; BRACHET, P. PROCHIANTZ, A. 1999. Lypopolissacaride-stimulates rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev. Biol.*, **133**: 309-311
- MALMFORS, T.; SACHS, C. 1968. Degeneration of adrenergic nerves produced by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.*, **3**: 89-92.
- MALMFORS, T. 1971. The effects of 6-hydroxydopamine on the adrenergic nerves as revealed by fluorescence histochemical method. In: MALMFORS, T. & THOENEN, H. eds, 6-hydroxydopamine and catecholamine neurons, *North-Holland Publ. Comp.*, Amsterdam-London. pp 47-58.
- MARTINELLI, M.P. 2001. Fatores Neurotróficos no coração de ratos em Condições experimentais indutoras de lesão de terminações simpáticas: Infecção com *Trypanosoma cruzi* e simpatectomia por 6-hidroxidopamina, Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas-UFMG.
- MARTINELLI, P.M., CAMARGOS, E.R.S., MORELL, G., TAVARES, C.A.P., NAGIB, P.R.A., MACHADO, C.R.S. 2002. Rat heart GDNF: Effect of chemical sympathectomy. *Histochem. Cell Biol.*, **118**: 337-343.

- McDONALDS, N.Q.; CHAO, M.V. 1995. Structural determinants of neurotrophin action. *J. Biol. Chem.*, **270**: 19669-19672.
- MENDELL, L.M. 2001. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. *Journ. Physiol.* **533**: 91-97.
- MEYER, M; MATSUOKA, I; WETMORE, C; OLSON, L; THOENEN, H. 1992. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for regulation of BDNF and NGF mRNA. *J. Cell Biol.*, **119**: 45-54.
- MOCHETTI, I. 1989. Regulation of nerve growth factor biosynthesis by beta-adrenergic receptor activation in astrocytoma cells: a potential role of *c-Fos* protein. *Procl. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 3891-3895.
- NOGA, O., ENGLMANN, C., HANF, G., GRUTSKAU, A., SEYBOLD, J., KUNKEL, G. 2003. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergic and non-allergics. *Clin. Exp. Allergy*, **33**: 649-654.
- NYGREN, L.G.; OLSON, L. SEIGER, A. 1971. Regeneration of monoamine-containing axons in the developing and adult spinal cord of the rat following intraspinal 6-OH-dopamine injections or transections. *Histochimie*, **18**:1-15.
- ORDOÑEZ, G.; FERNANDEZ, A.; PEREZ, R.; SOTELO, J. 1994. Low contents of nerve growth factor in serum and submaxillary gland of diabetic mice. *J. Neurol. Science*, **121**:163-166.

OSTROWSKI, R.P.; LIU, T.Y.; CHIANG, S.C.; LIN, Y.K.; CHOU, C.Y.; CHAN, W. L.; LAI, S.T. 2004. The value of plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in predicting the severity and prognosis in patients with congestive heart failure. *J.Chin. Méd. Assoc.* **67**: 222-228.

PAPARIDIS, C.D. 2005. Expressão do fator de crescimento neural na glândula submandibular durante a fase aguda da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas-UFMG.

PATAPUOTIAN, A. & REICHARDT, L.F. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opi. Neurobiol.*, **11**: 272-280

RICH, S; McLAUGHLIN; V.V. 2003. Endothelin Receptor Blockers in Cardiovascular disease. *Circulation*, **108**: 2184-2190

RICHARDSON, P. M.1991. Neurotrophic factors in regeneration. *Curr. Op. Neurob.* **1**:401-406.

RUSH, R.A., CHIE, E., LIU, D., TAFRESHI, A., ZETLER, C., ZOUH, X.F. 1997. Neurotrophic factors are required by mature sympathetic neurons for survival, transmission and connectivity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **24**: 549-555.

SAKURAI-YAMASHITA, Y.; YAMASHITA, K.; YOSHIDA, A.; OBANA, M.; TAKADA, K.; SHIBAGUCHI, H.; SHIGEMATSU, K; NIWA, M.; TANIYAMA, K. 1997a. Rat Peritoneal macrophages express endothelin ET-B but not endothelin ET-A receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **338**:199-203.

SCULLY, J. L.; OTTEN, U.1995. NGF: Not just for neurons. *Cell Biol. Intern.*, **19**: 459-469.

- SHOOTER, E.M. 2001. Early days of the nerve growth factor proteins. *Ann. Rev. Neurosci.*, **24**: 601-29.
- SHELTON, D.L. REICHARDT, L.F.; 1984. Expression of the β - nerve growth factor gene correlates with density of sympathetic innervation in effector organs. *Procl. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**; 7951-7955.
- SILOS-SANTIAGO, I.; GREENLUND, L.J.S.; JOHNSON, E. M.: SNIDER, W.D.. 1995. Molecular genetics of neuronal survival. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**:42-49.
- SOFRONIEW, M.V.; HOWE, C.L.; MOBLEY, W.C. 2001. Nerve Growth Factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Ann. Rev. Neurosc.* **24**:1217-1281.
- SOLOMON, A., ALOE, L., PE'ER, J., FRUCHT-PERY, J., BONINI, S., LEVI-SCHAFFER, F. 1998. Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**: 454-460.
- SUGO, S.; MINAMINO, N.; SHOJI, H.; ISUMI, Y.; NAKAO, K.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. 2001. Regulation of endothelin-1 production in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc Pharmacol.* **38**:156.
- TERENGI, G.1999. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.*, **194**: 1-14.
- THOENEN, H. & BARDE, Y.A. 1980 Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.*, **60**:1284-1335.
- TRANZER, J.P. & RICHARDS, J.G. 1971. Fine structural aspects of the effect of 6-hydroxydopamine on peripheral adrenergic neurons. In: MALFORMS, T. & THOENEN, H eds, 6-hydroxydopamine and catecholamine neurons, NORTH-HOLLAND Publishing Company, Amsterdam-London. pp 257-264

- TUNE, J.D.; GORMAN, M.W.; FEIGL, L. 2004 Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J. Appl. Phys.*, **97**: 404:415.
- VO, P.A & TOMLINSON, D.R. 1999. The regeneration of peripheral noradrenergic nerves after chemical sympathectomy in diabetic rats: effects of nerve growth factor. *Exp. Neurol.*, **157**:127-134.
- WENZEL, R.R.; FLEISH, M.; SHAW, S.; NOLL, G.; KAUFMANN, U.; SCHMITT, R.; JONES CR.; CLOZEL, M.; MEIER, B.; LUSCHER, T.F. 1998. Hemodynamic and coronary effects of endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **98**: 2235-40.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H; KIMURA, S. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411-415.
- ZAHNG, Y.; OLIVER, J.T.; HOROWITZ, J.D. 1994. Endothelin B receptor vasoconstriction induced by endothelin A receptor antagonist. *Cardio. Res.* **39**: 665-673.
- ZOLK, O.; MUNZEL, F.; ESCCHENHAGEN, T. 2004. Effects of chronic endothelin-1 stimulation on cardiac myocyte contractile function. *Am. J. Physiol. Heart. Circ.*, **286**:1248-1257.

ABSTRACT

Neurotrophic factors determine the development and maintenance of different types of neurons, as well as the regeneration of peripheral nerve fibers. It should be emphasized the role of nerve growth factor (NGF) in this axonal regrowth. Recent studies have pointed to an important role of endothelin-1 in NGF expression, but none of them discussed about the endothelin's function during the regeneration of nervous fibers. In this study, we analyzed the effect of bosentan, an ET-A and ET-B receptors antagonist, on NGF expression in the heart (atrium and ventricle) and submandibular salivary glands of young Holtzman male rats submitted to the sympathectomy by 6-hydroxidopamine (6-OHDA). The treatment with bosentan started 2 days before the 6-OHDA-induced sympathectomy. Control rats were treated with vehicles. The sympathetic innervation was assessed by glyoxylic acid-induced fluorescence method for catecholamines. The treatment with 6-OHDA caused total denervation in the heart and submandibular glands. Three days after this treatment, the glands already showed trunks and few nerve fibers next to blood vessels. In the heart, this regeneration signs occurred only 7 days after the sympathectomy and only in the atrium. At this time-point, the submandibular glands showed density of sympathetic fibers close to that found in control rats. The treatment with bosentan had no effect on the sympathetic innervation or the axonal regeneration. ELISA analyzed NGF levels. The treatment with bosentan blocked the rise on the levels of NGF induced by sympathectomy in the atrium at day 7 after sympathectomy. There was no significant difference between bosentan-treated and vehicle-treated groups on the levels of NGF in ventricles and submandibular glands. Our findings suggest an important role for endothelins at least in the initial stage of heart sympathetic fiber's regeneration.

