

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**O ENVOLVIMENTO DOS TRANSPORTADORES DE
MONOAMINAS NA CAPTAÇÃO DE SEROTONINA EM
VEIAS**

MANUEL ADALBERTO ALFARO DE PRÁ

**Florianópolis
2012**

O ENVOLVIMENTO DOS TRANSPORTADORES DE MONOAMINAS NA CAPTAÇÃO DE SEROTONINA EM VEIAS

Manuel Adalberto Alfaro De Prá

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Áurea Elizabeth Linder

Co-Orientador: Prof. Dr. Anicleto Poli

**Florianópolis
2012**

**O ENVOLVIMENTO DOS TRANSPORTADORES DE
MONOAMINAS NA CAPTAÇÃO DE SEROTONINA EM
VEIAS**

POR

MANUEL ADALBERTO ALFARO DE PRÁ

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos professores Doutores:

Profa. Dra. Aurea Elizabeth Linder
Presidente – FMC/UFSC

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
FMC/UFSC

Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Profa. Dra. Thereza C. Monteiro de Lima
Coordenadora o Programa de PG em Farmacologia - UFSC
Florianópolis, 27 de fevereiro de 2012

verdades absolutas"

"Não há fatos eternos, assim como não há

(Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tito e Tânia, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Dra. Áurea Elizabeth Linder, pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade para corrigir esta dissertação.

Ao Professor Dr. Anicleto Poli pelos ensinamentos, por disponibilizar equipamentos, reagentes e drogas muito importantes para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau por disponibilizar equipamentos e laboratório.

A todos os colegas e amigos do departamento de farmacologia.

A todos os professores do curso de pós-graduação em farmacologia pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Aos professores Dr. José Eduardo da Silva Santos e Dra. Lusiane Maria Bendhack pelas valiosas contribuições dadas a este trabalho.

Ao apoio financeiro da FAPESC/CNPq, FUNPESQUISA e PPG-FMC.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Serotonina (5-HT).....	2
1.2 Biosíntese e metabolismo da 5-HT.....	3
1.3 Armazenamento e localização da 5-HT.....	5
1.4 Captação e liberação de 5-HT.....	6
1.5 O papel da 5-HT no sistema cardiovascular.....	9
1.6 Receptores para 5-HT.....	10
1.7 O sistema serotoninérgico no sistema cardiovascular.....	11
OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Animais.....	18
3.2 Coleta de tecidos.....	18
3.3 Procedimentos experimentais.....	19
3.3.1 Captação de serotonina (5-HT).....	19
3.3.1.1 Protocolos experimentais de captação.....	20
3.3.1.2 Quantificação de 5-HT e de 5-HIAA no sobrenadante das amostras.....	23
3.3.1.3 Determinação de proteínas totais.....	23
3.3.2 Avaliação da resposta contrátil de veia jugular.....	24
3.3.2.1 Protocolos experimentais da contração.....	24
3.4 Análise estatística.....	25
3.5 Materiais.....	25
3.5.1 Equipamentos.....	25
3.5.1.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	25
3.5.1.2 Sistema para órgãos isolados.....	26
3.5.2 Compostos e reagentes.....	26
RESULTADOS.....	29
4.1 Quantificação de 5-HT e 5-HIAA.....	30
4.2 Avaliação da reatividade vascular da veia jugular.....	62
DISCUSSÃO.....	83
5.1 Avaliação dos mecanismos de captação e metabolismo de 5-HT no sistema venoso.....	84
5.2 Avaliação da reatividade vascular de veias e a influência de substâncias que interferem na homeostase da 5-HT.....	88
CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE ABREVIACÕES

5-HT	-	Serotonina
5-HIAA	-	Ácido 5-Hidroxi-indolacético
SNC	-	Sistema nervoso central
TPH	-	Triptofano hidroxilase
SERT	-	Transportador de Serotonina
MAO	-	Monoaminoxidase
NE	-	Noradrenalina
DA	-	Dopamina
DAT	-	Transportador de dopamina
NET	-	Transportador de noradrenalina
SLC	-	Carreadores de soluto
HUGO	-	Organização do genoma humano
OCTs	-	Transportadores de cátions orgânicos
EMT	-	Transportador extraneuronal de monoaminas
SCV	-	Sistema cardiovascular
NO	-	Óxido Nítrico
CEUA	-	Comissão de ética para uso de animais
EPM	-	Erro padrão da média
ANOVA	-	Análise de variância
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta eficiência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Síntese da 5-HT.....	4
Figura 2:	Esquema ilustrativo do protocolo de avaliação da captação de 5-HT.....	20
Figura 3:	Níveis intracelulares de 5-HT e 5-HIAA (pg/ng de proteína).....	31
Figura 4:	Níveis intracelulares de 5-HT e 5-HIAA (pg/ng de tecido úmido).....	32
Figura 5:	Níveis de 5-HT e 5-HIAA após a exposição a veículo ou a concentrações crescentes de 5-HT exógena (pg/nag de proteína).....	35
Figura 6:	Níveis de 5-HT e 5-HIAA após a exposição a veículo ou a concentrações crescentes de 5-HT exógena (pg/mg de tecido úmido).....	36
Figura 7:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de diferentes concentrações de pargilina.....	40
Figura 8:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de pargilina.....	43
Figura 9:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de fluoxetina.....	46
Figura 10:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de imipramina.....	49
Figura 11:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de desipramina.....	52
Figura 12:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de cocaína.....	54
Figura 13:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de norfenfluramina.....	57
Figura 14:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de decynium-22.....	60
Figura 15:	Curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e presença de veículo em veia jugular de ratos.....	62
Figura 16:	Resposta contrátil para 5-HT na presença de fluoxetina em veia jugular de ratos.....	65
Figura 17:	pD ₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou fluoxetina.....	66
Figura 18:	Resposta contrátil para 5-HT na presença de imipramina em veia jugular de ratos.....	69

Figura 19:	pD ₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou imipramina.....	70
Figura 20:	Resposta contrátil para 5-HT na presença de desipramina em veia jugular de ratos.....	73
Figura 21:	pD ₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou desipramina.....	74
Figura 22:	Curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e presença de pargilina em veia jugular de ratos.....	76
Figura 23:	pD ₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou pargilina.....	77
Figura 24:	Curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e presença de decynium-22 em veia jugular de ratos.....	80
Figura 25:	pD ₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou decynium-22.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Nomenclatura adotada pelo comitê da organização do genoma humano (HUGO) para a família de carreadores de solutos (SLC).....	09
Quadro 2:	Composição da solução fisiológica salina.....	18
Quadro 3:	Composição da solução tampão para tecidos.....	19
Quadro 4:	Protocolos experimentais.....	21
Quadro 5:	Substâncias adicionadas antes da segunda curva concentração resposta de 5-HT.....	25
Quadro 6:	Composição da fase móvel.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos.....	33
Tabela 2:	Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos na presença de diferentes concentrações de 5-HT.....	37
Tabela 3:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA na presença de pargilina.....	41
Tabela 4:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA frente à exposição a 5-HT exógena na presença de pargilina.....	44
Tabela 5:	Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de fluoxetina.....	47
Tabela 6:	Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de imipramina.....	50
Tabela 7:	Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de desipramina.....	53
Tabela 8:	Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava de ratos expostas à 5-HT na presença de cocaína.....	55
Tabela 9:	Quantificação de 5-HT e 5-HIAA frente à exposição à norfenfluramina.....	58
Tabela 10:	Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de decynium-22.....	61
Tabela 11:	Valores de pD ₂ e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo (teste).....	63
Tabela 12:	Valores de pD ₂ e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de fluoxetina (teste).....	67

Tabela 13:	Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de imipramina (teste).....	71
Tabela 14:	Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de desipramina (teste).....	75
Tabela 15:	Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de pargilina (teste).....	78
Tabela 16:	Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo ou decynium-22 (teste).....	82

Resumo

DE PRÁ, M.A. “O envolvimento dos transportadores de monoaminas na captação de serotonina em veias”. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor que está amplamente distribuído nos principais sistemas fisiológicos e apresenta uma ampla variedade de funções, tanto em sistemas neuronais quanto em extraneuronais. No sistema cardiovascular sabe-se que a 5-HT está envolvida na regulação do tônus vascular, no processo de coagulação sanguínea e também está associada a algumas patologias como aterosclerose e hipertensão pulmonar. Entretanto, o seu papel neste sistema não foi completamente elucidado. Estudos recentes demonstraram que veias e artérias são capazes de sintetizar, captar e metabolizar a 5-HT e que a captação de 5-HT em artérias parece ser mediada pelo transportador de 5-HT (SERT), enquanto que veias captam 5-HT por um mecanismo independente do SERT. Além disso, uma vez dentro da célula, a 5-HT também pode interagir com proteínas intracelulares através de um processo denominado serotonilação, modulando, desta forma, a atividade destas proteínas. Esses dados indicam que a 5-HT não exerce suas ações nos principais sistemas fisiológicos somente através da ativação de seus receptores. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o mecanismo de captação da 5-HT em veias e investigar a influência de substâncias que alteram a homeostase da 5-HT na reatividade vascular da veia jugular. Através da quantificação de 5-HT e do seu metabólito o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), determinamos os níveis basais destas substâncias nos vasos. Em seguida, determinamos os níveis de 5-HT e 5-HIAA após a incubação com 5-HT exógena na presença de veículo ou de substâncias que influenciam o metabolismo, liberação ou captação de 5-HT. Em presença de pargilina, um inibidor da enzima que degrada a 5-HT, a monoamina oxidase (MAO), houve diminuição dos níveis de 5-HIAA, associada ao aumento dos níveis de 5-HT, indicando que o metabolismo da 5-HT foi inibido e sugerindo a participação desta enzima neste processo. A fluoxetina, um inibidor seletivo do transportador de 5-HT (SERT), a imipramina e a desipramina, inibidores dos transportadores de noradrenalina (NET) e do SERT e a cocaína, um inibidor dos transportadores de dopamina (DAT) e NET, não influenciaram na

captação da 5-HT. Por outro lado, na presença de decynium-22, um inibidor não seletivo dos transportadores de cátions orgânicos (OCTs), houve uma diminuição da captação de 5-HT tanto na veia jugular quanto na veia cava. Em presença de norfenfluramina, um substrato do SERT que promoveria liberação de 5-HT de estoques intracelulares não foi observada diminuição nos níveis intracelulares de 5-HT, sugerindo que não há armazenamento de 5-HT em vesículas intracelulares. As curvas concentração resposta para 5-HT realizadas em veia jugular na presença de fluoxetina, imipramina, desipramina, cocaína e decynium 22 foram deslocadas para a direita em relação às curvas realizadas na presença de veículo. A pargilina potencializou a contração da 5-HT em veia jugular. Desta forma, concluímos que a captação de 5-HT em veia jugular e veia cava de ratos se dá através dos OCTs de modo independente de SERT, NET e DAT. Além disso, a fluoxetina, imipramina, desipramina, cocaína e decynium-22 interferem na resposta contrátil à 5-HT por outros mecanismos que não a inibição da captação de monoaminas. Finalmente, nossos resultados apontam para um provável envolvimento da 5-HT intracelular na resposta contrátil induzida por 5-HT em veia jugular de ratos.

Palavras-chave: Veias. Serotonina, 5-HT. Monoaminas. Transportadores. Captação.

Abstract

De Prá, MA. “The involvement of monoamine transporters in the serotonin uptake in veins” 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter widely distributed in the major physiological systems and has a wide variety of functions in both neuronal and extraneuronal systems. In the cardiovascular system 5-HT is involved in the regulation of vascular tone, blood coating process and is also associated with some diseases such as atherosclerosis and pulmonary hypertension. However, the role of 5-HT in the cardiovascular system has not been fully elucidated. Recent studies show that veins and arteries are able to synthesize, uptake and metabolize 5-HT and whereas arteries take up 5-HT via SERT, 5-HT uptake in veins is SERT independent. The 5-HT has action in the main physiological system activating its receptor. Furthermore, once inside the cell, 5-HT may also interact with intracellular proteins by a process called serotonilation, modulating the activity of these proteins. These findings indicate that 5-HT does not exert its functions in the main physiological systems solely by activating its receptors. The goal of this study was to characterize the mechanism by which 5-HT is taken up in veins and to investigate the influence of substances that alter 5-HT homeostasis in vascular reactivity of the jugular vein. By quantification of 5-HT and its metabolite 5-hydroxy indoleacetic acid (5HIAA) by high performance liquid chromatography (HPLC), the basal levels of these substances in veins were determined. Then, the levels of 5-HT and 5-HIAA in jugular vein and vena cava after incubation with exogenous 5-HT in presence of vehicle or substances that influence the uptake, release or metabolism of 5-HT were measured. In the presence of pargyline, an inhibitor of the enzyme that degrades 5-HT, 5-HIAA levels were decreased associated with an increase in 5-HT content. Fluoxetine, a selective inhibitor of the 5-HT transporter (SERT), imipramine and desipramine, norepinephrine transporter (NET) and SERT inhibitors and cocaine, a dopamine transporter (DAT) and NET inhibitor had no effect in 5-HT uptake. On the other hand, in the presence of decynium-22, a non-selective inhibitor of organic cationic transporters (OCTs), there was a reduction in 5-HT uptake in both jugular vein and vena cava. Norfenfluramine, a SERT substrate known

to promote the release of intracellularly stored 5-HT, was ineffective in decreasing intracellular 5-HT content in veins, suggesting that 5-HT is not stored in vesicles in these vessels. The concentration-response curves to 5-HT performed in the presence of fluoxetine, imipramine, desipramine, cocaine and decynium-22, were shift to right in relation to the curves performed in the presence of vehicle. 5-HT-induced contraction in the jugular vein was potentiated by pargyline. Altogether, these results suggest that 5-HT uptake in veins is mediated by OCTs in a SERT, NET and DAT independent fashion. Moreover, fluoxetine, imipramine, desipramine and decynium-22 alter venous contraction by a mechanism not related to the inhibition of monoamine uptake. Finally, our results reveal a putative contribution of intracellular 5-HT to the contractile machinery in veins.

Key-words: Vein. Serotonin, 5-HT. Monoamines. Transporters. Uptake.

INTRODUÇÃO

1.1 Serotonina

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor pertencente à classe das indolaminas e está envolvida na regulação de uma ampla variedade de funções fisiológicas tanto em sistemas neuronais quanto extraneuronais. No sistema nervoso central (SNC), a 5-HT está associada entre outras funções à modulação do humor, da sede, da fome, do sono e da temperatura corporal. Portanto, a alteração da homeostase deste neurotransmissor está relacionada a uma série de condições fisiopatológicas, e substâncias que afetam a sua concentração são amplamente utilizadas para tratar tais condições. O papel da 5-HT como neurotransmissor está bem estabelecido e diversos trabalhos vêm demonstrando a sua importância no SNC (Jacobs e Azmitia, 1992).

A descoberta da 5-HT deve-se a trabalhos iniciados na década de 30 por Vittorio Erspamer, um pesquisador interessado nas propriedades de substâncias amínicas provenientes das células enterocromafins do intestino de diversas espécies animais. Uma destas substâncias causou especial interesse devido à propriedade de aumentar o tônus da musculatura lisa. Esta substância foi então denominada enteramina. Outra equipe com grande contribuição na elucidação desta substância foram os pesquisadores Irvine Page, Maurice Rapport e Arda Green que isolando uma substância do soro bovino também com propriedade de aumentar o tônus muscular denominaram-na serotonina. Mais tarde estas substâncias (enteramina e serotonina) foram identificadas como sendo a 5-hidroxitriptamina concluindo-se, portanto, que eram a mesma substância (Rapport, Green *et al.*, 1948; Erspamer e Asero, 1952).

Em sistemas extraneuronais a 5-HT está relacionada ao controle da motilidade intestinal, do tônus vascular, da coagulação sanguínea e da agregação plaquetária (Gershon, 1999; Veenstra-Vanderweele, Anderson *et al.*, 2000). A partir da década de 80 foi demonstrada a capacidade mitogênica da 5-HT na musculatura lisa (Nemecek, Coughlin *et al.*, 1986) e também o seu envolvimento na hipertensão pulmonar (Herve, Drouet *et al.*, 1990; Egermayer, Town *et al.*, 1999). Os efeitos vasculares da 5-HT ou a alteração dos seus níveis plasmáticos estão associados à aterosclerose, isquemia cerebrovascular, infarto de miocárdio, migrânea e à síndrome do intestino irritável (Vikenes, Farstad *et al.*, 1999; Ban, Watanabe *et al.*, 2007). Diversos trabalhos vêm sendo realizados na tentativa de esclarecer o papel da 5-HT no sistema cardiovascular. Estudos recentes demonstram que veias e artérias têm a capacidade de sintetizar, captar e metabolizar 5-HT (Linder, Ni *et al.*, 2008; Ni, Geddes *et al.*, 2008).

Abordaremos inicialmente alguns aspectos relacionados ao sistema serotoninérgico no sistema vascular, considerando principalmente os mecanismos de captação, metabolismo e liberação, enfatizando o seu papel no sistema venoso. Enfatizaremos então as substâncias que interagem com as proteínas transportadoras de monoaminas em relação à sua influência na captação e na resposta contrátil das veias jugular ou cava de ratos frente à 5-HT.

1.2. Biosíntese e metabolismo da 5-HT

A síntese da 5-HT inicia-se com a hidroxilação do aminoácido L-triptofano através da ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH), passo limitante da reação. O produto resultante é o 5-hidroxi-L-triptofano (**figura 1**). Esta enzima pertence à superfamília de hidroxilases de aminoácidos aromáticos. Através de estudos de biologia molecular foram identificadas 2 isoformas envolvidas na síntese de 5-HT: TPH1, identificada em tecidos extraneuronais e TPH2, presente principalmente no SNC. (Walther, Peter, Bashammakh *et al.*, 2003). Em seguida, o 5-hidroxi-L-triptofano é descarboxilado, através da ação da enzima L-aminoácido-descarboxilase, para formar 5-hidroxitriptamina. As células enterocromafins do intestino são responsáveis pela síntese de mais de 90% da 5-HT corporal. Porém, os pulmões e algumas regiões do cérebro também são capazes de sintetizar este neurotransmissor.

O metabolismo da 5-HT ocorre através da ação da enzima monoamina oxidase (MAO) com formação do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). A MAO é uma enzima intracelular, encontrada principalmente na mitocôndria (Schnaitman e Greenawalt, 1968; Westlund, Krakower *et al.*, 1993), portanto, a 5-HT deve ser captada pela célula antes de ocorrer seu metabolismo. Esta enzima está também envolvida na degradação de outras monoaminas como a noradrenalina e a dopamina. Existem 2 subtipos de MAO: MAO-A e MAO-B. A diferença entre elas está baseada na sua seletividade por substratos e inibidores. A degradação da 5-HT é preferencialmente feita pela MAO-A. Na periferia, tecidos que contribuem significativamente para o metabolismo da 5-HT incluem os pulmões, intestino e as células endoteliais do sistema vascular (Cases, Seif *et al.*, 1995; Watts, 2005).

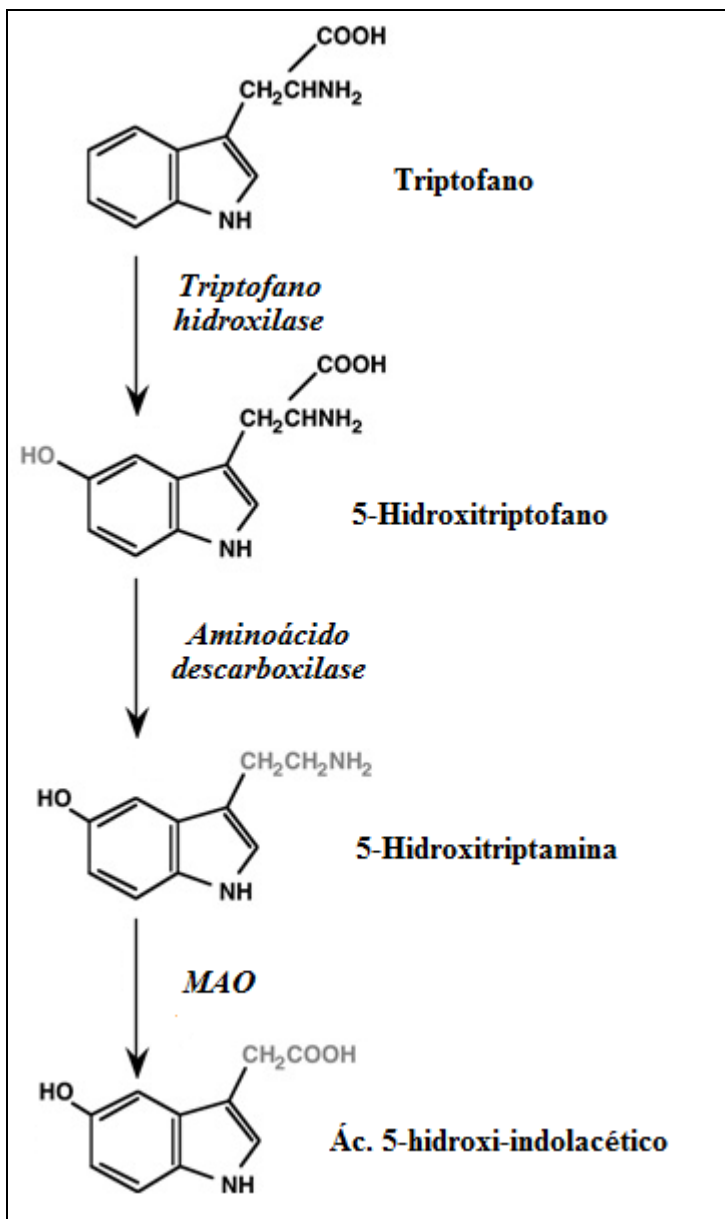


Figura 1. Síntese da 5-HT. Adaptado de Watts (2005). Ac. (ácido). MAO (monoamina oxidase).

1.3 Armazenamento e localização da 5-HT

As plaquetas são responsáveis pelo maior estoque de 5-HT corporal e, apesar de não serem capazes de sintetizar podem captar a partir do plasma a 5-HT produzida no intestino e também no pulmão. Desta forma regulam seus níveis plasmáticos (15 a 120 nM), funcionando como uma espécie de “tampão”. A estrutura da 5-HT indica que esta substância é hidrofílica, apresentando-se protonada em pH fisiológico. Portanto, é incapaz de passar a barreira hematoencefálica ou as membranas celulares por transporte passivo, nestas condições. Sneddon demonstrou que a captação de 5-HT pelas plaquetas ocorre através de um transportador localizado na membrana celular num processo dependente de cálcio, de forma similar ao transporte de aminas biogênicas, que ocorre em tecidos nervosos (Sneddon, 1969). Outros autores também demonstraram a existência deste transportador, atualmente conhecido como transportador de 5-HT (SERT), em linfoblastos (Khan, Meyneil *et al.*, 1996), monócitos (Yang, Qiu *et al.*, 2007), células enterocromafins (Gershon, 2003), células endoteliais (Wheatcroft, Wakelin *et al.*, 2005), (Mortensen, Kristensen *et al.*, 1999) nas artérias mesentérica, aorta e carótida (Ni, Thompson *et al.*, 2004) e na veia cava (Linder, Ni *et al.*, 2008). Em plaquetas, estudos de microscopia eletrônica e bioquímicos demonstram que a 5-HT está localizada em vesículas citoplasmáticas denominadas grânulos densos (Da Prada, Pletscher *et al.*, 1967). Após a captação da 5-HT pelo SERT, a 5-HT é armazenada em vesículas através de um transporte ativo dependente de íons (Rudnick, 1977). A clonagem e a expressão deste transportador, denominado transportador vesicular de monoaminas (Vmat), possibilitaram a sua caracterização. Esta proteína é constituída por 515 aminoácidos e possui 12 domínios transmembrana. Participa do transporte de diversas monoaminas como a 5-HT, dopamina e a noradrenalina e este transporte pode ser inibido pela reserpina. Assim como nas plaquetas, no SNC e em sistemas neuroendócrinos, a 5-HT também é armazenada em vesículas e o transporte é realizado através do Vmat (Erickson, Eiden *et al.*, 1992).

Além dos estoques vesiculares, a 5-HT pode estar localizada no citoplasma e ser metabolizada pela MAO ou interagir com proteínas e modular suas atividades. Esta interação ocorre através da transaminação da 5-HT com resíduos de glutamina por ligações covalentes em um processo conhecido como serotonilação. Nas plaquetas a serotonilação de algumas proteínas pertencentes à superfamília de pequenas GTPases, como Rab4 e Rho, está associada à liberação de 5-HT dos grânulos densos e de substâncias procoagulantes dos grânulos α , em

determinados processos fisiológicos. Na musculatura lisa, pode ocorrer serotonilação de proteínas contráteis, como a α -actina, durante o processo de contração muscular (Watts, Priestley *et al.*, 2009). Outros órgãos onde este fenômeno já foi relatado incluem córtex cerebral, estômago e intestino (Walther, Peter, Winter *et al.*, 2003; Watts, Priestley *et al.*, 2009).

1.4 Captação e liberação de 5-HT

Axelrod *et al.* (1961) demonstrou pela primeira vez a captação de noradrenalina (NE) em terminais nervosos simpáticos, propondo que este processo seria um importante mecanismo para inativação de neurotransmissores (Weil-Malherbe, Whitby *et al.*, 1961). Uma melhor compreensão dos mecanismos de captação de monoaminas neurotransmissoras deve-se a uma série de trabalhos realizados nos anos subsequentes. Iversen (1963), utilizando o método de coração isolado de Langendorff, demonstrou que a captação de NE ocorre de forma extremamente eficiente pelo sistema de captação existente neste órgão (Iversen, 1963). Outros experimentos estabeleceram que a captação de NE e também de dopamina (DA), no SNC, apresenta características idênticas às observadas na inervação periférica e que, após a captação, estes neurotransmissores são acumulados em vesículas localizadas no citoplasma, evitando, desta forma, o seu total metabolismo. Em relação às características fisiológicas, foi estabelecido que as proteínas carreadoras de monoaminas apresentam alta afinidade pelo substrato, são dependentes da temperatura e de íons sódio. Uma série de substâncias apresenta atividade farmacológica sobre estes transportadores. A ouabaína é capaz de bloquear a captação de NE, e apresenta cinética de saturação. A cocaína e os derivados da imipramina, são inibidores competitivos e apresentam alta afinidade pelo sítio de ligação do transportador de DA (DAT) e do transportador de NE (NET), respectivamente. Outras aminas simpaticomiméticas como, por exemplo, a tiramina, também podem competir com a NE pelo transportador. A captação das monoaminas neurotransmissoras NE, DA e 5-HT por tecidos neuronais foi denominada captação 1 (Iversen, 1971; Masson, Sagne *et al.*, 1999).

Além da captação 1, monoaminas podem ser captadas por transportadores localizados em tecidos não neuronais como, por exemplo, células musculares cardíacas, músculo liso vascular, pâncreas, entre outros. Este processo foi denominado captação 2. Os transportadores desta classe apresentam características diferentes da captação 1, sendo um sistema de baixa afinidade, alta taxa de captação e

perfil farmacológico distinto (Iversen, 1971; Hayer-Zillgen, Bruss *et al.*, 2002).

Pesquisas iniciadas na década de 70 foram fundamentais para a descoberta de diversas substâncias antidepressivas e psicoestimulantes, e para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de distúrbios do SNC como, por exemplo, depressão, déficit de atenção e hiperatividade. Portanto, fármacos que atuam nos transportadores de DA, NE e 5-HT são amplamente utilizados para tratar tais condições. A partir da década de 90, o desenvolvimento de novas técnicas neuroquímicas e moleculares, proporcionou uma melhor compreensão das características estruturais e fisiológicas destas proteínas. Foram clonados o NET, o DAT e o SERT, e classificados na superfamília de carreadores de solutos (Solute Carrier - SLC), subfamília 6 (**quadro 1**), de acordo com a nomenclatura adotada pelo comitê da organização do genoma humano (HUGO). Esta superfamília é composta por 43 subfamílias com aproximadamente 300 subtipos de receptores (Pacholczyk, Blakely *et al.*, 1991; Hediger, Romero *et al.*, 2004).

Apesar destes 3 transportadores apresentarem seletividade para os seus respectivos substratos, o DAT e o NET podem transportar tanto a DA ou a NE em tecidos cerebrais, agindo de forma não seletiva no transporte destes neurotransmissores. Cocaína e anfetamina e seus derivados como, por exemplo, a norfenfluramina, são psicoestimulantes que interagem com os transportadores neuronais de monoaminas, através de diferentes mecanismos de ação. A cocaína é um inibidor competitivo e não seletivo para DAT, NET e SERT. A anfetamina e seus derivados são substratos destes transportadores. No interior da célula causam uma redistribuição das vesículas que armazenam os neurotransmissores fazendo com que os transportadores atuem em direção reversa, ocorrendo uma grande liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. (Ritz, Lamb *et al.*, 1987; Seiden, Sabol *et al.*, 1993).

Derivados sintéticos da cocaína, com maior seletividade para DAT, como, por exemplo, o win 35, foram desenvolvidos, porém são utilizados apenas como ferramentas farmacológicas. Dentre os inibidores não seletivos de monoaminas utilizados na terapêutica estão o metilfenidato, utilizado para o tratamento do déficit de atenção, e os antidepressivos nomifensina e bupropiona. Inibidores seletivos para SERT, como a fluoxetina, o citalopran e a sertralina são exemplos de fármacos amplamente utilizados na clínica. Dentre os compostos derivados das anfetaminas, poucos são seletivos, como citado anteriormente. O metilendioximetanfetamina (MDMA), é um derivado

anfetamínico que, no entanto, apresenta seletividade para SERT (Jones, Gainetdinov *et al.*, 1998).

O mecanismo de ação destes transportadores é dependente de íons sódio e cloro, e a força de direcionamento é dependente do gradiente de concentração iônica gerada pela bomba sódio/potássio ATPase. A ligação do neurotransmissor e dos íons sódio e cloro causa uma alteração conformacional no transportador, ocorrendo o co-transporte destes íons juntamente com o transporte do neurotransmissor. O transporte de íons potássio para o exterior da célula é necessário para o transportador retomar a sua conformação original (Fischer e Cho, 1979; Kamdar, Penado *et al.*, 2001).

Os transportadores extraneuronais de monoaminas, pertencentes à captação 2 (Iversen, 1971), são classificados na superfamília SLC, subfamília 22 (**quadro 1**) (Hediger, Romero *et al.*, 2004). Dentro desta subclasse estão os transportadores de cátions orgânicos (Organic Cation transporters - OCTs). Existem 3 subtipos de OCTs (OCT 1, OCT 2 e OCT 3), classificados de acordo com a sua estrutura, localização e substratos. Muitas drogas, metabólitos e substâncias endógenas possuem grupamentos amínicos, característica que confere carga positiva às suas moléculas sendo, portanto, cátions orgânicos, passíveis de transporte por esta classe de transportadores. O transporte das monoaminas neurotransmissoras NA, DA e 5-HT, também pode ocorrer através destes transportadores (Jonker e Schinkel, 2004).

Em 1994 foi identificado por técnicas de clonagem o primeiro OCT (OCT 1) em tecidos de fígado, rim e intestino de rato, sendo considerado um transportador poliespecífico importante na eliminação de drogas (Grundemann, Gorboulev *et al.*, 1994). Nos anos subsequentes foi identificado o segundo OCT (OCT 2) em tecidos renais, sendo relacionado ao transporte e eliminação de drogas nos rins. O terceiro OCT (OCT 3), também denominado transportador extraneuronal de monoaminas (Extraneuronal Monoamine Transporter - EMT), foi identificado em tecidos do fígado, coração e cérebro humano e de rato. O OCT 3 está implicado na inativação das monoaminas neurotransmissoras que não foram recaptadas pelos transportadores neuronais de monoaminas (captação 1), contribuindo na cessação do sinal em tecidos periféricos. O bloqueio deste transportador causa aumento nos níveis plasmáticos das aminas neurotransmissoras, resultando em hipertrofia vascular e um progressivo aumento da resistência periférica e hipertensão arterial. No SNC, o OCT 3 também pode representar um importante mecanismo não neuronal de inativação

de neurotransmissores (Okuda, Saito *et al.*, 1996; Grundemann, Schechinger *et al.*, 1998).

Os OCTs apresentam características distintas dos transportadores neuronais de monoaminas. Possuem baixa afinidade, porém alta capacidade; são independentes de íons sódio, cloro ou cálcio e apresentam perfil farmacológico inibitório distinto da captação 1 sendo insensíveis aos antidepressivos tricíclicos e cocaína e são inibidos por alguns corticóides, como a corticosterona. (Hohage, Stachon *et al.*, 1998). As isocianinas e as pseudoisocianinas, como o decynium-22, são inibidores dos OCTs (Grundemann, Gorboulev *et al.*, 1994).

Quadro 1. Nomenclatura adotada pelo comitê da organização do genoma humano (HUGO) para a família de carreadores de solutos (SLC)

FAMÍLIA DE CARREADORES DE SOLUTO	
SLC 6	Família de transportadores de neurotransmissores dependentes de íons sódio e cloro.
SLC 22	Família de transportadores de cátions, ânions e anfóteros.

Adaptada de (Hediger, Romero *et al.*, 2004).

1.5 O papel da 5-HT no sistema cardiovascular

Um grande número de estudos relacionados à 5-HT em tecidos neuronais possibilitou a compreensão de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos relacionados às ações deste neurotransmissor no SNC. Entretanto, o seu papel no sistema cardiovascular (SCV) ainda não está bem elucidado apesar de uma série de evidências apontarem a 5-HT como uma substância importante para a regulação fisiológica deste sistema. Além disso, como já mencionado anteriormente, a 5-HT parece estar também envolvida em processos patológicos deste sistema.

No SCV, o maior estoque de 5-HT encontra-se nos grânulos densos das plaquetas, que controlam os níveis plasmáticos de 5-HT e conseqüentemente a ativação de receptores serotoninérgicos presentes nas células endoteliais, na musculatura lisa vascular e em células cardíacas. Processos relacionados à coagulação sanguínea envolvem a ativação de receptores serotoninérgicos presentes nas plaquetas, com conseqüente liberação de 5-HT e agregação plaquetária. Alterações nas concentrações plasmáticas de 5-HT, originadas por disfunções plaquetárias ou do seu sistema de captação, através do SERT, podem estar relacionadas a diversas patologias cardiovasculares. Estudos demonstram que a diminuição da concentração intracelular de 5-HT das plaquetas, com conseqüente aumento da sua concentração plasmática, está relacionada com a hipertensão (Brenner, Harney *et al.*, 2007). De

maneira interessante, a administração crônica de 5-HT causa progressiva queda da pressão sanguínea tanto em ratos hipertensos quanto em normotensos. Sugere-se que este fenômeno seja mediado pelas ações do óxido nítrico (NO), visto que a inibição da enzima que sintetiza o NO, a sintase do óxido nítrico, previne esta queda na pressão (Diaz, Ni *et al.*, 2008). Diversas ferramentas foram desenvolvidas na tentativa de elucidar o papel do sistema serotoninérgico no SCV. Um grupo holandês desenvolveu ratos que apresentam o SERT truncado e inativo (Homberg, Olivier *et al.*, 2007). Estes animais apresentam níveis plasmáticos de 5-HT diminuídos em relação aos animais controle, indicando a importância do SERT em acumular 5-HT em plaquetas (Linder *et al.*, 2011). Além disso, a queda da pressão sanguínea após a infusão crônica de 5-HT foi reduzida nestes ratos quando comparados aos ratos controle (Davis *et al.*, 2011). Estes dados apontam para o envolvimento do SERT na diminuição da pressão sanguínea induzida por 5-HT. Animais “knockout” para TPH 1, enzima envolvida na síntese da 5-HT, apresentam baixos níveis desta monoamina no sangue. Esta alteração está relacionada à disfunção e falência cardíaca. Estes animais também apresentam baixa capacidade de agregação plaquetária, e reduzido risco de trombose e tromboembolismo (Cote, Thevenot *et al.*, 2003; Walther, Peter, Winter *et al.*, 2003). Alterações dos níveis plasmáticos de 5-HT, devido a anormalidades nas plaquetas, estão relacionadas à hipertensão pulmonar. Estudos demonstraram que a ketanserina, um antagonista do receptor da 5-HT, o 5-HT_{2A/C}, foi capaz de melhorar a hipertensão pulmonar em humanos (Herve, Drouet *et al.*, 1990).

1.6 Receptores para 5-HT

A serotonina tem ação na maioria dos principais sistemas fisiológicos através da ativação de seus receptores, que foram classificados de acordo com a característica de cada receptor, levando em consideração critérios como ligantes, vias de transdução de sinal e estrutura (em relação à sua sequência de aminoácidos e nucleotídeos). Foram identificadas sete famílias de receptores (5-HT₁ – 5-HT₇) com pelo menos 15 diferentes subtipos. A maioria dos receptores pertence à família de receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, com exceção do receptor 5-HT₃ que é um receptor ligado a canal iônico (Hoyer, Clarke *et al.*, 1994).

No sistema vascular, a 5-HT regula o tônus através da ativação de diversos subtipos de receptores localizados nas células musculares lisas e nas células endoteliais. Cohen e colaboradores (1981) mostraram que a

contração induzida pela 5-HT em aorta e veia jugular é mediada através da ativação de receptores 5-HT₂ (Cohen, Fuller *et al.*, 1981). Estudos subsequentes demonstraram que o subtipo de receptor envolvido na contração da veia jugular é o 5-HT_{2A} (Linder, Gaskell *et al.*). Outros importantes receptores serotoninérgicos envolvidos na contratilidade vascular de artérias incluem os subtipos 5-HT_{2B} e 5-HT_{1B/1D} (Morecroft, Heeley *et al.*, 1999; Watts e Thompson, 2004). A 5-HT pode exercer seus efeitos através da ativação de receptores presentes em células endoteliais e consequente liberação de substâncias relaxantes ou contráteis. Através de técnicas de clonagem, foram identificados os subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{1D} em células endoteliais de diferentes espécies (Ullmer, Schmuck *et al.*, 1995). Além da capacidade de regular o tônus vascular, foi demonstrado que a 5-HT também possui um efeito mitogênico sobre alguns tipos celulares, incluindo células endoteliais e da musculatura lisa, podendo estar envolvida em processos de diferenciação celular. (Nemecek, Coughlin *et al.*, 1986; Pakala, Willerson *et al.*, 1994).

1.7 O sistema serotoninérgico no sistema vascular

A maioria dos efeitos atribuídos à 5-HT deve-se à ativação de receptores que são classificados em diversos subtipos e estão amplamente distribuídos nos principais sistemas fisiológicos. Além da ativação de receptores, a 5-HT pode interagir com proteínas intracelulares, modulando a sua atividade, processo conhecido como serotonilação e já mencionado anteriormente (Walther, Peter, Winter *et al.*, 2003; Watts, Priestley *et al.*, 2009). Atualmente, entende-se que a vasculatura sistêmica é exposta à 5-HT através da liberação da mesma pelas plaquetas. Entretanto, estudos recentes demonstraram a presença de um sistema serotoninérgico local em veias e artérias (Linder, Ni *et al.*, 2008; Ni, Geddes *et al.*, 2008).

Em artérias, estudos de microscopia eletrônica demonstraram que a 5-HT encontra-se dispersa no citoplasma celular, e não em vesículas (Ni, Geddes *et al.*, 2008). Portanto, é possível que a sua função neste tecido possa estar relacionada à serotonilação de proteínas intracelulares e não somente à interação com receptores. A presença de TPH 1 funcional sugere que estes tecidos têm a capacidade de sintetizar 5-HT. A enzima MAO também está presente nestes tecidos e a exposição à 5-HT exógena aumenta os níveis de 5-HIAA intracelulares mantendo os níveis de 5-HT constantes. Isto evidencia que as artérias possuem capacidade de captar 5-HT e prontamente metabolizar esta monoamina. Entretanto, em presença de substâncias inibidoras seletivas do SERT,

como a fluoxetina e a fluvoxamina, esta captação foi diminuída, sugerindo o envolvimento deste transportador neste processo. A exposição dos tecidos à (+)-fenfluramina, um derivado anfetamínico substrato para o SERT e liberador de 5-HT dos estoques intracelulares, diminuiu as quantidades intracelulares de 5-HT aumentando-a no meio extracelular. Este aumento não apresentou efeitos contráteis diretos, mas potencializou os efeitos da NE nestes vasos (Ni, Geddes *et al.*, 2008).

Em veias, a presença de 5-HT foi identificada inicialmente em safena de ratos (Cohen, Schenck *et al.*, 1999) e, posteriormente, em jugular e cava. A quantificação de 5-HT e 5-HIAA nestes tecidos mostrou que veias possuem níveis maiores de 5-HT, se comparados a artérias (Linder, Ni *et al.*, 2007). A enzima TPH 1 foi identificada em veia cava e mostrou-se funcional, evidenciando a capacidade deste tecido em sintetizar 5-HT. A capacidade de captação da veia jugular e da veia cava foi avaliada através da exposição destes tecidos à 5-HT seguida da quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi observado aumento dos níveis de 5-HIAA sem variação, no entanto, dos níveis de 5-HT, indicando captação seguida de metabolismo. Em animais tratados com pargilina, um inibidor não seletivo da MAO, foi observado apenas aumento dos níveis de 5-HT, sugerindo que o seu metabolismo ocorre através desta enzima. Interessantemente, a presença dos inibidores não seletivos para SERT, fluoxetina e fluvoxamina, não influenciou na captação de 5-HT, sugerindo que este processo é independente do SERT (Linder, Ni *et al.*, 2008). Até o momento, não há estudos que demonstrem os possíveis mecanismos envolvidos na captação de 5-HT pelas veias. Também não foi investigada a capacidade destes tecidos de armazenar ou liberar 5-HT.

Existem diversas hipóteses possíveis de serem postuladas em relação ao papel do sistema serotoninérgico na vasculatura. Artérias e veias são capazes de sintetizar e captar 5-HT, sendo uma possível fonte deste neurotransmissor para o sistema vascular. Outra característica importante é a sua capacidade de metabolizar a 5-HT mantendo os níveis intracelulares de 5-HT constante, funcionando como uma espécie de “tampão”, podendo participar, juntamente com as plaquetas, da homeostase do sistema vascular.

Em relação às artérias, as veias possuem níveis basais de 5-HT mais elevados (Linder, Ni *et al.*, 2008) e uma maior quantidade de sangue corporal, além de comportarem cerca de 70% do total do sangue circulante em qualquer momento (Wiedeman, 1963). Portanto, torna-se importante entender a fisiologia do sistema serotoninérgico em veias e identificar processos que possam alterar a sua homeostase.

Neste trabalho, nós hipotetizamos que a captação de 5-HT em vasos é mediada pelo NET e que substâncias que influenciam a homeostase da 5-HT podem alterar a resposta contrátil destes vasos.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando que:

I) A maior parte do sangue, em torno de 70 % do total, encontra-se no sistema venoso em qualquer momento;

II) Veias possuem um sistema serotoninérgico funcional capaz de sintetizar, captar e metabolizar a 5-HT;

III) O mecanismo de captação de 5-HT em veias é independente do SERT e ainda não foi caracterizado;

IV) Os níveis intracelulares de 5-HT são maiores em veias que em artérias;

V) A influência de drogas que agem nos transportadores de monoaminas no sistema venoso ainda não foi investigada.

Este trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo de captação de 5-HT em veias, e avaliar a influência de substâncias que interferem na homeostase da 5-HT na atividade contrátil da veia jugular.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia que possibilite a mensuração de 5-HT e 5-HIAA em veias através de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Mensurar os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veias na ausência e na presença de drogas que interferem na captação, metabolismo e liberação de 5-HT;
- Avaliar a influência de substâncias que influenciam na homeostase da 5-HT na reatividade vascular da veia jugular.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (300 a 400 gramas). Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no biotério setorial do Departamento de Farmacologia, mantidos em gaiolas com livre acesso a água e ração, em ciclo claro/escuro (12/12 h) a uma temperatura de aproximadamente 22°C. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a comissão de ética para uso de animais (CEUA) sob o protocolo de número PP00306.

3.2 Coleta de tecidos

Para realização dos protocolos experimentais foram coletadas as veias jugulares externas e a veia cava inferior conforme o procedimento descrito a seguir.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (90 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) administradas intraperitonealmente. Após completa anestesia os animais foram submetidos à abertura da cavidade torácica sendo em seguida eutanasiados. As veias jugulares e cava foram cuidadosamente removidas e transferidas para uma placa de petri contendo solução fisiológica salina conforme **quadro 2**.

Quadro 2 – Composição da solução fisiológica salina

Composto	Concentração em mM
NaCl	131,3
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,18
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,6
Dextrose	5,5
NaHCO ₃	14,9

Com auxílio de uma lupa e de materiais cirúrgicos, o excesso de tecido perivascular e de sangue foi retirado e descartado. Os vasos foram então seccionados em anéis de aproximadamente 5 mm e utilizados nos protocolos descritos a seguir.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Captação de Serotonina (5-HT)

O procedimento para avaliação da captação de 5-HT foi realizado conforme descrito por Linder e colaboradores (Linder, Diaz *et al.*, 2008), adaptado às condições do nosso laboratório.

A seguir descrevemos o protocolo experimental geral para a avaliação da captação de 5-HT. As drogas utilizadas serão descritas durante a descrição dos protocolos experimentais específicos mais adiante.

Após a coleta dos anéis de veia jugular e veia cava, os tecidos foram transferidos para recipientes contendo 490 μ L de solução fisiológica previamente aerada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Foram adicionados 5 μ L de droga ou veículo e as preparações foram mantidas em banho-maria a 37^oC durante 30 minutos (etapa 1) seguidos da adição de 5 μ L de 5-HT ou veículo por mais 15 minutos (etapa 2). Após as etapas 1 e 2 (45 minutos), os tecidos foram transferidos para recipientes contendo aproximadamente 50 mL de solução fisiológica (etapa 3), com objetivo de retirar o excesso de 5-HT, veículo e de drogas. Em seguida, foram transferidos para um papel filtro para retirar o excesso de solução fisiológica, pesados e armazenados em recipientes contendo 100 μ L de solução tampão conforme **quadro 3**. O peso do tecido úmido foi utilizado para expressar o conteúdo intracelular de 5-HT e 5-HIAA (ver adiante).

Quadro 3 – Composição da solução tampão para tecidos

Composto	Concentração
Fosfato de sódio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	50 mM
Ácido Cítrico ($C_6H_8O_7$)	30 mM
Metanol (CH_3OH)	15 %

pH: 2,5 (ajustado com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio)

Os recipientes contendo tecidos em solução tampão com as amostras foram armazenados a -80^oC por no mínimo 4 horas. Em seguida, as amostras foram descongeladas, sonicadas durante 5 minutos. O congelamento e sonificação foram realizados para rompimento celular com perda de componentes intracelulares, incluindo a 5-HT, para o tampão. As amostras foram então centrifugadas a 15.000 RPM durante 5 minutos. Parte do sobrenadante (20 μ L) foi injetada no HPLC para

quantificação de 5-HT e de seu metabólito 5-HIAA, enquanto o tecido que foi previamente pesado como citado anteriormente, foi usado para dosagem de proteína tecidual como descrito a seguir. Este protocolo está esquematizado na **figura 2**.

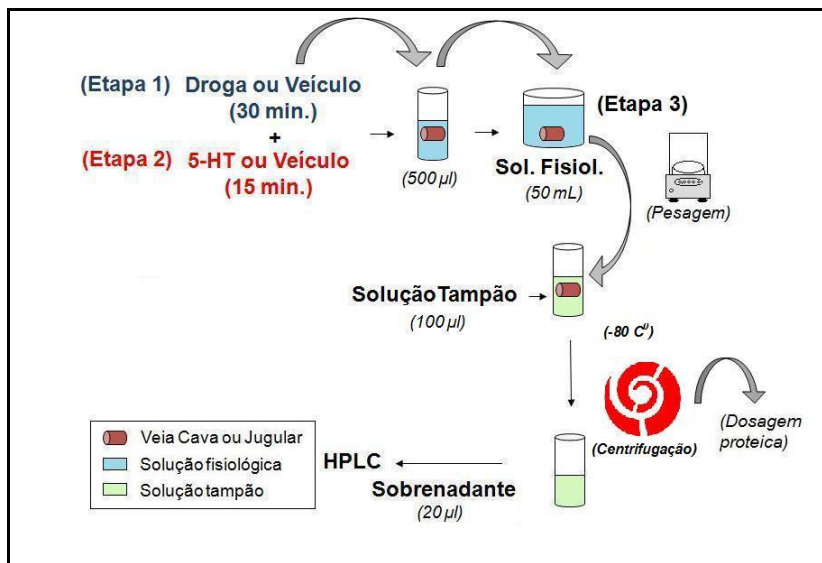


Figura 2. Esquema ilustrativo do protocolo de avaliação da captação de 5-HT. Sol. fisiol. (Solução fisiológica); HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência).

3.3.1.1 Protocolos experimentais de captação

Os estudos de captação de 5-HT foram realizados em veias jugulares externas direita e esquerda e veia cava inferior isoladas conforme descrito no item 3.2 e a captação foi avaliada conforme descrito no item 3.3.1. Os protocolos experimentais, as substâncias utilizadas com suas respectivas concentrações, estão descritos no **quadro 4**. Todas as substâncias administradas aos tecidos em solução fisiológica, incluindo o veículo, foram adicionados em volume de 5 µL. O volume final foi de 500 µL e as concentrações finais estão entre parênteses.

Quadro 4. Protocolos experimentais

Protocolos Experimentais	Etapa 1 (30 minutos)	Etapa 2 (15 minutos)
Determinação dos níveis basais de 5-HT e 5-HIAA para observar se reproduz os dados da literatura em nossas condições experimentais.	Veículo (H ₂ O)	Veículo (H ₂ O)
Determinação da captação de 5-HT para observar se reproduz os dados da literatura em nossas condições experimentais.	Veículo (H ₂ O)	5-HT (10 ⁻⁶ M)
Determinação da captação em diferentes concentrações de 5-HT para verificar se há dependência da concentração de 5-HT no processo de captação.	Veículo (H ₂ O)	5-HT (10 ⁻⁷ M, 10 ⁻⁶ M ou 10 ⁻⁵ M)
Determinação da captação de 5-HT na presença de pargilina para observar se a inibição do metabolismo de 5-HT promove aumento nos níveis intracelulares de 5-HT.	Pargilina (10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁵ M ou 10 ⁻⁴ M)	5-HT (10 ⁻⁶ M)
Determinação da captação de concentrações crescentes de 5-HT na presença de pargilina.	Pargilina (10 ⁻⁴ M)	5-HT (10 ⁻⁷ M, 10 ⁻⁶ M ou 10 ⁻⁵ M)
Determinação da captação de 5-HT na presença de fluoxetina para observar a influência do SERT no processo de captação.	Fluoxetina (10 ⁻⁶ M)	5-HT (10 ⁻⁶ M)
Determinação da captação de 5-HT na presença de imipramina para observar a influência do SERT/NET no processo de captação.	Imipramina (10 ⁻⁶ M)	5-HT (10 ⁻⁶ M)
Determinação da captação de 5-HT na presença de desipramina para observar a influência do SERT/NET no processo de captação.	Desipramina 10 ⁻⁶ M	5-HT (10 ⁻⁶ M)
Determinação da captação de 5-HT na presença de Cocaína para observar a influência do SERT/NET/DAT no processo de captação.	Cocaína 10 ⁻⁶ M	5-HT (10 ⁻⁶ M)

Determinação da liberação de 5-HT na presença de norfenfluramina para observar se os estoques intracelulares de 5-HT estariam armazenados em vesículas.	Pargilina (10^{-4} M) + Norfenfluramina (10^{-4} M)	-
Determinação da captação de 5-HT na presença de Decynium-22 para observar a influência dos OCTs no processo de captação.	Decynium-22 10^{-5} M	5-HT (10^{-6} M)

3.3.1.2 Quantificação de 5-HT e de 5-HIAA no sobrenadante das amostras.

O procedimento para quantificação de 5-HT e de seu metabólito 5-HIAA foi realizado conforme descrito por Linder e colaboradores (Linder, Diaz *et al.*, 2008), adaptado às condições do nosso laboratório.

Essa quantificação de 5-HT e de 5-HIAA foi realizada por HPLC. Foram preparadas soluções padrões de 5-HT e 5-HIAA nas concentrações de 5; 10; 25; 50 e 100 ng/ml de solução. Para diluição dos padrões foi utilizado solução tampão para tecidos conforme **quadro 3**. Foram injetados 20 µL de cada solução padrão e as áreas dos picos foram usadas para realizar uma curva de calibração considerando a faixa de variação necessária para quantificação dos analitos (5-HT e 5-HIAA). As áreas dos picos dos analitos foram usadas para quantificar as amostras por regressão linear da curva de calibração de padrões. Os valores obtidos foram expressos em picogramas de 5-HT ou 5-HIAA por miligramas de tecido úmido (obtido pela pesagem do tecido após a realização do procedimento experimental conforme descrito em 3.3.1) ou picograma por nanograma de proteína (conforme descrito abaixo).

3.3.1.3 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteína total dos vasos foi feita através do método de quantificação de proteínas descrito por Bradford (Bradford, 1976). Este método utiliza o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm e é lido por espectrofotometria. Os tecidos utilizados para a determinação de proteínas foram previamente dissolvidos em 100,0 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M. A quantificação de proteínas dos analitos foi realizada por comparação dos valores de absorbância obtidos das amostras com os valores obtidos da curva de calibração de padrões preparados com albumina nas concentrações de 0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 µg/mL. A comparação foi feita por regressão linear da curva de calibração. Este protocolo foi feito para comparação com os resultados expressos como pg/mg de tecido úmido conforme descrito em 3.3.1.2.

3.3.2 Avaliação da resposta contrátil de veia jugular

Para avaliar a reatividade da veia jugular foi utilizado o método clássico de medida de tensão isométrica em câmara para órgão isolado. Os estudos de reatividade vascular foram realizados com anéis de veia jugular externa e foram isolados conforme descrito no item 3.2.1 e montados num sistema de órgãos isolados descrito a seguir. Os anéis de veia jugular foram colocados entre ganchos metálicos inseridos no lúmen do vaso. Um dos ganchos é preso a um suporte de acrílico, enquanto o outro, que é acoplado a uma haste metálica, é conectado a um transdutor de tensão isométrica que emite sinal para um sistema de aquisição de dados permitindo registrar as variações de tensão exercidas pelo vaso durante o experimento. Foi aplicada uma tensão inicial de 1,0 g durante o período de estabilização de 60 minutos com substituição da solução fisiológica a cada 15 minutos. O tecido, após a estabilização de 60 minutos foi estimulado com 5-HT 10^{-7} M para testar a viabilidade tecidual e a contração do tecido foi registrada por 15 minutos. Foram considerados neste estudo apenas os anéis de veia jugular que geraram uma resposta contrátil superior a 500 mg de tensão. A solução fisiológica salina foi substituída várias vezes até o retorno à linha basal. Em seguida, foram realizadas 2 curvas concentração resposta cumulativas consecutivas para 5-HT nas concentrações de 10^{-9} M a 10^{-5} M, com intervalo de 5 minutos entre a administração de cada concentração. A primeira curva concentração resposta foi realizada na ausência de qualquer tratamento e foi considerada como controle. O intervalo entre as curvas foi de 60 minutos, sendo 30 minutos de troca da solução fisiológica salina para relaxamento da resposta contrátil e retorno à linha de base seguidos de 30 minutos de incubação com veículo ou Droga. Deste modo, a segunda curva concentração resposta foi realizada em presença de veículo ou droga descritos a seguir e foi comparada com a primeira curva concentração resposta.

3.3.2.1 Protocolos experimentais da contração

As substâncias utilizadas nos protocolos experimentais com suas respectivas concentrações estão descritas no **quadro 5**. Todas as substâncias administradas aos tecidos em solução fisiológica, incluindo o veículo, foram adicionadas em volume de 2,0 μ L. O volume final foi de 2,0 mL e as concentrações finais estão entre parênteses.

Quadro 5. Substâncias adicionadas antes da segunda curva concentração resposta de 5-HT

Substâncias	Concentração	Substâncias	Concentração
veículo	-	desipramina	1,0 µM
fluoxetina	1,0 µM	desipramina	0,1 µM
fluoxetina	0,1 µM	desipramina	0,01 µM
fluoxetina	0,01 µM	pargilina	100,0 µM
imipramina	1,0 µM	decynium	10,0 µM
imipramina	0,1 µM	decynium	1,0 µM
imipramina	0,01 µM	decynium	0,1 µM

3.4 Análise estatística

As medidas dos níveis de 5-HT e 5-HIAA foram obtidas por HPLC em pg e os resultados foram expressos como pg/mg de tecido úmido ou pg/ng de proteína. As medidas de tensão isométrica foram expressas como g de tensão. Os resultados apresentados são expressos pela média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de n experimentos, sendo que n representa amostras obtidas de animais diferentes. Para as análises estatísticas utilizou-se o teste t de Student (Student's t test) para os protocolos de avaliação da captação de 5-HT. Os protocolos de reatividade vascular foram avaliados também pelo teste t com análise pareada, utilizando o programa Graph Pad Prism[®] software (San Diego California, USA). Diferenças com valores de $P < 0,05$ foram consideradas significativas.

3.5 Materiais

3.5.1 Equipamentos

3.5.1.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência

O equipamento utilizado para a quantificação foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Waters modelo e2695 com um módulo de separação da marca Alliance composto de uma bomba quaternária, um degasificador, um aquecedor de coluna e um injetor automático refrigerado. O sistema é acoplado a um detector eletroquímico da marca Waters 2465 (Waters, Milford, MA, USA). As reações eletroquímicas acontecem em uma célula analítica de fluxo com volume de trabalho determinado por um espaçador de 25 µm de espessura. O eletrodo de trabalho é constituído de carbono vítreo (GC-WE) com 2 mm de diâmetro e foi operado em corrente contínua

ajustado a um potencial de oxidação de +600 mV versus a um eletrodo de referência Ag/AgCl (ISSAC) e um eletrodo auxiliar de aço inoxidável. A corrente aplicada foi de 50 mA. A fase móvel foi preparada conforme **quadro 6** e em seguida foi filtrada através de uma membrana de acetato e celulose com porosidade de 0,45 μm da marca Millipore e degaseificada sob vácuo e banho de ultrason antes do uso.

Quadro 6 – Composição da fase móvel

Composto	Concentração em mM
Fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	90 mM
Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	50 mM
1-Heptanosulfonato de sódio ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}$)	1,7 mM
$\text{Na}_2\text{EDTA}_2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$)	50 μM
Acetonitrila (CH_3CN)	10 %

pH: 3,0 (ajustado com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio)

O fluxo da fase móvel foi ajustado para 0,30 mL por minuto através de uma coluna de fase reversa (C18) com 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno 4 μm protegida por uma guarda coluna (C18) com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, ambas mantidas a 35°C.

3.5.1.2 Sistema para órgãos isolados

O sistema consiste em cubas de vidro de aproximadamente 1 cm de diâmetro e 5 cm de altura com capacidade para 2 ml fixados a 1 suporte de metal. As cubas são acopladas através de mangueiras a um banho-maria e mantidas a 37°C. Para registro das variações de tensão foram utilizados transdutores de tensão isométrica (Grass Instrumests Co, EUA ou ADInstruments, Austrália) acoplados a um sistema de aquisição de dados Powerlab, versão 7.2, AD Instruments, Austrália.

3.5.2 Compostos e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: cetamina e xilazina (Syntec, São Paulo, SP, Brasil); Fosfato de sódio (Merck do Brasil); Norfenfluramina (Santa Cruz biotechnology); Serotonina, Fluoxetina, Imipramina, Desipramina, Decynium-22; Ácido cítrico, 1-Heptanosulfonato de sódio e $\text{Na}_2\text{EDTA}_2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, KCl,

CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, NaHCO₃, dextrose anidra e dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA), cocaína (Merck). Os sais utilizados para o preparo da solução fisiológica e as drogas foram dissolvidos em água destilada, apenas o Decynium-22 foi dissolvido em DMSO.

RESULTADOS

4.1 Quantificação de 5-HT e 5-HIAA

Foram quantificados os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular e veia cava, após a exposição dos tecidos a veículo ou 5-HT com objetivo de determinar os níveis endógenos destas substâncias e a capacidade dos tecidos de captar 5-HT exógena. Os resultados apresentados nas **figuras 3 e 4** demonstram que anéis de veia jugular (A) e veia cava (B) apresentam níveis basais mensuráveis de 5-HT e de seu metabólito 5-HIAA. Quando os tecidos foram expostos à 5-HT exógena (15 min.) observamos um aumento nos níveis do metabólito 5-HIAA mas não de 5-HT. Nós expressamos os resultados em pg/mg de tecido úmido (figura 4) e comparamos com os resultados expressos como pg/ng de proteína (figura 3). Observamos que houve semelhança no perfil dos resultados. Os valores numéricos estão expressos na **tabela 1**.

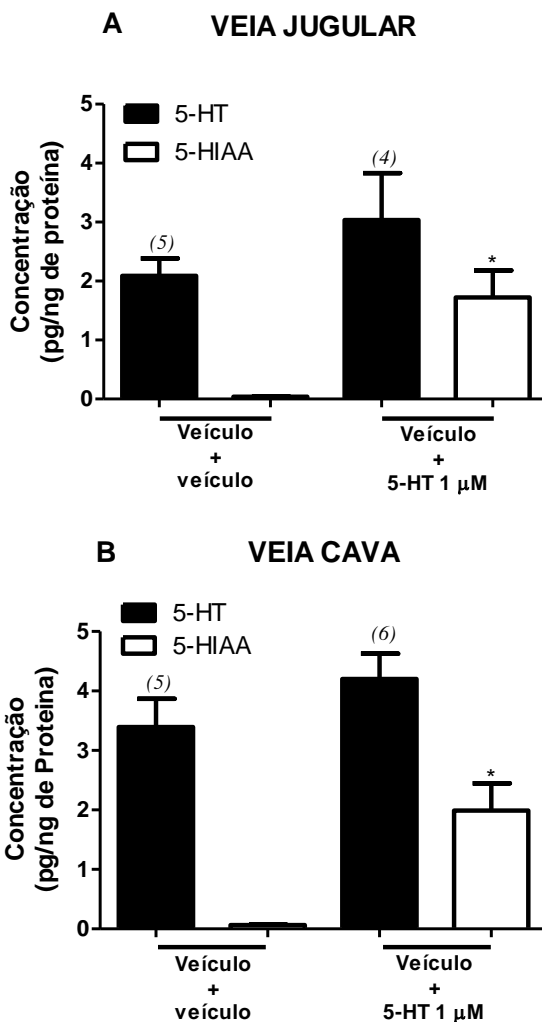


Figura 3 – Níveis intracelulares de 5-HT e 5-HIAA (pg/ng de proteína). Quantificação de 5-HT e de 5-HIAA em veias jugular (A) e cava (B). Os tecidos foram expostos a veículo por 30 min seguidos da exposição a (veículo + veículo) ou (veículo + 5-HT 1 μM) por mais 15 min. Os resultados das medidas de 5-HT e 5-HIAA obtidos por HPLC foram expressos pg/ng de proteína. As barras representam a média ± EPM dos valores obtidos. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo) (teste t de Student). (n).

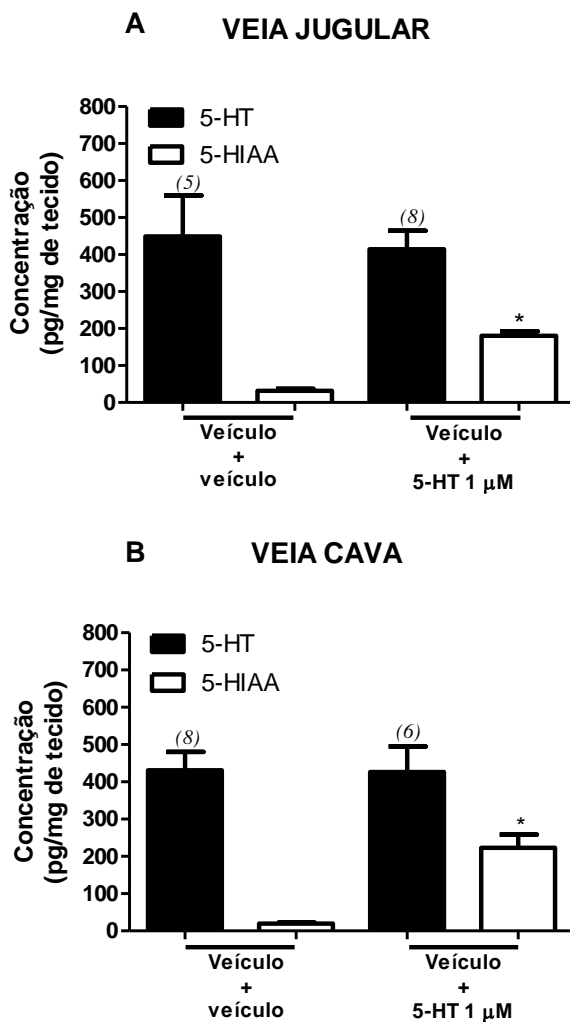


Figura 4 – Níveis intracelulares de 5-HT e 5-HIAA (pg/ng de tecido úmido). Quantificação de 5-HT e de 5-HIAA em veias jugular (A) e cava (B). Os tecidos foram expostos a veículo por 30 min seguidos da exposição a (veículo + veículo) ou (veículo + 5-HT 1 μ M) por mais 15 min. Os resultados das medidas de 5-HT e 5-HIAA obtidos por HPLC foram expressos como pg/mg de tecido úmido. As barras representam a média \pm EPM dos valores obtidos. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo) (teste t de Student). (n).

Tabela 1. Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.	
Quantificação de 5-HT e 5-HIAA	jugular (ng/mg proteína)	Veículo + veículo	5-HT	2,092 ± 0,295
			5-HIAA	0,039 ± 0,007
	cava (pg/ng proteína)	Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	3,036 ± 0,794
			5-HIAA	1,724 ± 0,458 *
	Jugular (pg/mg tecido)	Veículo + veículo	5-HT	3,394 ± 0,476
			5-HIAA	0,064 ± 0,0087
	cava (pg/mg tecido)	Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	3,410 ± 0,357
			5-HIAA	0,228 ± 0,0145 *
	jugular (ng/mg proteína)	Veículo + veículo	5-HT	448,7 ± 111,2
			5-HIAA	31,72 ± 5,310
	cava (pg/mg tecido)	Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	414,2 ± 49,92
			5-HIAA	180,5 ± 12,07 *
jugular (ng/mg proteína)	Veículo + veículo	5-HT	431,2 ± 48,94	
		5-HIAA	19,54 ± 2,798	
cava (pg/mg tecido)	Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	426,1 ± 68,56	
		5-HIAA	222,9 ± 35,54 *	

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido ou ng/mg de proteína em veia jugular e cava de ratos. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo) (teste t de Student).

Avaliação da captação de 5-HT em diferentes concentrações de 5-HT exógena

Foram determinados os níveis de 5-HT e 5-HIAA basais e após a exposição dos tecidos à 5-HT nas concentrações de 0,1 μM ; 1,0 μM e 10 μM com objetivo de avaliar a captação frente a diferentes concentrações de 5-HT exógena. Os resultados apresentados nas **figuras 5 e 6** demonstram que a exposição dos tecidos de veia jugular (A) e veia cava (B) a concentrações crescentes de 5-HT não provoca um aumento nos níveis de 5-HT em relação ao controle (veículo + veículo). Entretanto, houve aumento gradual dos níveis de 5-HIAA com as preparações incubadas com 5-HT nas 3 concentrações utilizadas e esse aumento foi dependente da concentração de 5-HT exógena. Do mesmo modo que anteriormente, os resultados das medidas de 5-HT e 5-HIAA expressos em pg/mg de tecido úmido (figura 6) ou pg/ng de proteína (figura 5) apresentaram o mesmo perfil. Os valores numéricos das medidas de 5-HT e 5-HIAA, representados pelas barras das figuras 5 e 6, estão demonstrados na **tabela 2**.

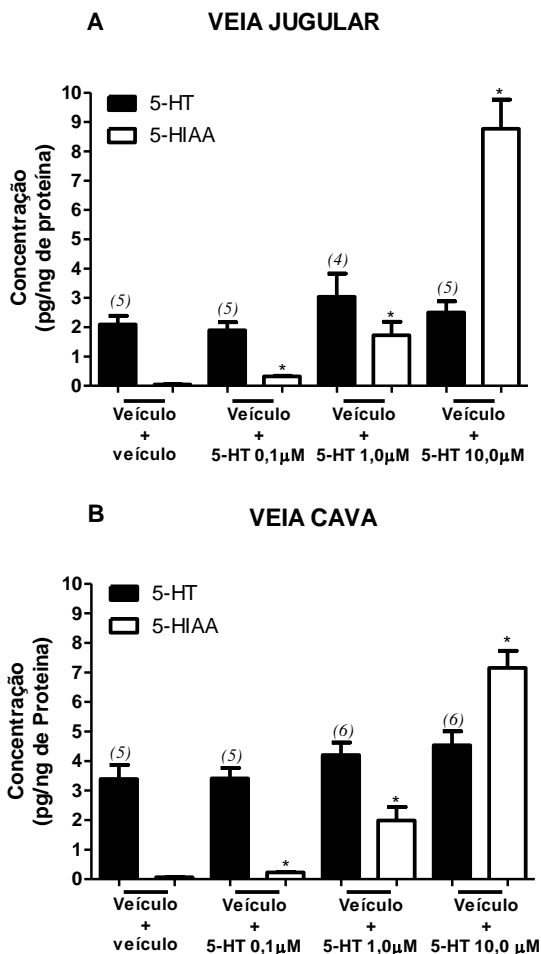


Figura 5 – Níveis de 5-HT e 5-HIAA após a exposição a veículo ou a concentrações crescentes de 5-HT exógena (pg/ng de proteína). Os anéis de veia jugular (A) e de veia cava (B) foram expostos a veículo por 30 min seguidos da exposição a veículo (veículo + veículo) ou 5-HT (veículo + 5-HT nas diferentes concentrações) por mais 15 min. Os resultados das medidas de 5-HT e 5-HIAA obtidos por HPLC foram expressos como pg/ng de proteína. As barras representam a média \pm EPM dos valores obtidos em pg/ng proteína). * $P < 0.05$ vs. veículo + veículo (teste t de Student). (n).

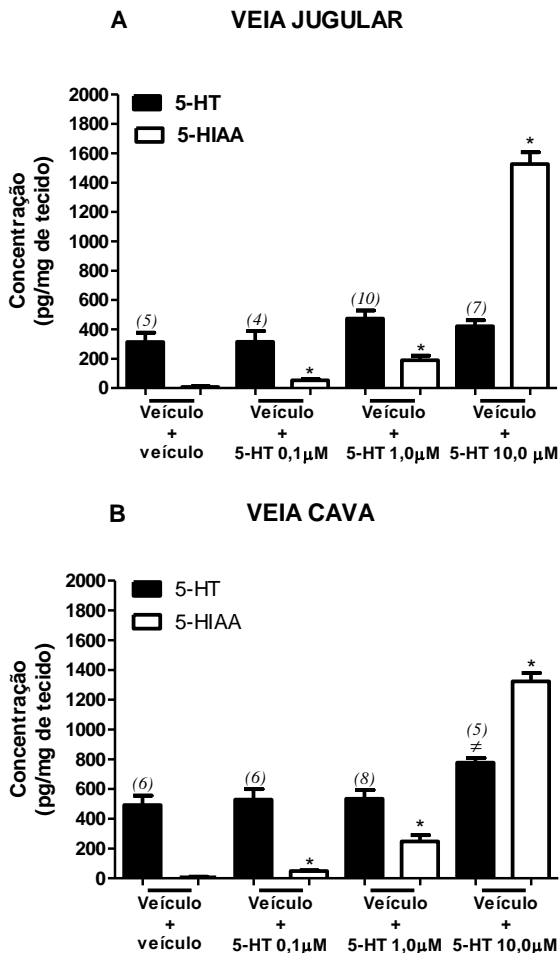


Figura 6 – Níveis de 5-HT e 5-HIAA após a exposição a veículo ou a concentrações crescentes de 5-HT exógena (pg/mg de tecido úmido). Os anéis de veia jugular (A) e de veia cava (B) foram expostos a veículo por 30 min seguidos da exposição a veículo (veículo + veículo) ou 5-HT (veículo + 5-HT nas diferentes concentrações) por mais 15 min. Os resultados das medidas de 5-HT e 5-HIAA obtidos por HPLC foram expressos como pg/mg de tecido úmido. As barras representam a média \pm EPM dos valores obtidos em pg/mg de tecido úmido (A,B) ou em pg/ng proteína (B,D). * e \neq $P < 0.05$ vs. veículo + veículo (teste t de Student). (n).

Tabela 2. Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos na presença de diferentes concentrações de 5-HT

Avaliação da captação em diferentes concentrações de 5-HT	jugular (pg/mg proteína)	Veículo + veículo	5-HT	2,092 ± 0,2950
			5-HIAA	0,044 ± 0,0083
		Veículo + 5-HT 0,1 µM	5-HT	1,897 ± 0,2730
			5-HIAA	0,323 ± 0,0180 *
		Veículo +5-HT 1,0 µM	5-HT	3,036 ± 0,7948
			5-HIAA	1,724 ± 0,4588 *
	Veículo +5-HT 10,0 µM	5-HT	2,505 ± 0,3783	
		5-HIAA	8,771 ± 0,9936 *	
	cava (pg/mg proteína)	Veículo + veículo	5-HT	3,394 ± 0,4760
			5-HIAA	0,064 ± 0,0087
		Veículo + 5-HT 0,1 µM	5-HT	3,410 ± 0,3576
			5-HIAA	0,228 ± 0,0145 *
		Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	4,203 ± 0,4249
			5-HIAA	1,989 ± 0,4585 *
	Veículo + 5-HT 10,0 µM	5-HT	4,532 ± 0,4729	
		5-HIAA	7,151 ± 0,5790 *	
	jugular (pg/mg tecido)	Veículo + veículo	5-HT	314,1 ± 62,80
			5-HIAA	8,187 ± 3,628
Veículo + 5-HT 0,1 µM		5-HT	316,0 ± 73,27	
		5-HIAA	52,79 ± 6,770 *	
Veículo + 5-HT 1,0 µM		5-HT	473,5 ± 54,50	
		5-HIAA	189,3 ± 31,05 *	
Veículo + 5-HT 10,0 µM	5-HT	421,6 ± 41,07		
	5-HIAA	1527 ± 80,71 *		
	Veículo + veículo	5-HT	492,2 ± 62,59	

cava (pg/mg proteína)		5-HIAA	6,676 ± 3,656
	Veículo +	5-HT	528,9 ± 69,70
	5-HT 0,1 μM	5-HIAA	48,92 ± 4,563 *
	Veículo +	5-HT	533,8 ± 59,99
	5-HT 1,0 μM	5-HIAA	247,1 ± 43,38 *
	Veículo +	5-HT	776,7 ± 31,30 ≠
	5-HT 10,0 μM	5-HIAA	1323 ± 57,71 *

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido ou ng/mg de proteína em veia jugular e cava de ratos. * e ≠ $P < 0.05$ vs. veículo + veículo (teste t de Student).

Captação de 5-HT na presença de diferentes concentrações de pargilina

Foram determinados os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular incubada com diferentes concentrações do inibidor da enzima MAO, pargilina, por 30 min seguido da exposição à 5-HT 1 μ M por 15 min e comparados aos resultados obtidos na ausência de pargilina. Os resultados demonstram que os níveis de 5-HT e de 5-HIAA obtidos na presença de pargilina 1 μ M não foram diferentes daqueles observados na ausência de pargilina. No entanto, na presença de concentrações crescentes de pargilina, foi observada uma diminuição dos níveis de 5-HIAA acompanhado de um aumento nos níveis de 5-HT. Os valores numéricos das concentrações de 5-HT e 5-HIAA representados pelas barras da **figura 7** estão apresentados na **tabela 3**.

VEIA JUGULAR

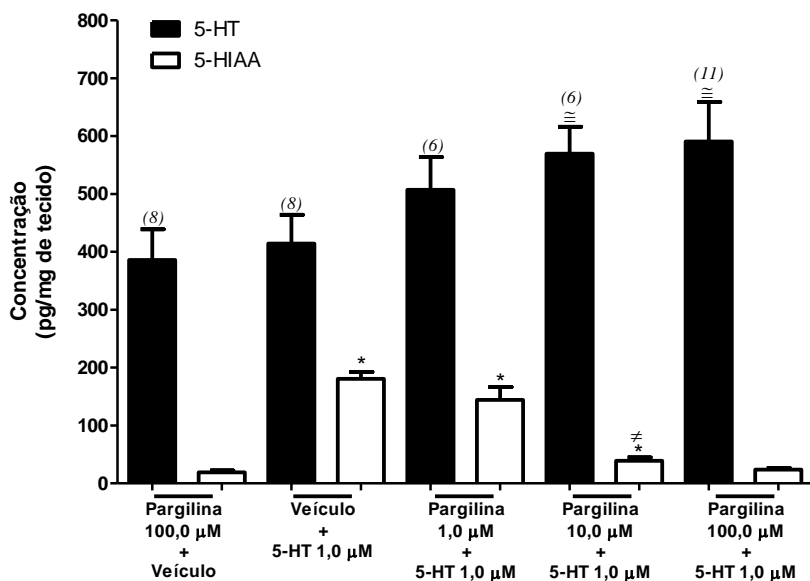


Figura 7 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de diferentes concentrações de pargilina. Os anéis de veia jugular foram expostos a veículo ou pargilina em diferentes concentrações por 30 min antes da exposição à 5-HT (1 μM) (veículo + 5-HT; pargilina + 5-HT, respectivamente) ou veículo (pargilina + veículo) por 15 min. As barras representam a média ± EPM dos valores de 5-HT e de 5-HIAA obtidos em pg/mg de tecido úmido. * $P < 0.05$, e $\cong P < 0.05$ vs. (pargilina 100,0 μM + veículo). # $P < 0.05$ vs. (veículo + 5-HT 1,0 μM) (teste t de Student). (n).

Tabela 3. Quantificação de 5-HT e 5-HIAA na presença de pargilina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.
Determinação da captação de 5-HT na presença de diferentes concentrações de pargilina	jugular (pg/mg tecido)	Veículo + pargilina 100,0 µM	5-HT 386,0 ± 53,00
			5-HIAA 19,16 ± 3,050
		Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT 414,2 ± 49,92
			5-HIAA 180,5 ± 12,07 *
		pargilina 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT 507,1 ± 56,87
			5-HIAA 144,4 ± 21,91 *
		pargilina 10,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT 569,8 ± 46,34 ≅
			5-HIAA 39,02 ± 5,930 * ≠
		pargilina 100,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT 590,6 ± 68,29 ≅
			5-HIAA 23,63 ± 3,087

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia jugular de rato. * $P < 0,05$, e $\cong P < 0,05$ vs. (pargilina 100,0 µM + veículo). $\neq P < 0,05$ vs. (veículo + 5-HT 1,0 µM) (teste t de Student).

Avaliação da captação de 5-HT em diferentes concentrações de 5-HT exógena na presença de Pargilina

Foram determinados os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular e veia cava frente à exposição à 5-HT em diferentes concentrações (0,1 μM , 1 μM e 10 μM) na presença de pargilina 100 μM administrada 30 min antes da 5-HT. Como podemos observar na **figura 8**, a exposição a concentrações crescentes de 5-HT exógena, na presença de pargilina, ocasionou um aumento nos níveis de 5-HT dependente da concentração sem alteração nos níveis de 5-HIAA em relação ao controle (pargilina + veículo). Os valores numéricos destes experimentos, representados por barras na figura 8, estão demonstrados na **tabela 4**.

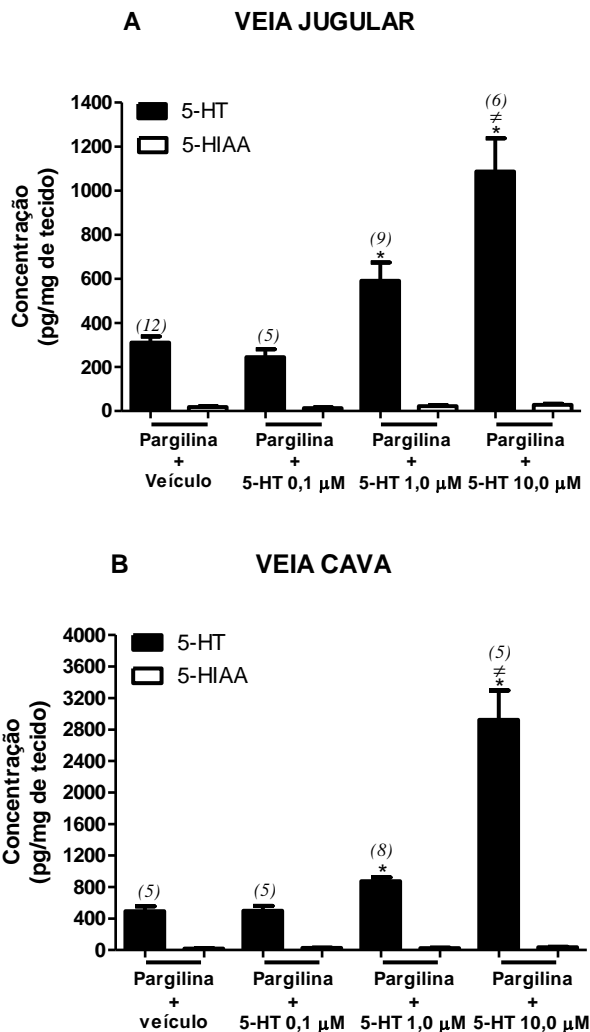


Figura 8 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de Pargilina. As barras representam os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular (A) e veia cava (B) incubadas com Pargilina 100 µM por 30 min seguidos da exposição a diferentes concentrações de 5-HT (0,1 µM, 1,0 µM e 10 µM), (pargilina + 5-HT) ou veículo (pargilina + veículo) por 15 min. As barras representam a média ± EPM dos valores de 5-HT e 5-HIAA expressos como pg/mg de tecido úmido. * $P < 0.05$ vs. (pargilina + veículo); ≠ $P < 0.05$ vs. (pargilina + 5-HT 0,1 µM) (teste t de Student). (n).

Tabela 4. Quantificação de 5-HT e 5-HIAA frente a exposição à 5-HT exógena na presença de pargilina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.	
Determinação da captação de 5-HT na presença de Pargilina	jugular (pg/mg tecido)	pargilina 100,0 µM + veículo	5-HT 5-HIAA	310,9 ± 27,65 18,71 ± 2,942
		Pargilina 100,0 µM + 5-HT 0,10 µM	5-HT	244,1 ± 36,43
			5-HIAA	13,74 ± 2,166
		pargilina 100,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	591,4 ± 82,59 *
	5-HIAA		22,68 ± 3,728	
	pargilina 100,0 µM + 5-HT 10,0 µM	5-HT	1087 ± 149,9 *≠	
		5-HIAA	28,16 ± 4,944	
	cava (pg/mg tecido)	pargilina 100,0 µM + Veículo	5-HT	492,2 ± 62,59
			5-HIAA	18,34 ± 2,136
		Pargilina 100,0 µM + 5-HT 0,10 µM	5-HT	499,4 ± 59,80
			5-HIAA	27,95 ± 2,563
		pargilina 100,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	874,5 ± 47,79 *
			5-HIAA	24,62 ± 4,557
	pargilina 100,0 µM + 5-HT 10,0 µM	5-HT	2923 ± 371,1 *≠	
5-HIAA		27,75 ± 2,327		

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia jugular e cava de ratos. * $P < 0.05$ vs. (pargilina + veículo); ≠ $P < 0.05$ vs. (pargilina + 5-HT 0,1 µM) (teste t de Student).

Determinação da captação de 5-HT na presença de fluoxetina

A **figura 9** mostra os níveis de 5-HT e 5-HIAA nas veias expostas à 5-HT exógena (1 μ M; 15 min) na ausência e presença do inibidor seletivo de 5-HT, fluoxetina (1 μ M), administrada 30 min antes da 5-HT. Como já vimos anteriormente (figuras 3 e 4) e repetimos aqui, a exposição à 5-HT em tecidos que receberam veículo antes da 5-HT promove um aumento nos níveis de 5-HIAA mas não de 5-HT. Quando a exposição à 5-HT foi realizada em tecidos que receberam fluoxetina no lugar do veículo antes da 5-HT, os níveis de 5-HT e de 5-HIAA não foram diferentes daqueles obtidos nos tecidos em que a fluoxetina era substituída por veículo. Os valores numéricos destes experimentos, representados por barras na figura 9, estão demonstrados na **tabela 5**.

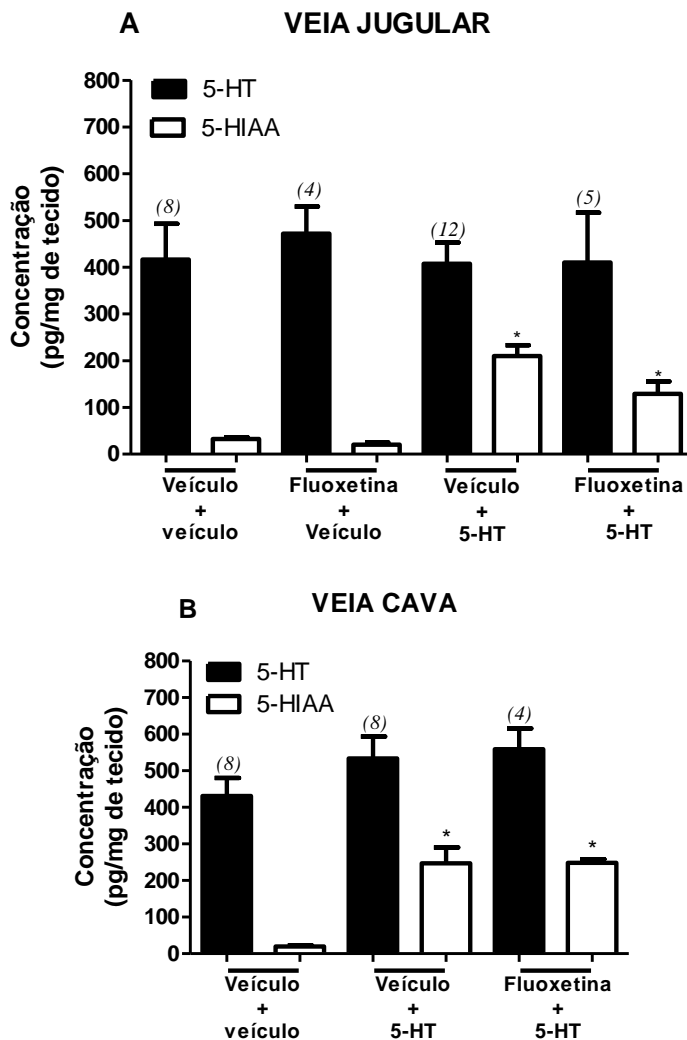


Figura 9 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de fluoxetina. As barras representam os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular (A) e veia cava (B) incubadas com veículo ou fluoxetina (1 μ M) por 30 min seguidos da exposição a veículo (veículo + veículo; fluoxetina + veículo) ou 5-HT (1 μ M) (veículo + 5-HT; fluoxetina + 5-HT) por 15 min. As barras representam a média \pm EPM dos valores de 5-HT e 5-HIAA expressos em pg/mg de tecido úmido. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo) (teste t). (n).

Tabela 5. Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de fluoxetina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.	
Determinação da captação de 5-HT na presença de fluoxetina	jugular (pg/mg tecido)	Veículo + veículo	5-HT	416,4 ± 76,46
			5-HIAA	32,34 ± 3,999
		Fluoxetina 1,0 µM + veículo	5-HT	471,8 ± 57,88
			5-HIAA	20,56 ± 4,623
		Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	407,2 ± 45,49
			5-HIAA	209,8 ± 23,41 *
	cava (pg/mg tecido)	Fluoxetina 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	410,0 ± 106,7
			5-HIAA	129,0 ± 26,75 *
		Veículo + veículo	5-HT	431,2 ± 48,94
			5-HIAA	19,54 ± 2,798
		Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	533,8 ± 59,99
			5-HIAA	247,1 ± 43,38 *
Fluoxetina 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	558,7 ± 57,21		
	5-HIAA	248,7 ± 9,432 *		

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia jugular e cava de ratos. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo) (teste t).

Determinação da captação de 5-HT na presença de imipramina

A **figura 10** mostra os níveis de 5-HT e 5-HIAA nas veias expostas à 5-HT exógena (1 μ M; 15 min) na ausência e presença do inibidor da captação de 5-HT e NE, imipramina (1 μ M), administrado 30 min antes da 5-HT. A exposição à 5-HT promoveu um aumento nos níveis de 5-HIAA, mas não de 5-HT, conforme já demonstrado anteriormente e aqui repetido para efeitos comparativos. Os níveis de 5-HT e de 5-HIAA obtidos em presença de imipramina não foram diferentes daqueles obtidos nos tecidos em que a imipramina era substituída por veículo. Os valores numéricos destes experimentos, representados por barras na figura 10, estão demonstrados na **tabela 6**.

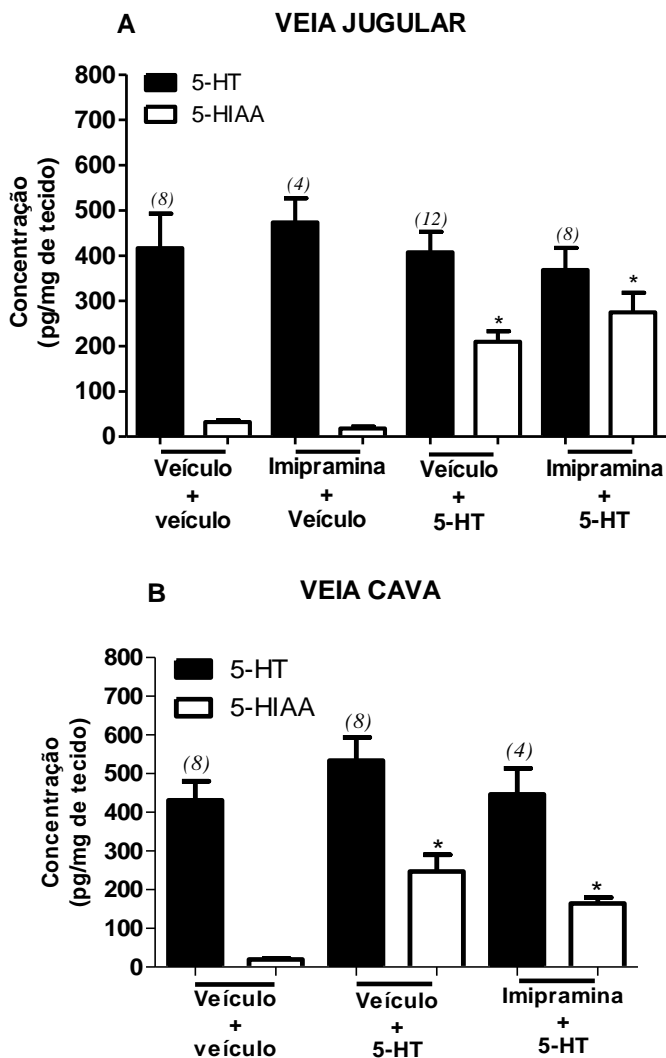


Figura 10 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de imipramina. As barras representam os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular (A) e veia cava (B) incubadas com veículo ou imipramina (1 μ M) por 30 min seguidos da exposição a veículo (veículo + veículo; imipramina + veículo) ou 5-HT (1 μ M) (veículo + 5-HT; imipramina + 5-HT) por 15 min. As barras representam a média \pm EPM dos valores de 5-HT e 5-HIAA expressos em pg/mg de tecido úmido. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo) (teste t de Student). (n).

Tabela 6. Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de imipramina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.	
Determinação da captação de 5-HT na presença de imipramina	jugular (pg/mg tecido)	Veículo + veículo	5-HT	416,4 ± 76,46
			5-HIAA	32,34 ± 3,999
		Imipramina 1,0 µM + veículo	5-HT	473,2 ± 53,66
			5-HIAA	18,28 ± 3,728
		Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	407,2 ± 45,49
			5-HIAA	209,8 ± 23,41 *
	cava (pg/mg tecido)	Imipramina 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	368,4 ± 48,55
			5-HIAA	274,6 ± 43,06 *
		Veículo + veículo	5-HT	431,2 ± 48,94
			5-HIAA	19,54 ± 2,798
		Veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	533,8 ± 59,99
			5-HIAA	247,1 ± 43,38 *
Imipramina 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	446,4 ± 67,26		
	5-HIAA	164,6 ± 15,25 *		

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia jugular e cava de ratos. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo) (teste t de Student).

Determinação da captação de 5-HT na presença de desipramina

A **figura 11** mostra os níveis de 5-HT e 5-HIAA nas veias expostas à 5-HT exógena (1 μ M; 15 min) na ausência e presença do inibidor da captação de NE e 5-HT, desipramina (1 μ M), administrado 30 min antes da 5-HT. Utilizamos os mesmos dados da figura anterior mostrando que a exposição a exposição à 5-HT promove um aumento nos níveis de 5-HIAA mas não de 5-HT. Os níveis de 5-HT e de 5-HIAA obtidos em presença de desipramina não foram diferentes daqueles obtidos nos tecidos em que a desipramina era substituída por veículo. Os valores numéricos destes experimentos, representados por barras na figura 11, estão demonstrados na **tabela 7**.

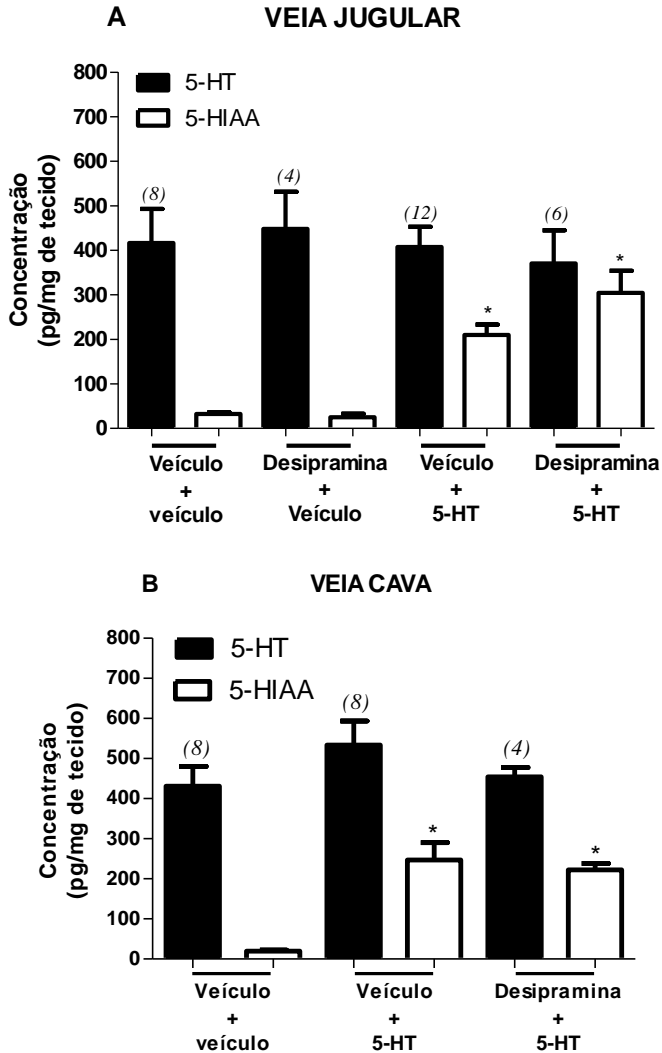


Figura 11 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de desipramina. As barras representam os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular (A) e veia cava (B) incubadas com veículo ou desipramina (1 μ M) por 30 min seguidos da exposição a veículo (veículo + veículo, desipramina + veículo) ou 5-HT (1 μ M) (veículo + 5-HT; desipramina + 5-HT) por 15min. As barras representam a média \pm EPM dos valores de 5-HT e 5-HIAA expressos em pg/mg de tecido úmido. * $P < 0.05$ vs (veículo + veículo) (teste t de Student). (n).

Tabela 7. Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de desipramina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.	
Determinação da captação de 5-HT na presença de desipramina	jugular (pg/mg tecido)	Veículo + veículo	5-HT	416,4 ± 76,46
			5-HIAA	32,34 ± 3,999
		desipramina 1,0 µM + veículo	5-HT	447,8 ± 83,85
			5-HIAA	25,15 ± 8,046
		veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	407,2 ± 45,49
			5-HIAA	209,8 ± 23,41 *
	cava (pg/mg tecido)	desipramina 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	370,5 ± 74,19
			5-HIAA	304,5 ± 49,56 *
		veículo + veículo	5-HT	431,2 ± 48,94
			5-HIAA	19,54 ± 2,798
		veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	533,8 ± 59,99
			5-HIAA	247,1 ± 43,38 *
desipramina 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	454,5 ± 23,03		
	5-HIAA	222,6 ± 15,97 *		

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia jugular e cava de ratos. * $P < 0.05$ vs (veículo + veículo) (teste t de Student).

Determinação da captação de 5-HT na presença de cocaína

A **figura 12** mostra os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia cava expostas à 5-HT exógena (1 μ M; 15 min) na ausência e presença do inibidor da captação de DA, NA e 5-HT, cocaína (1 μ M), administrado 30 min antes da 5-HT. Utilizamos os mesmos dados da figura anterior, para veia cava, mostrando que a exposição à 5-HT promove um aumento nos níveis de 5-HIAA mas não de 5-HT. Os níveis de 5-HT e de 5-HIAA obtidos em presença de cocaína não foram diferentes daqueles obtidos nos tecidos em que a cocaína era substituída por veículo. Os valores numéricos destes experimentos, representados por barras na figura 12, estão demonstrados na **tabela 8**.

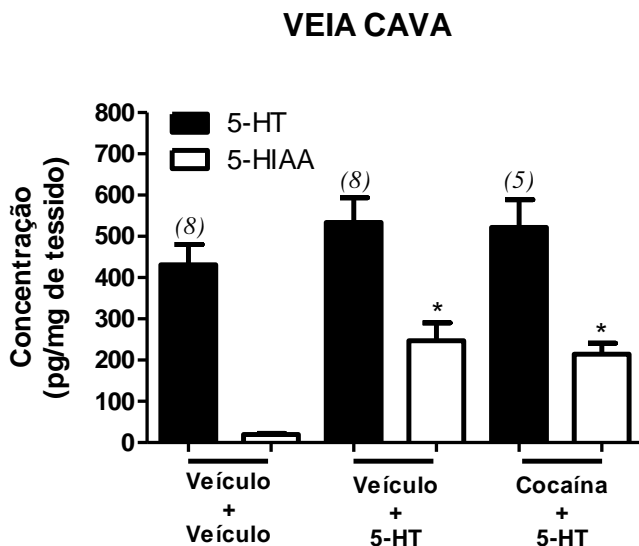


Figura 12 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de cocaína. As barras representam os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia cava incubada com veículo ou cocaína (1 μ M) por 30 min seguidos da exposição a veículo (veículo + veículo) ou 5-HT (1 μ M) (veículo + 5-HT; cocaína + 5-HT) por 15 min. As barras representam a média \pm EPM dos valores de 5-HT e 5-HIAA expressos em pg/mg de tecido úmido. * $P < 0.05$ vs (veículo + veículo) (teste t de Student). (n).

Tabela 8. Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava de ratos expostas à 5-HT na presença de cocaína

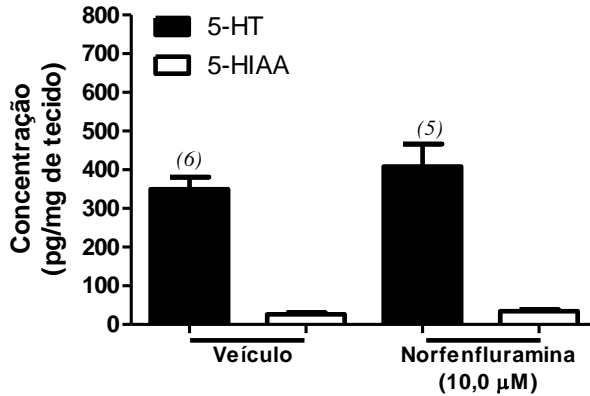
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.
Determinação da captação de 5-HT na presença de cocaína	cava (pg/mg tecido)	veículo + veículo	5-HT 431,2 ± 48,94
			5-HIAA 19,54 ± 2,798
	veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	533,8 ± 59,99
		5-HIAA	247,1 ± 43,38 *
		cocaína 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT 521,7 ± 67,04
			5-HIAA 214,3 ± 26,47 *

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia cava de ratos. * $P < 0.05$ vs (veículo + veículo) (teste t de Student).

Determinação da liberação de 5-HT na presença de norfenfluramina

Foram determinados os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular incubada com veículo ou com o substrato do SERT, norfenfluramina (10 μ M) por 30 min. Também foram determinados os níveis de 5-HT e 5-HIAA na solução fisiológica que conteve os vasos durante a incubação para observar se houve liberação de 5-HT por norfenfluramina. Na **figura 13** podemos observar que os níveis de 5-HT e de 5-HIAA obtidos em presença de norfenfluramina não foram diferentes daqueles obtidos nos tecidos ou na solução fisiológica em que a norfenfluramina era substituída por veículo. Os valores numéricos destes experimentos, representados por barras na figura 13, estão demonstrados na **tabela 9**.

A VEIA JUGULAR



B SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

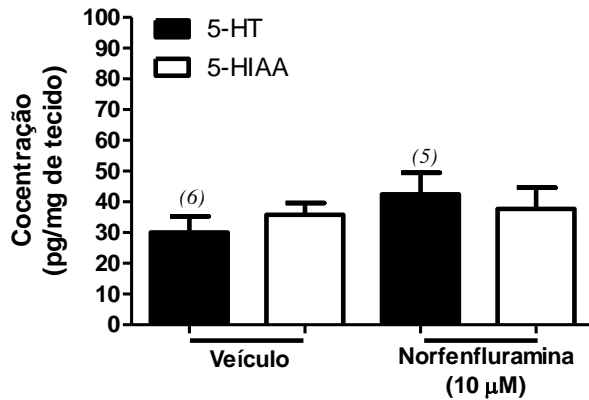


Figura 13 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de norfenfluramina. As barras representam os níveis de 5-HT e 5-HIAA em veia jugular (A) e na solução fisiológica (B) que banhava os tecidos incubados com veículo ou norfenfluramina (10 µM) por 30 min. As barras representam a média ± EPM dos valores de 5-HT e 5-HIAA expressos em pg/mg de tecido úmido. (n).

Tabela 9. Quantificação de 5-HT e 5-HIAA frente à exposição à norfenfluramina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.	
Determinação da captação de 5-HT na presença de norfenfluramina	jugular (pg/mg tecido)	Veículo + veículo	5-HT	349,7 ± 30,98
			5-HIAA	26,56 ± 3,632
		Veículo + Norfenfluramina 10,0 µM	5-HT	408,6 ± 57,82
			5-HIAA	34,03 ± 4,407
	Solução fisiológica (pg/mg tecido)	Veículo + veículo	5-HT	30,05 ± 5,282
			5-HIAA	35,79 ± 3,802
		Veículo + Norfenfluramina 10,0 µM	5-HT	42,43 ± 7,001
			5-HIAA	37,67 ± 6,994

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia jugular e na solução fisiológica que conteve o vaso.

Determinação da captação de 5-HT na presença de decynium-22

A **figura 14** mostra os níveis de 5-HT e 5-HIAA na veia jugular e na veia cava expostas à 5-HT exógena (1,0 μM ; 15 min) na ausência e presença do inibidor de OCT, decynium-22 (10,0 μM) administrado 30 min antes da 5-HT. A exposição à 5-HT promoveu um aumento nos níveis de 5-HIAA, mas não de 5-HT naqueles tecidos que receberam veículo antes de 5-HT conforme já demonstrado anteriormente e aqui repetido para fins comparativos. Nos tecidos que receberam decynium-22, antes da administração de 5-HT exógena observamos que houve um aumento nos níveis de 5-HIAA, mas não de 5-HT. Entretanto, esse aumento nos níveis de 5-HIAA em presença de decynium 22 na concentração de 10,0 μM foi significativamente menor do que o aumento observado nos tecidos em que o decynium 22 era substituído por veículo. Os valores numéricos destes experimentos, representados por barras na figura 14, estão demonstrados na **tabela 10**.

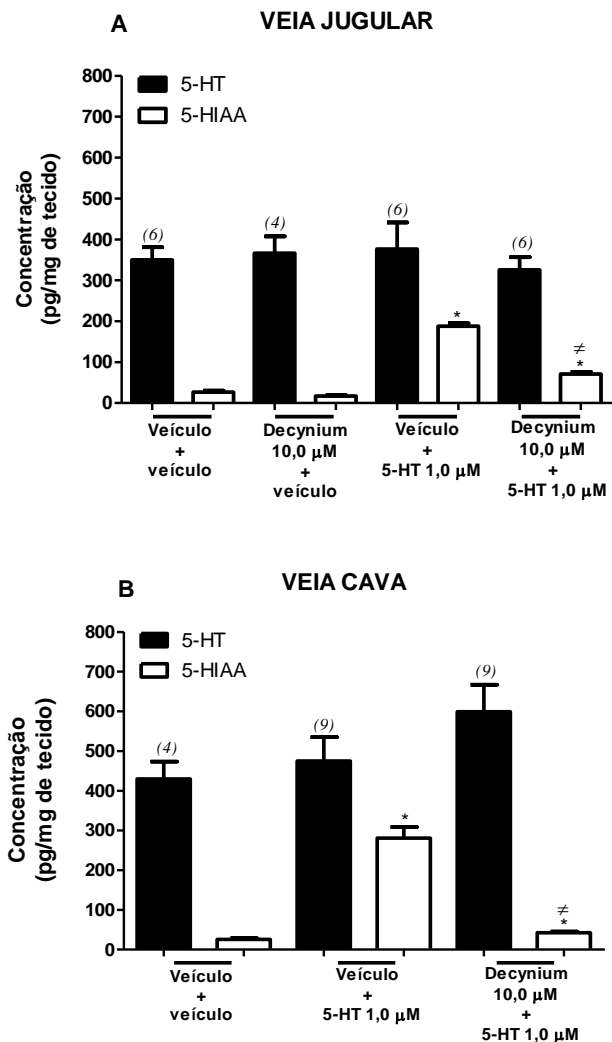


Figura 14 – Quantificação de 5-HT e 5-HIAA em presença de decynium-22. As barras representam os níveis de 5-HT e 5-HIAA na veia jugular (A) e na veia cava (B) incubadas com veículo ou decynium 22 (10 μM) por 30 min seguidos da exposição a veículo (veículo + veículo, decynium + veículo) ou 5-HT (1 μM) (veículo + 5-HT; decynium + 5-HT) por 15min. As barras representam a média ± EPM dos valores de 5-HT e 5-HIAA expressos em pg/mg de tecido úmido. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo). ≠ $P < 0.05$ vs. (veículo + 5-HT 1,0 μM) (teste t de Student). (n).

Tabela 10. Quantificação de 5-HT e 5HIAA em veia cava e jugular de ratos expostas à 5-HT na presença de decynium-22

PROTOCOLO EXPERIMENTAL	Vaso		Média ± EPM.	
Determinação da captação de 5-HT na presença de decynium	jugular (pg/mg tecido)	veículo + veículo	5-HT	349,7 ± 30,98
			5-HIAA	26,56 ± 3,632
		decynium 1,0 µM + veículo	5-HT	366,0 ± 41,13
			5-HIAA	17,07 ± 2,034
		veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	376,4 ± 65,07
			5-HIAA	187,8 ± 7,276 *
	cava (pg/mg tecido)	decynium-22 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	325,6 ± 30,84
			5-HIAA	70,77 ± 5,470 *≠
		veículo + veículo	5-HT	349,7 ± 30,98
			5-HIAA	26,56 ± 3,632
		veículo + 5-HT 1,0 µM	5-HT	376,4 ± 65,07
			5-HIAA	187,8 ± 7,276 *
decynium-22 1,0 µM + 5-HT 1,0 µM	5-HT	325,6 ± 30,84		
	5-HIAA	70,77 ± 5,470 *≠		

Os valores representam a média +/- EPM dos valores de 5-HT ou de 5-HIAA obtidos por HPLC e expressos nas razões de pg/mg de tecido em veia jugular e cava de ratos. * $P < 0.05$ vs. (veículo + veículo). ≠ $P < 0.05$ vs. (veículo + 5-HT 1,0 µM) (teste t de Student).

4.2 Avaliação da reatividade vascular da veia jugular

Curvas concentração resposta para 5-HT

A **figura 15** mostra duas curvas concentração resposta estimuladas por 5-HT no mesmo anel de veia jugular realizadas com intervalo de 60 min entre elas. A segunda curva concentração efeito foi realizada na presença de veículo, adicionado 30 min antes do início da mesma e foi comparada com a primeira curva concentração efeito, considerada controle. Como podemos observar, a 5-HT foi capaz de induzir contração dependente da concentração mesmo após um intervalo de 60 min da primeira curva concentração resposta. Entretanto, comparando as duas curvas concentração resposta para 5-HT, a segunda teve seu efeito máximo diminuído e apresentou deslocamento para a direita, representado por uma diferença entre os valores de pD₂. Os valores numéricos de pD₂ e efeito máximo estão expressos na **tabela 11**.

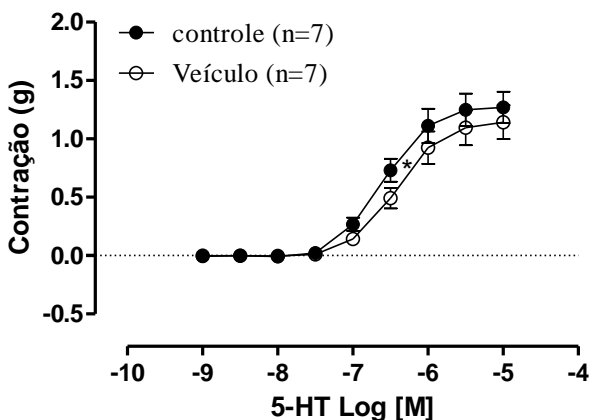


Figura 15 – Curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e presença de veículo em veia jugular de ratos. Anéis de veia jugular de ratos foram montados em câmara para órgão isolado contendo solução salina fisiológica (37 °C, sob aeração constante) para medidas da tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT (10^{-9} M a 10^{-5} M) foram adicionadas às preparações na ausência de veículo (controle) e na presença de veículo (água destilada) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média \pm EPM da resposta obtida em g de contração de n experimentos. * $P < 0,05$ pD₂ (controle) vs. pD₂ (veículo) (teste t de Student pareado). (n).

Tabela 11. Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo (teste)

Substâncias	pD2 (controle)	pD2 (teste)	Contração máxima (controle)	Contração máxima (teste)
veículo	6.593 ± 0.05406	6.404 ± 0.05550 *	1.269 ± 0.1340	1.143 ± 0.1448 * (7)

(*) P < 0.05 vs. controle do mesmo grupo (teste t de Student pareado). (n).

Resposta contrátil para 5-HT na presença de fluoxetina

A **figura 16** mostra duas curvas concentração resposta para 5-HT no mesmo anel de veia jugular realizadas com intervalo de 60 min entre elas. Diferentemente do protocolo realizado na figura 13, a segunda curva concentração efeito foi realizada na presença de fluoxetina nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM ou 1,0 μM adicionada 30 min antes da realização da segunda curva. Esta curva foi comparada com a primeira curva concentração efeito, considerada controle. As curvas concentração efeito induzidas por 5-HT na presença de fluoxetina nas concentrações de 0,1 μM e 1,0 μM , mas não na concentração de 0,01 μM , apresentaram diminuição no efeito máximo em relação à curva controle. Nas concentrações de 0,01 e 1,0 μM de fluoxetina, mas não na concentração de 0,1 μM , houve um deslocamento das curvas concentração efeito para a direita representado por uma diferença entre os valores de pD_2 . As diferenças entre os pD_2 estão representadas na **figura 17**, enquanto que os valores numéricos de pD_2 e efeito máximo estão expressos na **tabela 12**.

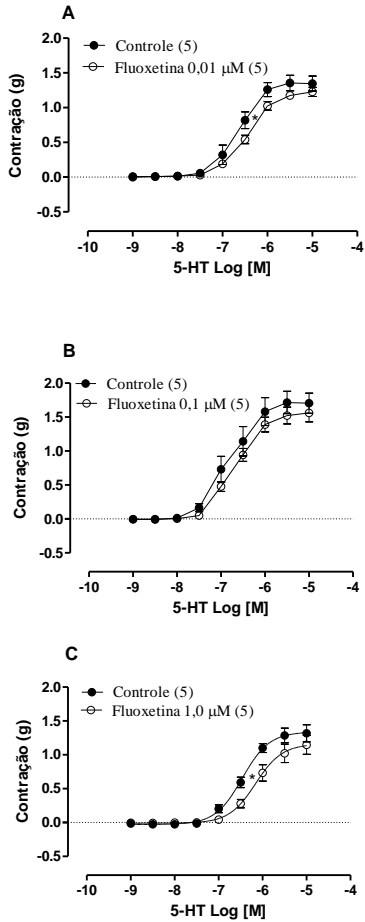


Figura 16 - Resposta contrátil para 5-HT na presença fluoxetina em veia jugular de ratos. Anéis de veia jugular de ratos foram montados em câmara para órgão isolado contendo solução salina fisiológica (37° C, sob aeração constante) para medidas da tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT (10^{-9} M a 10^{-5} M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) e na presença de fluoxetina nas concentrações de 0,01 μM (A); 0,1 μM (B) e 1,0 μM (C) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média \pm EPM da resposta obtida em g de contração de n experimentos. * $P < 0.05$ pD₂ (controle) vs. pD₂ (fluoxetina) (teste t de Student pareado). (n).

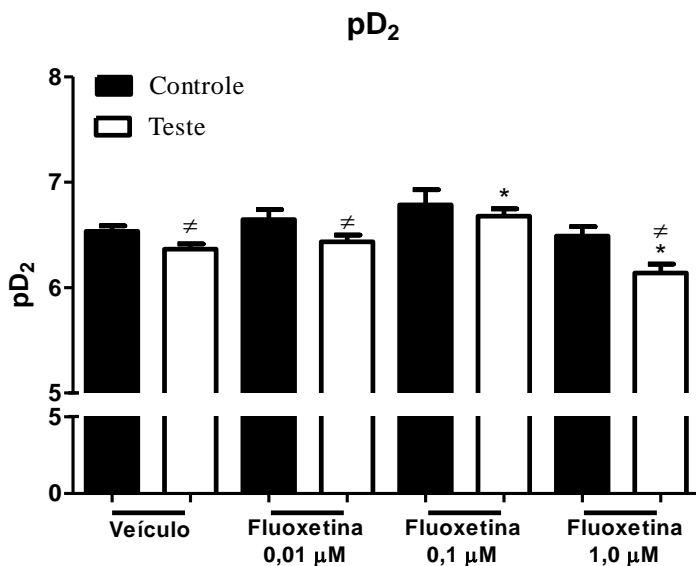


Figura 17 – pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou fluoxetina. As barras representam os valores de pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta de veia jugular para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo ou fluoxetina nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 μM (teste). As barras representam a média ± EPM dos valores de pD₂. * $P < 0.05$ vs. veículo (teste) (teste t); ≠ $P < 0.05$ vs. Controle dentro do mesmo grupo (teste t de Student pareado).

Tabela 12. Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de fluoxetina (teste)

Substâncias	pD2 (controle)	pD2 (teste)	Contração máxima (controle)	Contração máxima (teste)
fluoxetina 1,0 µM	6.490 ± 0.08872	6.139 ± 0.08495 [*]	1.318 ± 0.1265	1.147 ± 0.1393 ^{*(5)}
fluoxetina 0,1 µM	6.783 ± 0.1453	6.678 ± 0.06949	1.705 ± 0.1476	1.562 ± 0.1319 ^{*(5)}
fluoxetina 0,01 µM	6.645 ± 0.09455	6.434 ± 0.06403 [*]	1.346 ± 0.1075	1.227 ± 0.06515 ⁽⁷⁾

(*) P < 0.05 vs. controle do mesmo grupo (teste t de Student pareado). (n).

Resposta contrátil para 5-HT na presença de imipramina

A **figura 18** mostra duas curvas concentração resposta para 5-HT no mesmo anel de veia jugular realizadas com intervalo de 60 min entre elas. A segunda curva concentração efeito foi realizada na presença de imipramina nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM ou 1,0 μM administrada 30 min antes da realização da segunda curva e comparada à primeira curva controle. As curvas concentração efeito para 5-HT apresentaram uma diminuição na magnitude de contração máxima e foram desviadas para a direita em presença de imipramina em todas as concentrações utilizadas. As diferenças entre os pD₂ podem ser observadas na **figura 19**, enquanto que os valores de pD₂ e efeito máximo estão apresentados na **tabela13**. Os pD₂ das curvas concentração resposta da figura 15 (controle e veículo) foram repetidos para efeitos comparativos.

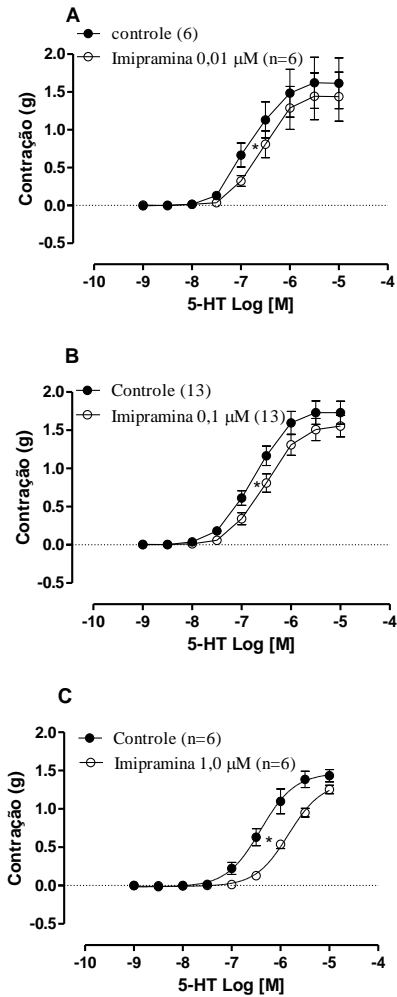


Figura 18 - Resposta contrátil para 5-HT na presença de imipramina em veia jugular de ratos. Anéis de veia jugular de ratos foram montados em câmara para órgão isolado contendo solução salina fisiológica (37 °C, sob aeração constante) para medidas da tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT (10^{-9} M a 10^{-5} M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) e na presença de imipramina nas concentrações de 0,01 μM (A); 0,1 μM (B) e 1,0 μM (C) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média ± EPM da resposta obtida em g de contração de n experimentos. * $P < 0.05$ pD₂ (controle) vs. pD₂ (na presença de imipramina) (teste t de Student pareado). (n).

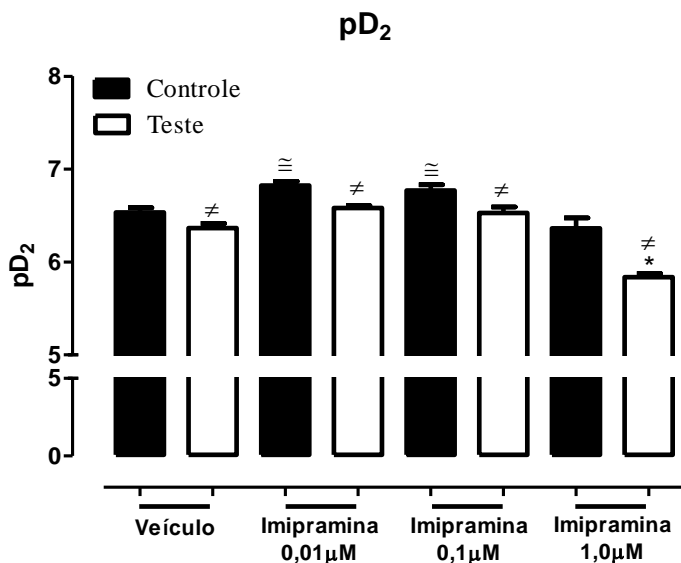


Figura 19 – pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou imipramina. As barras representam os valores de pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta de veia jugular para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo ou imipramina nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 µM (teste). As barras representam a média ± EPM dos valores de pD₂. ≡ $P < 0.05$ vs. veículo (controle); * $P < 0.05$ vs. veículo (teste) (teste t) e ≠ $P < 0.05$ vs. controle dentro do mesmo grupo (teste t pareado).

Tabela 13. Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de imipramina (teste)

Substâncias	pD2 (controle)	pD2 (teste)	Contração máxima (controle)	Contração máxima (teste)
imipramina 1,0 µM	6.362 ± 0.1132	5.836 ± 0.03949 *	1.433 ± 0.08051	1.253 ± 0.05497 * (6)
imipramina 0,1 µM	6.770 ± 0.06133	6.527 ± 0.06517 *	1.730 ± 0.1497	1.553 ± 0.1402 * (12)
imipramina 0,01 µM	6.822 ± 0.04644	6.581 ± 0.02564 *	1.615 ± 0.3348	1.439 ± 0.3244 * (6)

(*) P < 0.05 vs. controle do mesmo grupo (teste t de Student pareado). (n).

Resposta contrátil para 5-HT na presença de desipramina

A **figura 20** mostra duas curvas concentração resposta para 5-HT realizadas no mesmo anel de veia jugular com intervalo de 60 min entre elas que foram comparadas entre si. A primeira curva concentração efeito foi realizada na ausência (controle) e a segunda na presença de desipramina nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM ou 1,0 μM administrada 30 min antes da realização da segunda curva. As curvas concentração efeito para 5-HT apresentaram uma diminuição na magnitude de contração máxima e foram desviadas para a direita em presença de desipramina em todas as concentrações utilizadas. As diferenças entre os pD2 podem ser observadas na **figura 21**, enquanto que os valores numéricos de pD2 e efeito máximo estão apresentados na **tabela 14**. Os pD2 das curvas concentração resposta da figura 13 (controle e veículo) foram repetidos para efeitos comparativos.

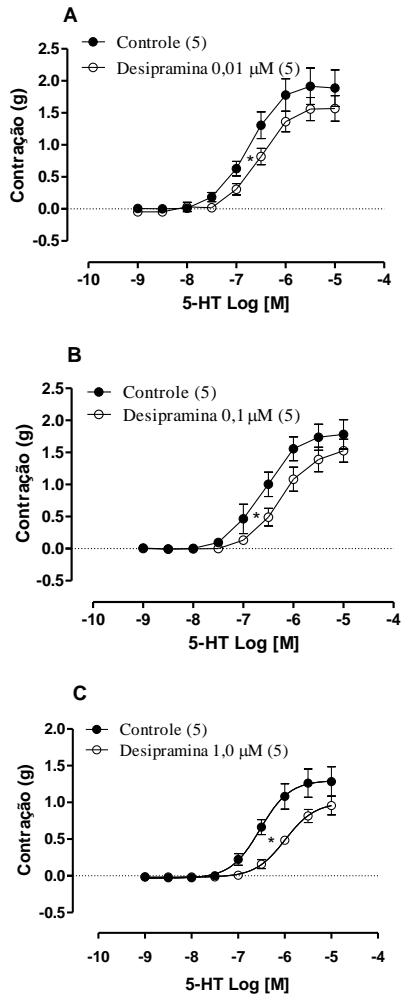


Figura 20 - Resposta contrátil para 5-HT na presença de desipramina em veia jugular de ratos. Anéis de veia jugular de ratos foram montados em câmara para órgão isolado contendo solução salina fisiológica (37 °C, sob aeração constante) para medidas da tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT (10^{-9} M a 10^{-5} M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) e na presença de desipramina nas concentrações de 0,01 μM (A); 0,1 μM (B) e 1,0 μM (C) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média ± EPM da resposta obtida em g de contração de n experimentos. * $P < 0.05$ pD_2 (controle) vs. pD_2 (na presença de desipramina) (teste t de Student pareado). (n).

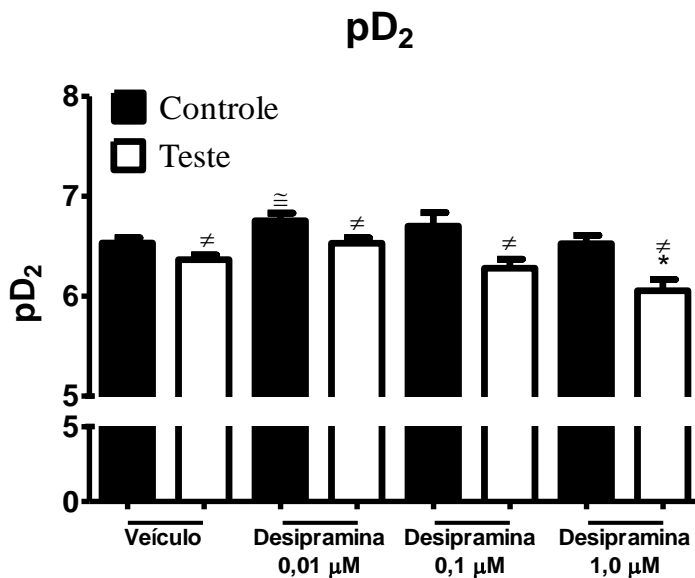


Figura 21 – pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou desipramina. As barras representam os valores de pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta de veia jugular para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo ou desipramina nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 µM (teste). As barras representam a média ± EPM dos valores de pD₂. ≅ $P < 0.05$ vs. veículo (controle); * $P < 0.05$ vs. veículo (teste) (teste t de Student); ≠ $P < 0.05$ vs. Controle dentro do mesmo grupo (teste t pareado).

Tabela 14. Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de desipramina (teste)

Substâncias	pD2 (controle)	pD2 (teste)	Contração máxima (controle)	Contração máxima (teste)
desipramina 1,0 µM	6.527 ± 0.08248	6.056 ± 0.1114*	1.284 ± 0.2008	0.9576 ± 0.1283* (5)
desipramina 0,1 µM	6.701 ± 0.1354	6.281 ± 0.09014*	1.831 ± 0.1831	1.596 ± 0.1550* (5)
desipramina 0,01 µM	6.755 ± 0.07797	6.531 ± 0.05287*	1.887 ± 0.2848	1.569 ± 0.1979* (5)

(*) P < 0.05 vs. controle do mesmo grupo (teste t de Student pareado) (n).

Curva concentração resposta para 5-HT na presença de pargilina

A **figura 22** mostra duas curvas concentração resposta estimuladas por 5-HT no mesmo anel de veia jugular realizadas com intervalo de 60 min entre elas e que foram comparadas entre si. A segunda curva concentração efeito foi realizada na presença de pargilina 100,0 μ M, adicionada 30 min antes do início da mesma e foi comparada com a primeira curva concentração efeito, considerada controle. Não foram observadas diferenças entre a curva controle e a curva realizada em presença de pargilina. Os pD₂ das curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de pargilina estão representados na Figura 21. Os pD₂ da figura 15 (controle e veículo) foram repetidos para efeitos comparativos. Os valores numéricos de pD₂ e efeito máximo estão expressos na **tabela 15**.

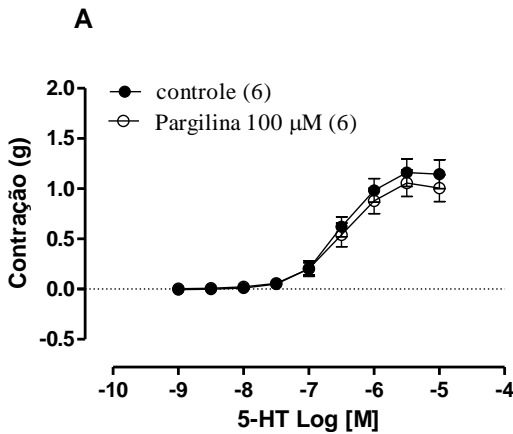


Figura 22 - Curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e presença de pargilina em veia jugular de ratos. Anéis de veia jugular de ratos foram montados em câmara para órgão isolado contendo solução salina fisiológica (37 °C, sob aeração constante) para medidas da tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT (10^{-9} M a 10^{-5} M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) e na presença de pargilina e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média \pm EPM da resposta obtida em g de contração de n experimentos.

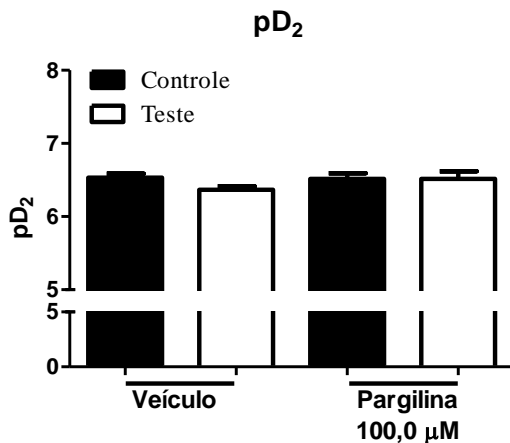


Figura 23 – pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou pargilina. As barras representam os valores de pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta de veia jugular para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo ou pargilina na concentração de 100 µM (teste). As barras representam a média ± EPM dos valores de pD₂.

Tabela 15. Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de pargilina (teste)

Substâncias	pD2 (controle)	pD2 (teste)	Contração máxima (controle)	Contração máxima (teste)
pargilina 100,0 μM	6.514 ± 0.07908	6.515 ± 0.1036	1.145 ± 0.1438	1.005 ± 0.1335 ⁽⁶⁾

(*) P < 0.05 vs. controle do mesmo grupo (teste t pareado). (n).

Curva concentração resposta para 5-HT na presença de decynium-22

A **figura 24** mostra duas curvas concentração resposta para 5-HT realizadas no mesmo anel de veia jugular com intervalo de 60 min entre elas e que foram comparadas entre si. Enquanto a primeira curva foi realizada na ausência (controle), a segunda curva foi realizada na presença de decynium-22 nas concentrações de 0,1 μM ; 1,0 μM ou 10,0 μM adicionado 30 min antes da realização da segunda curva. As curvas concentração efeito induzidas por 5-HT na presença de decynium apresentaram diminuição no efeito máximo em todas as concentrações. Não foram observadas diferenças nos valores de pD₂ entre as curvas controles e as curvas realizadas na presença de decynium para todas as concentrações testadas. Na **figura 25** estão representadas as médias dos valores de Pd₂, enquanto que os valores numéricos de pD₂ e efeito máximo estão apresentados na **tabela 16**. Os pD₂ das curvas concentração resposta da figura 15 (controle e veículo) foram repetidos para efeitos comparativos.

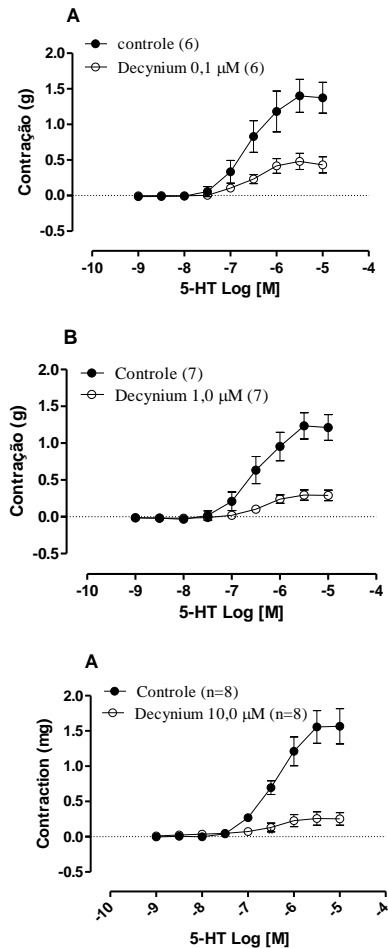


Figura 24 - Curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e presença de decynium-22 em veia jugular de ratos. Anéis de veia jugular de ratos foram montados em câmara para órgão isolado contendo solução salina fisiológica (37 °C, sob aeração constante) para medidas da tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT (10^{-9} M a 10^{-5} M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) e na presença de decynium-22 nas concentrações de 0,1 μM (A); 1,0 μM (B) e 10,0 μM (C) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média \pm EPM da resposta obtida em g de contração de n experimentos.

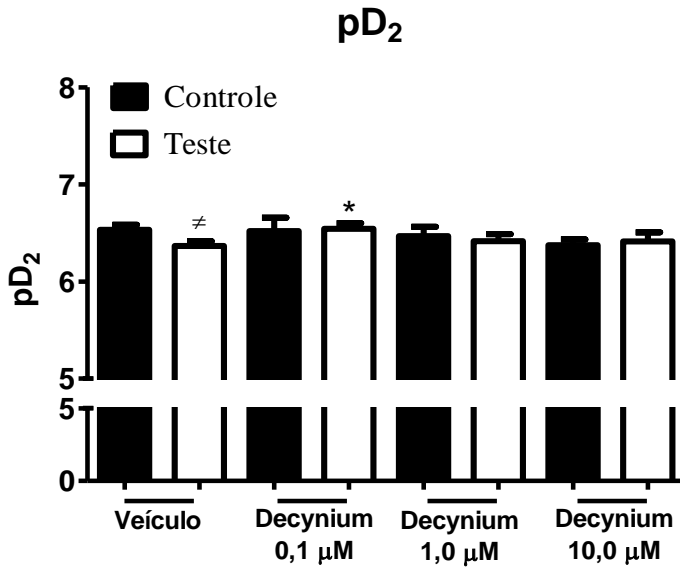


Figura 25 – pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência e na presença de veículo ou decynium-22. As barras representam os valores de pD₂ obtidos nas curvas concentração resposta de veia jugular para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo (teste) (Fig. 13) e na ausência (controle) e presença de decynium-22 nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 µM (teste) (Fig. 22). As barras representam a média ± EPM dos valores de pD₂. # *P* < 0.05 vs. Controle dentro do mesmo grupo (teste t pareado) e * *P* < 0.05 vs. veículo (teste) (teste t).

Tabela 16. Valores de pD2 e do efeito máximo obtidos nas duas curvas concentração resposta para 5-HT na ausência (controle) e na presença de veículo ou decynium-22 (teste)

Substâncias	pD2 (controle)	pD2 (teste)	Contração máxima (controle)	Contração máxima (teste)
decynium 10,0 µM	6.490 ± 0.059	6.413 ± 0.094	1.566 ± 0.249	0.252 ± 0.088 * (7)
decynium 1,0 µM	6.464 ± 0.096	6.415 ± 0.072	1.213 ± 0.174	0.290 ± 0.071 * (5)
decynium 0,1 µM	6.519 ± 0.1387	6.543 ± 0.058	1.375 ± 0.216	0.432 ± 0.112 * (4)

(*) P < 0.05 vs. controle do mesmo grupo (teste t pareado). (n).

DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos mecanismos de captação e metabolismo de 5-HT no sistema venoso

A partir da descoberta da 5-HT na década de 30, diversos estudos foram e vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de elucidar o papel da 5-HT nos diversos sistemas fisiológicos, contribuindo fundamentalmente para a compreensão do seu envolvimento em processos fisiopatológicos e também para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento destas patologias. No sistema cardiovascular, a 5-HT está amplamente distribuída. Recentemente, estudos demonstraram que veias e artérias possuem um sistema serotoninérgico funcional, ou seja, são capazes de sintetizar, captar e metabolizar a 5-HT (Linder, Ni *et al.*, 2008; Ni, Geddes *et al.*, 2008). Entretanto, a função deste sistema na vasculatura ainda não é totalmente compreendida.

Para avaliar a fisiologia do sistema serotoninérgico em veias, inicialmente padronizamos uma metodologia para quantificar a 5-HT e o seu metabólito 5-HIAA através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram determinados os níveis basais destas substâncias em veia jugular e veia cava de ratos e os resultados obtidos foram expressos em pg/mg de tecido úmido e em pg/ng de proteínas. A padronização do método de doseamento de 5-HT e 5-HIAA por HPLC demonstrou que houve reprodutibilidade dos resultados obtidos nas razões pg/mg de tecido úmido e pg/ng de proteína. A comparação dos mesmos demonstrou que houve semelhança no perfil das concentrações obtidas nas duas formas de expressão dos dados, assegurando que poderíamos optar pela utilização de uma das formas de expressão. Optamos então por expressar os resultados subsequentes em pg/mg de tecido úmido.

Comparando nossos resultados com aqueles da literatura (Linder, Ni *et al.*, 2008) observamos valores menores, apesar de apresentarem o mesmo perfil. Esta diferença pode ser justificada pelas diferenças entre os cromatógrafos utilizados, que possuem detectores diferentes, e pelos diferentes métodos de doseamento de proteínas utilizados; enquanto no presente trabalho utilizamos a metodologia de Bradford, Linder e colaboradores utilizaram a metodologia de Lowry (Linder, Ni *et al.*, 2008).

Assim como demonstrado por Linder e colaboradores a exposição dos tecidos à 5-HT causou um aumento dos níveis de 5-HIAA sem, no entanto, alterar os níveis de 5-HT. Considerando que a 5-HT é uma molécula protonada em pH fisiológico e incapaz de transpor as

membranas celulares nestas condições, e que a MAO é uma enzima intracelular encontrada principalmente na mitocôndria (Schnaitman e Greenawalt, 1968; Westlund, Krakower *et al.*, 1993), este resultado nos sugere que ocorre captação de 5-HT, através de uma proteína transportadora, seguida de rápido metabolismo.

Nós avaliamos a capacidade das veias de captar 5-HT em concentrações crescentes de incubação (figura 4). Os níveis de 5-HT permaneceram praticamente inalterados para todas as concentrações testadas. Entretanto, um aumento gradual dos níveis de 5-HIAA foi observado, demonstrando que a captação de 5-HT é dependente da sua concentração extracelular. Além disso, estes dados sugerem que veias são providas de uma capacidade considerável de metabolizar a 5-HT, o que mantém seus níveis intracelulares constantes mesmo quando expostas a altas concentrações de 5-HT. Estes resultados inéditos sugerem que as veias são providas de um mecanismo protetor contra eventuais aumentos excessivos da concentração intracelular de 5-HT. Considerando as funções intracelulares da 5-HT, é possível que este mecanismo esteja relacionado à proteção da célula contra uma excessiva serotonilação de proteínas. Serotonilação é um mecanismo de ativação de processos intracelulares que ocorre através da ligação covalente da 5-HT com proteínas. Estudos recentes demonstram que a serotonilação de proteínas contráteis do músculo liso de aorta está envolvida no processo de contração (Watts, Priestley *et al.*, 2009). Nas plaquetas, quando a concentração citoplasmática da serotonina atinge uma concentração aproximada a 12 μM , inicia-se um processo de serotonilação de algumas proteínas, dentre elas estão pequenas GTPases, com conseqüente liberação de substâncias pró-coagulantes dos grânulos α . Este fenômeno é observado em eventos trombóticos (Walther, Peter, Winter *et al.*, 2003). Considerando também que a concentração intracelular de 5-HT em veias é maior que em artérias (Linder, Ni *et al.*, 2008), as veias poderiam também, juntamente com as plaquetas, regular os níveis plasmáticos de 5-HT.

Artérias e veias de animais tratados com pargilina (*in vivo*) apresentam diminuição nos níveis intracelulares de 5-HIAA associada a um aumento nos níveis intracelulares de 5-HT (Ni e cols 2008; Linder e cols, 2008), indicando inibição do metabolismo da 5-HT. Entretanto, não há dados na literatura que avaliem a capacidade da pargilina de transpor a membrana celular ou ter ação *in vitro*. Nós avaliamos a capacidade da veia jugular de captar e metabolizar a 5-HT na presença de diferentes concentrações de pargilina *in vitro*. Os resultados mostram que a incubação com esta substância leva a uma inibição do

metabolismo que é dependente da concentração. Estes dados sugerem que a pargilina tem a capacidade de transpor a membrana celular ou agir *in vitro* e ainda que a enzima MAO está envolvida no processo de metabolismo da 5-HT em veias. Na maior concentração testada, a pargilina foi capaz de abolir o metabolismo de 5-HT. Quando o metabolismo de 5-HT estava inibido por pargilina e as veias foram expostas a concentrações crescentes de 5-HT houve um aumento intracelular de 5-HT que foi dependente da concentração da 5-HT exógena. Estes dados sugerem que as veias possuem a capacidade de armazenar 5-HT nestas condições e também que perdem aquela capacidade de tamponamento, visto que a concentração atinge níveis muito maiores que os basais. Tendo em vista estes resultados, podemos sugerir que o sistema serotoninérgico está presente no sistema venoso periférico, ou pelo menos, em dois diferentes vasos de grande calibre. Isto indica que o sistema venoso pode estar envolvido no controle dos níveis plasmáticos de 5-HT, juntamente com as plaquetas, ou servir como uma fonte de 5-HT para o plasma.

Investigamos os possíveis mecanismos de captação da 5-HT da veia jugular e da veia cava através da abordagem farmacológica. Para isto, utilizamos substâncias potencialmente capazes de inibir proteínas envolvidas no transporte de 5-HT. Dentre as proteínas investigadas incluímos os transportadores de monoaminas neurotransmissoras: SERT, DAT e NET, principais responsáveis pelo transporte de serotonina, dopamina e noradrenalina, respectivamente, em sistemas neuronais. Atualmente sabe-se que estes transportadores não estão restritos a sistemas neuronais e podem ser encontrados também em sistemas extraneuronais (Eisenhofer, 2001). Também investigamos os transportadores extraneuronais de monoaminas, os transportadores de cátions orgânicos OCT 1, OCT 2 e OCT 3.

Tendo em vista que o principal responsável pelo transporte de 5-HT em tecidos neuronais e nas plaquetas é o SERT, e que em tecidos neuronais o NET também pode participar do transporte de 5-HT (Ritz, Lamb *et al.*, 1987), avaliamos a captação de 5-HT em veias na presença de fluoxetina, um inibidor seletivo do SERT e também na presença dos antidepressivos tricíclicos imipramina e desipramina, inibidores do NET e SERT. Nossos resultados demonstraram que nenhuma das substâncias avaliadas foi capaz de alterar os níveis de 5-HT ou de 5-HIAA em relação ao controle, nos vasos submetidos à exposição de 5-HT exógena.

A ausência da inibição da captação de 5-HT por fluoxetina em veia cava e veia jugular já havia sido descrita previamente na literatura

(Linder, Ni *et al.*, 2008) e aqui confirmamos estes dados. A ausência da inibição da captação de 5-HT por imipramina e desipramina indicam que o NET não está envolvido neste processo, o que vai contra a nossa hipótese. Cocaína, inibidor de NET, DAT e SERT também não teve efeito na captação de 5-HT em veia cava. Sugerindo que além de SERT e do NET, o transportador de dopamina também não está envolvido na captação de 5-HT na veia cava.

A norfenfluramina é um derivado da anfetamina que age como substrato para SERT e Vmat e depleta os estoques intracelulares de 5-HT contido nas vesículas, liberando-a para o meio extracelular (Rothman e Baumann, 2002). Em presença desta substância, esperávamos que houvesse uma diminuição dos níveis intracelulares de 5-HT da veia jugular associado a um aumento proporcional na solução fisiológica que conteve o vaso. Entretanto, não foi observada alteração nos níveis de 5-HT do tecido testado em relação ao controle. Watts e colaboradores demonstraram em artérias que a 5-HT não está armazenada em vesículas, mas sim associada a proteínas intracelulares. Levando em consideração que a norfenfluramina age liberando 5-HT vesicular, podemos sugerir que 5-HT não é armazenada em vesículas em veias assim como as artérias ou que os estoques de 5-HT na veia jugular, se existirem, são insensíveis a este derivado anfetamínico. Estes dados também reforçam a hipótese de que outros transportadores, independentes do SERT, estão envolvidos no transporte de 5-HT na veia jugular, visto que esta substância é substrato para este transportador.

O decynium-22 é um derivado das isocianinas e um potente inibidor não seletivo dos transportadores de cátions orgânicos, que apresenta potência maior para o OCT 3 do que para o OCT 1 ou OCT2 (Schomig, Babin-Ebell *et al.*, 1993; Hayer-Zillgen, Bruss *et al.*, 2002). Estudos demonstram que o hipotálamo medial expressa OCTs e que a infusão de decynium-22 neste tecido é capaz de causar um aumento dos níveis locais de 5-HT (Gasser, Lowry *et al.*, 2006). Portanto, estes transportadores não estão restritos a tecidos extraneuronais e podem ser encontrados também no SNC. Nossos resultados demonstram que na presença desta substância os níveis de 5-HT permaneceram inalterados, porém, houve uma diminuição dos níveis de 5-HIAA, sugerindo a participação dos transportadores de cátions orgânicos na captação de 5-HT em veias. Curiosamente, mesmo na máxima concentração de decynium-22 testada, esta droga não foi capaz de inibir totalmente a captação de 5-HT nestes tecidos, o que sugere a participação de outros transportadores neste processo que merecem maior investigação.

5.2 Avaliação da reatividade vascular de veias e a influência de substâncias que interferem na homeostase da 5-HT.

Atualmente, drogas que atuam nos transportadores neuronais de monoaminas são amplamente usadas para tratar distúrbios do SNC. Alguns dos efeitos colaterais causados por algumas destas substâncias referem-se ao sistema cardiovascular, como por exemplo, a lentificação da condução intraventricular cardíaca e a hipotensão ortostática que estão associadas ao uso de antidepressivos tricíclicos (Pacher, Ungvari *et al.*, 1999). A hipotensão ortostática pode estar relacionada aos seus efeitos no músculo liso vascular. Há trabalhos que demonstram que a imipramina pode causar vasodilatação de artérias devido a interação com canais de cálcio dependentes de voltagem e conseqüente diminuição do influxo de íons cálcio na célula muscular lisa (Becker, Morel *et al.*, 2004; Sanchez-Ortiz, Perez-Alvarez *et al.*, 2007). Os antidepressivos tricíclicos imipramina e desipramina também podem inibir canais de sódio em tecidos cardíacos (Barber, Starmer *et al.*, 1991). Há relatos que o tratamento crônico com antidepressivos pertencentes à classe dos inibidores seletivos da recaptação de 5-HT, como a fluoxetina e o citalopran, pode causar uma leve, porém, significativa bradicardia que pode estar relacionada à inibição de canais de cálcio e sódio no tecido cardíaco (Pacher, Ungvari *et al.*, 1999). A Fluoxetina pode causar vasodilatação de artérias pulmonares e cerebrais. O possível mecanismo de ação proposto para esta vasodilatação é a inibição de canais de cálcio dependente de voltagem. Está hipótese é fundamentada, pois a fluoxetina inibe a ação do composto Bay K 8644, uma substância que causa vasoconstrição por promover a abertura de canais de cálcio dependente de voltagem (Ungvari, Pacher *et al.*, 1999). Entretanto, também já foi demonstrado que a fluoxetina pode antagonizar reversivelmente o receptor serotoninérgico 5-HT_{2C} (Ni e Miledi, 1997). Portanto, a ação vasodilatadora da fluoxetina também pode estar relacionada ao antagonismo de receptores serotoninérgicos, visto que nas concentrações utilizadas nos estudos realizados em artérias pulmonares e cerebrais (1,0 e 10 µM), citados anteriormente, a fluoxetina pode estar agindo de forma não seletiva e desta forma antagonizando receptores serotoninérgicos. Nós aqui investigamos as ações de algumas das substâncias que atuam nos transportadores de monoaminas na reatividade vascular da veia jugular de rato. Na veia jugular de rato, a ativação do receptor 5-HT_{2A} é o principal responsável por mediar a resposta contrátil à 5-HT (Linder, Gaskell *et al.*). Inicialmente, avaliamos a reatividade vascular à 5-HT na veia jugular de

ratos construindo 2 curvas concentração resposta consecutivas para esse agonista, com intervalo de 1 hora entre as curvas. Trinta minutos antes do início da segunda curva foi adicionado veículo (água). A segunda curva sofreu uma diminuição do efeito máximo e um leve deslocamento para a direita demonstrado por uma diferença no valor de pD_2 . Esta diferença pode estar relacionada à taquifilaxia de receptores serotoninérgicos. A taquifilaxia ou dessensibilização de receptores já foi observada para a 5-HT em vasos periféricos (Vanhoutte, 1983) e também para a prucaloprida, um agonista do recetor serotoninérgico 5-HT₄, em tecido atrial (De Maeyer, Schuurkes *et al.*, 2009).

Sabendo que a segunda curva concentração resposta para 5-HT está desviada para a direita e com redução de efeito máximo, ela passou a ser nosso modelo de comparação para todas as curvas realizadas em presença das substâncias que alteram a homeostase da 5-HT. Observamos que a curva concentração resposta para 5-HT na presença de fluoxetina na concentração de 0,01 μM não apresentou diferença em relação à curva realizada em presença de veículo, sugerindo que nesta concentração a fluoxetina não influencia na resposta contrátil da veia jugular à 5-HT. Resultados semelhantes foram observados para imipramina nas concentrações de 0,01 μM e 0,1 μM e para desipramina também nas concentrações de 0,01 μM e 0,1 μM . Na presença de fluoxetina na concentração de 1,0 μM houve um deslocamento maior para a direita em relação à curva em presença de veículo, demonstrado pela diferença nos valores de pD_2 . Resultados semelhantes foram observados para imipramina e desipramina, ambas na concentração de 1,0 μM . É possível que estes resultados estejam relacionados ao antagonismo de receptores serotoninérgicos por essas drogas ou à interação com canais de cálcio com conseqüente diminuição do influxo deste íon na célula e da resposta contrátil à 5-HT, conforme já discutido anteriormente. Entretanto, é necessária uma investigação mais detalhada para descrever os mecanismos pelos quais estas drogas atuam nestes tecidos.

De modo intrigante, a curva concentração resposta para 5-HT na presença de fluoxetina na concentração de 0,1 μM apresentou um deslocamento para a esquerda em relação à curva em presença de veículo, demonstrado por uma diferença nos valores de pD_2 . Esta resposta seria esperada caso a fluoxetina estivesse inibindo a recaptação de 5-HT em veias, o que aumentaria a concentração de 5-HT no meio extracelular acarretando uma maior ativação de receptores serotoninérgicos e aumento da potência da 5-HT. Resultados semelhantes foram observados em aorta de ratos, artéria em que o SERT

é funcional (Ni, Geddes *et al.*, 2008). No entanto, essa concentração de fluoxetina não foi testada nos experimentos de captação. Para uma melhor compreensão deste resultado, faz-se necessária a avaliação da captação de 5-HT na veia jugular na presença de fluoxetina na concentração de 0,1 μM . Tendo em vista estes resultados, podemos sugerir que, de modo geral, a fluoxetina, imipramina e desipramina podem influenciar a resposta contrátil a 5-HT na veia jugular de maneira dependente da concentração e atuar por diferentes mecanismos de ação do que aqueles de inibição da captação de monoaminas.

Visto que a pargilina é capaz de aumentar os níveis intracelulares de 5-HT da veia jugular, avaliamos a reatividade vascular na presença desta substância. Escolhemos a concentração de 100,0 μM , considerando que nesta concentração a pargilina inibiu o metabolismo da 5-HT, aumentando consideravelmente seus níveis intracelulares. Levando em conta a importância da 5-HT para o processo de contração da musculatura lisa vascular, tanto por ativação de receptores ou pela modulação da atividade de proteínas contráteis através do processo denominado serotonilação já comentado anteriormente, esperávamos que em presença de pargilina a curva concentração resposta para 5-HT fosse deslocada para a esquerda. Os resultados obtidos demonstraram que em presença desta droga a curva concentração resposta à 5-HT não apresentou diferença em relação a curva controle. No entanto, se lembrarmos que a segunda curva concentração efeito para 5-HT em presença de veículo foi deslocada para a direita, em presença de pargilina este desvio foi prevenido. Este resultado sugere que o aumento da 5-HT intracelular pode estar contribuindo para um discreto aumento da contração talvez por serotonilar proteínas importantes para a atividade contrátil de modo positivo.

Como observamos inibição da captação de 5-HT em presença de decynium-22, esperávamos que na presença desta substância, a resposta contrátil à 5-HT estaria aumentada devido a um aumento cumulativo na solução fisiológica de 5-HT. Entretanto, ao contrário do que esperávamos, as curvas concentração efeito induzidas por 5-HT foram significativamente inibidas em presença de decynium-22, como observado pela diminuição no efeito máximo e/ou potência da 5-HT na presença deste inibidor. Portanto, o decynium-22 pode inibir a resposta contrátil da 5-HT de uma forma concentração dependente. Após a avaliação da reatividade vascular na presença de decynium-22, testamos a resposta contrátil à 5-HT nas mesmas preparações, com o objetivo de avaliar a viabilidade das mesmas após à exposição ao decynium-22. Observamos que as preparações recuperaram cerca de 35% da resposta

contrátil máxima e permaneceram viáveis mesmo após 4 horas à exposição ao decynium-22 (dados não mostrados). Apesar de não termos identificados trabalhos que relatem a interação desta substância com receptores serotoninérgicos ou com canais de cálcio, é possível que estes sejam o mecanismo de ação do decynium-22 na inibição da resposta contrátil à 5-HT na veia jugular.

6 Conclusão

Apesar das pesquisas sobre as funções fisiológicas da 5-HT no sistema cardiovascular terem iniciado há mais de meio século, ainda hoje muitas das suas ações não são completamente compreendidas. Neste âmbito, a recente descoberta do sistema serotoninérgico no sistema vascular contribui para uma melhor compreensão das diversas ações da 5-HT e cria novas oportunidades para possíveis abordagens terapêuticas. Portanto, a realização deste trabalho objetivou ampliar nossos conhecimentos sobre este sistema e traz como principais contribuições: 1) a adequação e padronização de uma metodologia que possibilita a quantificação de monoaminas neurotransmissoras, principalmente 5-HT e 5-HIAA, em tecidos animais, através de HPLC no Departamento de Farmacologia da UFSC, o que cria uma nova ferramenta para investigação destas monoaminas não só no sistema cardiovascular como também em outros sistemas; 2) uma melhor compreensão dos mecanismos de captação de 5-HT pelo sistema venoso; 3) uma abordagem sobre a influência de drogas que interferem na homeostase da 5-HT na contração induzida por este neurotransmissor no sistema venoso. Nossos resultados sugerem que a captação de 5-HT em veia jugular e veia cava de ratos se dá através dos OCTs e que drogas relacionadas à inibição da captação de monoaminas como a fluoxetina, imipramina, desipramina, cocaína e decynium-22 podem interferir com a resposta contrátil à 5-HT por outros mecanismos que não a inibição da captação de 5-HT. Além disso, nossos resultados apontam para um possível envolvimento da 5-HT intracelular na resposta contrátil induzida por 5-HT em veia jugular de ratos.

REFERÊNCIAS

- Ban, Y., T. Watanabe, *et al.* Impact of increased plasma serotonin levels and carotid atherosclerosis on vascular dementia. Atherosclerosis, v.195, n.1, Nov, p.153-9. 2007.
- Barber, M. J., C. F. Starmer, *et al.* Blockade of cardiac sodium channels by amitriptyline and diphenylhydantoin. Evidence for two use-dependent binding sites. Circ Res, v.69, n.3, Sep, p.677-96. 1991.
- Becker, B., N. Morel, *et al.* Blockade of calcium entry in smooth muscle cells by the antidepressant imipramine. Biochem Pharmacol, v.68, n.5, Sep 1, p.833-42. 2004.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Brenner, B., J. T. Harney, *et al.* Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. J Neurochem, v.102, n.1, Jul, p.206-15. 2007.
- Cases, O., I. Seif, *et al.* Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. Science, v.268, n.5218, Jun 23, p.1763-6. 1995.
- Cohen, M. L., R. W. Fuller, *et al.* Evidence for 5-HT₂ receptors mediating contraction in vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther, v.218, n.2, Aug, p.421-5. 1981.
- Cohen, M. L., K. W. Schenck, *et al.* 5-Hydroxytryptamine(1A) receptor activation enhances norepinephrine release from nerves in the rabbit saphenous vein. J Pharmacol Exp Ther, v.290, n.3, Sep, p.1195-201. 1999.
- Cote, F., E. Thevenot, *et al.* Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.23, Nov 11, p.13525-30. 2003.
- Da Prada, M., A. Pletscher, *et al.* Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine and histamine in blood platelets. Nature, v.216, n.5122, Dec 30, p.1315-7. 1967.
- De Maeyer, J. H., J. A. Schuurkes, *et al.* Selective desensitization of the 5-HT₄ receptor-mediated response in pig atrium but not in stomach. Br J Pharmacol, v.156, n.2, Jan, p.362-76. 2009.

Diaz, J., W. Ni, *et al.* 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther, v.325, n.3, Jun, p.1031-8. 2008.

Egermayer, P., G. I. Town, *et al.* Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension. Thorax, v.54, n.2, Feb, p.161-8. 1999.

Eisenhofer, G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. Pharmacol Ther, v.91, n.1, Jul, p.35-62. 2001.

Erickson, J. D., L. E. Eiden, *et al.* Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.22, Nov 15, p.10993-7. 1992.

Erspamer, V. e B. Asero. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. Nature, v.169, n.4306, May 10, p.800-1. 1952.

Fischer, J. F. e A. K. Cho. Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. J Pharmacol Exp Ther, v.208, n.2, Feb, p.203-9. 1979.

Gasser, P. J., C. A. Lowry, *et al.* Corticosterone-sensitive monoamine transport in the rat dorsomedial hypothalamus: potential role for organic cation transporter 3 in stress-induced modulation of monoaminergic neurotransmission. J Neurosci, v.26, n.34, Aug 23, p.8758-66. 2006.

Gershon, M. D. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. Aliment Pharmacol Ther, v.13 Suppl 2, May, p.15-30. 1999.

Gershon, M.D. Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. Curr Opin Pharmacol, v.3, n.6, Dec, p.600-7. 2003.

Grundemann, D., V. Gorboulev, *et al.* Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. Nature, v.372, n.6506, Dec 8, p.549-52. 1994.

Grundemann, D., B. Schechinger, *et al.* Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. Nat Neurosci, v.1, n.5, Sep, p.349-51. 1998.

Hayer-Zillgen, M., M. Bruss, *et al.* Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. Br J Pharmacol, v.136, n.6, Jul, p.829-36. 2002.

Hediger, M. A., M. F. Romero, *et al.* The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. Pflugers Arch, v.447, n.5, Feb, p.465-8. 2004.

Herve, P., L. Drouet, *et al.* Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: role of serotonin. Am J Med, v.89, n.1, Jul, p.117-20. 1990.

Hohage, H., A. Stachon, *et al.* Regulation of organic cation transport in IHKE-1 and LLC-PK1 cells. Fluorometric studies with 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium. J Pharmacol Exp Ther, v.286, n.1, Jul, p.305-10. 1998.

Homberg, J. R., J. D. Olivier, *et al.* Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. Neuroscience, v.146, n.4, Jun 8, p.1662-76. 2007.

Hoyer, D., D. E. Clarke, *et al.* International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). Pharmacol Rev, v.46, n.2, Jun, p.157-203. 1994.

Iversen, L. L. The Uptake of Noradrenaline by the Isolated Perfused Rat Heart. Br J Pharmacol Chemother, v.21, Dec, p.523-37. 1963.

Iversen, L. L. Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. Br J Pharmacol, v.41, n.4, Apr, p.571-91. 1971.

Jacobs, B. L. e E. C. Azmitia. Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev, v.72, n.1, Jan, p.165-229. 1992.

Jones, S. R., R. R. Gainetdinov, *et al.* Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. J Neurosci, v.18, n.6, Mar 15, p.1979-86. 1998.

Jonker, J. W. e A. H. Schinkel. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). J Pharmacol Exp Ther, v.308, n.1, Jan, p.2-9. 2004.

Kamdar, G., K. M. Penado, *et al.* Functional role of critical stripe residues in transmembrane span 7 of the serotonin transporter. Effects of Na⁺, Li⁺, and methanethiosulfonate reagents. J Biol Chem, v.276, n.6, Feb 9, p.4038-45. 2001.

Khan, N. A., J. P. Meyneil, *et al.* Ca²⁺/calmodulin and protein kinase C regulation of serotonin transport in human K562 lymphocytes. Cell Immunol, v.172, n.2, Sep 15, p.269-74. 1996.

Linder, A. E., J. Diaz, *et al.* Vascular reactivity, 5-HT uptake, and blood pressure in the serotonin transporter knockout rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.294, n.4, Apr, p.H1745-52. 2008.

Linder, A. E., G. L. Gaskell, *et al.* Serotonin receptors in rat jugular vein: presence and involvement in the contraction. J Pharmacol Exp Ther, v.334, n.1, Jul, p.116-23.

Linder, A. E., W. Ni, *et al.* Serotonin (5-HT) in veins: not all in vain. J Pharmacol Exp Ther, v.323, n.2, Nov, p.415-21. 2007.

Linder, A. E., W. Ni, *et al.* A serotonergic system in veins: serotonin transporter-independent uptake. J Pharmacol Exp Ther, v.325, n.3, Jun, p.714-22. 2008.

Linder, A. E., K. M. Thakali, *et al.* Methyl-beta-cyclodextrin prevents angiotensin II-induced tachyphylactic contractile responses in rat aorta. J Pharmacol Exp Ther, v.323, n.1, Oct, p.78-84. 2007.

Masson, J., C. Sagne, *et al.* Neurotransmitter transporters in the central nervous system. Pharmacol Rev, v.51, n.3, Sep, p.439-64. 1999.

Morecroft, I., R. P. Heeley, *et al.* 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. Br J Pharmacol, v.128, n.3, Oct, p.730-4. 1999.

Mortensen, O. V., A. S. Kristensen, *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of a bovine serotonin transporter. Brain Res Mol Brain Res, v.71, n.1, Jul 23, p.120-6. 1999.

Nemecek, G. M., S. R. Coughlin, *et al.* Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.3, Feb, p.674-8. 1986.

- Ni, W., T. J. Geddes, *et al.* The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. Br J Pharmacol, v.154, n.3, Jun, p.663-74. 2008.
- Ni, W., J. M. Thompson, *et al.* The serotonin transporter is present and functional in peripheral arterial smooth muscle. J Cardiovasc Pharmacol, v.43, n.6, Jun, p.770-81. 2004.
- Ni, Y. G. e R. Miledi. Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.5, Mar 4, p.2036-40. 1997.
- Okuda, M., H. Saito, *et al.* cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. Biochem Biophys Res Commun, v.224, n.2, Jul 16, p.500-7. 1996.
- Pacher, P., Z. Ungvari, *et al.* Speculations on difference between tricyclic and selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants on their cardiac effects. Is there any? Curr Med Chem, v.6, n.6, Jun, p.469-80. 1999.
- Pacholczyk, T., R. D. Blakely, *et al.* Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. Nature, v.350, n.6316, Mar 28, p.350-4. 1991.
- Pakala, R., J. T. Willerson, *et al.* Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. Circulation, v.90, n.4, Oct, p.1919-26. 1994.
- Rapport, M. M., A. A. Green, *et al.* Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. J Biol Chem, v.176, n.3, Dec, p.1243-51. 1948.
- Ritz, M. C., R. J. Lamb, *et al.* Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. Science, v.237, n.4819, Sep 4, p.1219-23. 1987.
- Rothman, R. B. e M. H. Baumann. Serotonin releasing agents. Neurochemical, therapeutic and adverse effects. Pharmacol Biochem Behav, v.71, n.4, Apr, p.825-36. 2002.
- Rudnick, G. Active transport of 5-hydroxytryptamine by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets. J Biol Chem, v.252, n.7, Apr 10, p.2170-4. 1977.

Sanchez-Ortiz, R., V. Perez-Alvarez, *et al.* Vasoactive properties of antidepressant N-alkyl derivatives. Proc West Pharmacol Soc, v.50, p.93-4. 2007.

Schnaitman, C. e J. W. Greenawalt. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. J Cell Biol, v.38, n.1, Jul, p.158-75. 1968.

Schomig, E., J. Babin-Ebell, *et al.* 1,1'-diethyl-2,2'-cyanine (decynium22) potently inhibits the renal transport of organic cations. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.347, n.4, Apr, p.379-83. 1993.

Seiden, L. S., K. E. Sabol, *et al.* Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.33, p.639-77. 1993.

Sneddon, J. M. Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. Br J Pharmacol, v.37, n.3, Nov, p.680-8. 1969.

Ullmer, C., K. Schmuck, *et al.* Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. FEBS Lett, v.370, n.3, Aug 21, p.215-21. 1995.

Ungvari, Z., P. Pacher, *et al.* Fluoxetine dilates isolated small cerebral arteries of rats and attenuates constrictions to serotonin, norepinephrine, and a voltage-dependent Ca(2+) channel opener. Stroke, v.30, n.9, Sep, p.1949-54. 1999.

Vanhoutte, P. M. 5-hydroxytryptamine and vascular disease. Fed Proc, v.42, n.2, Feb, p.233-7. 1983.

Veenstra-Vanderweele, J., G. M. Anderson, *et al.* Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. Eur J Pharmacol, v.410, n.2-3, Dec 27, p.165-181. 2000.

Vikenes, K., M. Farstad, *et al.* Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. Circulation, v.100, n.5, Aug 3, p.483-9. 1999.

Walther, D. J., J. U. Peter, *et al.* Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science, v.299, n.5603, Jan 3, p.76. 2003.

Walther, D. J., J. U. Peter, *et al.* Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. Cell, v.115, n.7, Dec 26, p.851-62. 2003.

- Watts, S. W. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? Clin Sci (Lond), v.108, n.5, May, p.399-412. 2005.
- Watts, S. W., J. R. Priestley, *et al.* Serotonylation of vascular proteins important to contraction. PLoS One, v.4, n.5, p.e5682. 2009.
- Watts, S. W. e J. M. Thompson. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the renal artery of the normotensive rat. J Pharmacol Exp Ther, v.309, n.1, Apr, p.165-72. 2004.
- Weil-Malherbe, H., L. G. Whitby, *et al.* The uptake of circulating [3H]norepinephrine by the pituitary gland and various areas of the brain. J Neurochem, v.8, Oct, p.55-64. 1961.
- Westlund, K. N., T. J. Krakower, *et al.* Intracellular distribution of monoamine oxidase A in selected regions of rat and monkey brain and spinal cord. Brain Res, v.612, n.1-2, May 28, p.221-30. 1993.
- Wheatcroft, J., D. Wakelin, *et al.* Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction. Neurogastroenterol Motil, v.17, n.6, Dec, p.863-70. 2005.
- Wiedeman, M. P. Dimensions of blood vessels from distributing artery to collecting vein. Circ Res, v.12, Apr, p.375-8. 1963.
- Yang, G. B., C. L. Qiu, *et al.* Expression of serotonin transporters by peripheral blood mononuclear cells of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Cell Immunol, v.248, n.2, Aug, p.69-76. 2007.

