



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUIZ EDUARDO CALOÊTE XIMENES

6-NITRODOPAMINA COMO MEDIADOR ENDÓGENO DO VAS DEFERENS DE
RATO

CAMPINAS

2024

LUIZ EDUARDO CALOÊTE XIMENES

6 – NITRODOPAMINA COMO MEDIADOR ENDÓGENO DO VAS DEFERENS DE
RATO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO LUIZ EDUARDO CALOÊTE XIMENES, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

X41s Ximenes, Luiz Eduardo Caloete, 1986-
6-nitrodopamina como mediador endógeno do vas deferens de rato / Luiz
Eduardo Caloete Ximenes. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Gilberto De Nucci.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. 6-Nitrodopamina. 2. Antidepressivos tricíclicos. 3. Catecolaminas. 4.
Ejaculação precoce. 5. Tansulosina. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: 6-nitrodopamine as an endogenous mediator of rat vas deferens

Palavras-chave em inglês:

6-Nitrodopamine

Antidepressive agents, Tricyclic

Catecholamines

Premature ejaculation

Tamsulosin

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci

Ricardo Destro Saade

Marcelo Lopes de Lima

Anuar Ibrahim Mitre

Cesário Bianchi Filho

Data de defesa: 13-03-2024

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0966-2281>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4380321935158293>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUIZ EDUARDO CALOÊTE XIMENES

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI**
 - 2. PROF. DR. RICARDO DESTRO SAADE**
 - 3. PROF. DR. MARCELO LOPES DE LIMA**
 - 4. PROF. DR. ANUAR IBRAHIM MITRE**
 - 5. PROF. DR. CESÁRIO BIANCHI FILHO**
-

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 13/03/2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família: Luiz, Petro,
Guilherme, Marcela e meu filho João Paulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional, sustentação moral e sinceridade em todo o processo deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Adriano Fregonesi por acreditar no meu potencial, pela constante cobrança para aprimorar os seus alunos.

Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, por aceitar e confiar a mim a produção deste projeto e de outros durante esta jornada.

Agradeço aos meus amigos e colegas de trabalho pelo apoio neste trabalho.

Agradeço aos coordenadores do Departamento de Farmacologia pela atenção e dedicação durante a minha jornada e dos outros alunos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

"Você nunca chegará ao seu destino, se parar
para atirar pedras em cada cachorro que late."
Winston Churchill

RESUMO

A 6-nitrodopamina (6-ND) é liberada dos vasos do cordão umbilical humano e modula a reatividade vascular agindo como um antagonista da dopamina. "Neste estudo, investigamos a liberação de 6-ND pelos vasos deferentes isolados de ratos e seu impacto nesse tecido. Utilizamos cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS-MS) para quantificar os níveis de dopamina, noradrenalina, adrenalina e 6-ND nos vasos deferentes isolados de ratos. Realizamos estimulação por campo elétrico (EFS) e construímos curvas concentração-resposta para 6-ND, noradrenalina, dopamina e adrenalina, tanto na ausência quanto na presença (por 30 minutos) dos seguintes agentes: L-NAME, SCH-23390, haloperidol, PG-01037, sonopirazol, desipramina, clomipramina, amitriptilina, ciclobenzaprina, carbamazepina, maprotilina, paroxetina, oxcarbazepina e cetanserina, nos vasos deferentes epididimais isolados de ratos (VDEIR). Liberações basais de 6-ND e noradrenalina foram detectadas nos *vas deferens* isolados de ratos. A liberação de 6-ND foi reduzida pela incubação de tecido com L-NAME e dos *vas deferens* obtidos de ratos tratados com L-NAME. SCH-23390 causou desvios para a esquerda nas curvas concentração-resposta para 6-ND sem afetar as contrações de VDEIR induzidas por dopamina ou EFS. Haloperidol, PG-01037 e sonopirazol causaram desvios significativos para a direita nas curvas concentração-resposta à dopamina, mas não tiveram efeito nas contrações VDEIR induzidas por 6-ND ou EFS. Os compostos tricíclicos desipramina, clomipramina, amitriptilina, ciclobenzaprina e carbamazepina induziram desvios para a direita na curva concentração-resposta 6-ND, mas não reduziram as respostas contráteis de noradrenalina, dopamina e adrenalina. Também observamos uma redução nas contrações dos vasos deferentes epididimais isolados de ratos (VDEIR) induzidas por EFS no grupo controle, porém essa redução não foi observada nos tecidos obtidos de animais tratados com L-NAME. Maprotilina, oxcarbazepina, paroxetina e cetanserina não demonstraram efeito nas contrações dos VDEIR induzidas por 6-ND ou EFS. Neste contexto, investigamos os efeitos dos antagonistas seletivos dos receptores α_1 -adrenérgicos nas contrações dos VDEIR induzidas por 6-ND, dopamina, noradrenalina, adrenalina e EFS. Tanto a doxazosina quanto a tansulosina (3-10 nM) causaram deslocamentos significativos para a direita na curva concentração-resposta para 6-ND, porém não afetaram as contrações induzidas por dopamina, noradrenalina e adrenalina. A alfuzosina (10 nM) provocou deslocamentos para a direita nas curvas concentração-resposta para todas as catecolaminas. Tanto a silodosina (10 nM) quanto

a terazosina (100 nM) deslocaram as curvas de noradrenalina, dopamina e adrenalina para a direita, embora concentrações mais elevadas desses antagonistas (100 e 300 nM, respectivamente) tenham sido necessárias para deslocar as curvas de 6-ND. A inibição das contrações induzidas por EFS só foi significativa nas concentrações em que os antagonistas dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos produziram deslocamentos para a direita nas curvas concentração-resposta para 6-ND. A inibição das contrações induzidas por EFS pela doxazosina (10 nM), tamsulosina (10 nM), alfuzosina (10 nM), silodosina (100 nM) e terazosina (300 nM) não foi observada em VDEIR obtido de animais tratados cronicamente com L-NOME. Este estudo demonstra que os antagonistas dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos funcionam como antagonistas dos receptores 6-ND no VDEIR, sugerindo que muitas das ações anteriormente atribuídas à noradrenalina podem ser resultado do antagonismo 6-ND. Além disso, a modulação da contratilidade do VDEIR por 6-ND foi evidenciada, com desipramina, clomipramina, amitriptilina, ciclobenzaprina e carbamazepina atuando como antagonistas seletivos do receptor 6-ND. O bloqueio dos receptores 6-ND, tanto pelos antidepressivos tricíclicos quanto pelos antagonistas dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, pode representar um mecanismo de ação comum responsável pela utilização terapêutica dessas substâncias no tratamento da ejaculação precoce.

Adrenérgico; Antidepressivo tricíclicos; Catecolaminas, Ejaculação Precoce; Tamsulosina.

ABSTRACT

6-nitrodopamine (6-ND) is identified as being released from human umbilical cord vessels, influencing vascular reactivity as a dopamine antagonist. Our study aims to ascertain whether 6-ND is also released by isolated rat vas deferens and its consequential effect on the tissue. Using LC-MS-MS, we quantified levels of dopamine, noradrenaline, adrenaline, and 6-ND in rat isolated vas deferens. We conducted electric-field stimulation (EFS) and concentration-response curves for 6-ND, noradrenaline, dopamine, and adrenaline, both in the absence and presence (30 minutes) of L-NAME, SCH-23390, haloperidol, PG-01037, sonepiprazole, desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine, carbamazepine, maprotiline, paroxetine, oxcarbazepine, and ketanserin in the rat isolated epididymal vas deferens (VDEIR). Basal releases of 6-ND and noradrenaline were observed from the rat isolated vas deferens. Incubation with L-NAME reduced 6-ND release, both in tissue incubation and in vas deferens obtained from L-NAME-treated rats. SCH-23390 caused leftward shifts in concentration-response curves to 6-ND without affecting dopamine- or EFS-induced VDEIR contractions. Haloperidol, PG-01037, and sonepiprazole caused significant rightward shifts in concentration-response curves to dopamine but did not affect 6-ND or EFS-induced VDEIR contractions. Tricyclic compounds desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine, and carbamazepine induced rightward shifts in the 6-ND concentration-response curve but did not reduce noradrenaline, dopamine, and adrenaline contractile responses. They also reduced EFS-induced VDEIR contractions in control, but not in tissues obtained from L-NAME-treated animals. Maprotiline, oxcarbazepine, paroxetine, and ketanserin had no effect on either 6-ND or EFS-induced VDEIR contractions. In this study, we investigated the effects of selective α_1 -adrenergic receptor antagonists on VDEIR contractions induced by 6-ND, dopamine, noradrenaline, adrenaline, and EFS. Doxazosin and tamsulosin (3–10 nM) caused significant rightward shifts in the concentration-response curve to 6-ND but had no effect on dopamine-, noradrenaline-, and adrenaline-induced contractions. Alfuzosin (10 nM) produced rightward shifts in concentration-response curves for all catecholamines. Silodosin (10 nM) and terazosin (100 nM) displaced the noradrenaline, dopamine, and adrenaline curves to the right, but higher concentrations of both antagonists (100 and 300 nM, respectively) were required to displace the 6-ND curves. EFS-induced contractions were significantly inhibited only at concentrations where the α_1 -adrenergic receptor antagonists caused rightward shifts in the 6-ND concentration-response curves. The

inhibition of EFS-induced contractions by doxazosin (10 nM), tamsulosin (10 nM), alfuzosin (10 nM), silodosin (100 nM), and terazosin (300 nM) was not observed in VDEIR obtained from animals chronically treated with L-NAME. This study demonstrates that α 1-adrenoceptor antagonists act as 6-ND receptor antagonists in VDEIR, suggesting that many actions previously attributed to noradrenaline could be due to 6-ND antagonism. Additionally, it shows that 6-ND modulates VDEIR contractility, and desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine, and carbamazepine act as selective 6-ND receptor antagonists. α 1-adrenoceptor antagonists also act as 6-ND receptor antagonists in VDEIR, suggesting that many actions previously attributed to noradrenaline may be due to 6-ND antagonism. Furthermore, the blockade of 6-ND receptors by both tricyclic antidepressants and α 1-adrenergic receptor antagonists may represent the common mechanism of action responsible for their therapeutic use in the treatment of premature ejaculation.

Adrenergic Agents; Amitriptyline; Antidepressive Agents, Tricyclic; Carbamazepine;
Catecholamines

SUMÁRIO

Item	Assunto	Página
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Catecolaminas	13
1.2	Dopamina	15
1.3	6-Nitrodopamina	16
1.4	Morfologia do Vas Deferens do Rato	17
1.4.1	Características Básicas	17
1.4.2	Porção Proximal	17
1.4.3	Porção Distal	18
1.4.4	Porção Terminal	19
1.5	Neurofisiologia da Ejaculação	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivos Gerais	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	22
3.1	Artigo 1 - 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation	22
3.2	Artigo 2 - Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens	36
3.3	Artigo 3 - 6-Nitrodopamina is released by rat isolated vas deferens and modulates its contractility.	49
4	DISCUSSÃO	51
5	CONCLUSÃO	58
6	REFERÊNCIAS	59
7	APÊNDICES	66
7.1	Apêndice I – CEUA – 5557-1/2020	66
7.2	Apêndice II – Autorização da Revista	76

1 - INTRODUÇÃO

1.1 CATECOLAMINAS

As catecolaminas são compostos orgânicos e sua estrutura possuem o grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno) ligado por uma ponte de etil, um grupo de amina. As catecolaminas são encontradas no sistema nervoso simpático periférico, e na adrenal medula, e estão distribuídos de forma desigual em diferentes áreas do sistema nervoso central.(1)

As principais catecolaminas são a dopamina, norepinefrina e epinefrina, assim constituem uma classe de neurotransmissores químicos e hormonais.(2,3) Elas ocupam posições de destaque na regulação de processos fisiológicos e no desenvolvimento de doenças neurológicas, psiquiátricas, endócrinas e cardiovasculares.(4,5)

As catecolaminas são sintetizadas a partir da tirosina que pode ser um derivado endógena ou exógena. Quando endógena é sintetizada pelo fígado a partir da fenilalanina. O primeiro passo envolve a hidroxilação da tirosina para formar L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), uma reação catalisada pela enzima tirosina hidroxilase. Uma vez formado, o L-DOPA é descarboxilado a dopamina (DA) pela L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC).(3,6,7)

Em neurônios que usam DA como transmissor, nenhuma outra modificação enzimática ocorre. Neurônios que utilizam noradrenalina (NE) como neurotransmissor possuem uma enzima adicional chamada dopamina-beta-hidroxilase (DA- β -hidroxilase), responsável por converter dopamina (DA) em noradrenalina. Neurônios que usam epinefrina como transmissor contêm uma enzima, feniletanolamina-N-metiltransferase, que é responsável por catalisar a conversão de NE em epinefrina.(3,7)

A maior parte da epinefrina nas terminações nervosas ou células cromafins está contida em vesículas e, em condições normais, apenas uma pequena quantidade encontra-se na forma livre no citoplasma. A concentração nas vesículas é mantida pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT), que é semelhante ao transportador de aminas responsável pela captura de norepinefrina nas terminações nervosas, mas utiliza o gradiente transvesicular de prótons como força impulsora.(8,9)

A ação da norepinefrina liberada termina principalmente pela captura do transmissor nas terminações nervosas noradrenérgicas. A epinefrina e a norepinefrina circulantes são degradadas enzimaticamente. As duas enzimas principais que metabolizam as catecolaminas estão localizadas intracelularmente; por isso, a captação pelas células precede necessariamente a degradação metabólica.(3,10,11)

A captura neuronal é mediada pelo transportador de norepinefrina (NET) presente na membrana plasmática. Estes transportadores atuam como cotransportadores de Na⁺, Cl⁻ e a amina em questão, utilizando o gradiente eletroquímico de Na⁺ como força motriz.(6,12) O empacotamento dentro de vesículas ocorre através do transportador vesicular de monoaminas

(VMAT), que é impulsionado pelo gradiente de prótons entre o citosol e o conteúdo vesicular. Por outro lado, a captura extraneuronal é realizada pelo transportador extraneuronal de monoaminas (EMT), pertencente a uma grande e amplamente distribuída família de transportadores de cátions orgânicos (OCTs) (12)

O NET é relativamente seletivo para norepinefrina, exibindo alta afinidade e uma velocidade máxima de captura relativamente pequena. Este transportador desempenha um papel crucial na manutenção dos estoques liberáveis de norepinefrina. O EMT tem menor afinidade e maior capacidade de transporte que o NET, e transporta epinefrina e isoprenalina, bem como norepinefrina.(10)

As catecolaminas endógenas e exógenas são metabolizadas principalmente por duas enzimas intracelulares: monoamino-oxidase (MAO) e catecol-O-metil transferase (COMT). A enzima monoamina oxidase (MAO), que inclui as isoformas MAO-A e MAO-B, está localizada na membrana externa das mitocôndrias. Ela é abundante nas terminações nervosas noradrenérgicas, porém também é encontrada em outros tecidos como fígado, epitélio intestinal e em outros tecidos do organismo. (10,12)

A MAO converte catecolaminas em seus aldeídos correspondentes que, na periferia, são rapidamente metabolizados pelo aldeído desidrogenase ao ácido carboxílico correspondente (a norepinefrina dá origem ao 3,4-di-hidroxifenilglicol. A MAO pode também oxidar outras monoaminas, dentre as quais, dopamina e 5-HT. (6,12)

Dentro dos neurônios simpáticos, a monoamina oxidase (MAO) desempenha um papel crucial no controle do conteúdo de dopamina e norepinefrina. Quando a MAO é inibida, o estoque liberável de norepinefrina aumenta. As principais vias do metabolismo da norepinefrina incluem o ramo oxidativo, catalisado pela dopamina beta-hidroxilase (ADH), que predomina e produz o ácido vanililmandélico (VMA) como principal metabólito urinário. O ramo redutor, catalisado pela aldeído redutase (AR), produz o metabólito menos abundante, o ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicólico (MHPG), que é conjugado ao sulfato de MHPG antes de ser eliminado.(12)

A segunda via mais importante para o metabolismo das catecolaminas envolve a metilação, realizada pela catecol-O-metiltransferase (COMT), que adiciona um grupo metila a um dos grupos hidroxila do catecol, resultando na formação de um derivado metoxi. A COMT está ausente nos neurônios noradrenérgicos, mas é encontrada na medula da suprarrenal, assim como em muitas outras células e tecidos do organismo..(12)

O produto formado pela ação sequencial da monoamina oxidase (MAO) e da catecol-O-metiltransferase (COMT) é o ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG). Este composto é parcialmente conjugado a derivados sulfato ou glicuronídeo, os quais são eliminados na urina, enquanto a maioria é convertida em ácido vanililmandélico (VMA).(6,12)

Na periferia, nem a monoamina oxidase (MAO) nem a catecol-O-metiltransferase (COMT) são primariamente responsáveis pelo término da ação do neurotransmissor, e a maior parte da norepinefrina liberada é rapidamente recaptada pelo transportador de norepinefrina (NET). As catecolaminas circulantes são sequestradas e inativadas por uma combinação de NET, transportador extraneuronal de monoaminas (EMT) e COMT, e a importância relativa de cada processo varia de acordo com o agente envolvido. Assim, a norepinefrina circulante é removida principalmente pelo NET, enquanto a epinefrina é mais dependente do EMT.(6,8,12)

Atuando, as catecolaminas possuem uma ação endógena nos receptores adrenérgicos, sobre receptores α 1 e 2, e β 1, 2 e 3, tendo respostas diferentes para cada receptor e tecido. Os efeitos fisiológicos das catecolaminas são mediados por receptores acoplados a proteína G (GPCR), que controlam a sinalização do efetor, ou seja, o segundo mensageiro.(8,13–16)

1.2 DOPAMINA

A dopamina (DA) foi sintetizada pela primeira vez em 1910. Na década de 1930, a dopamina foi reconhecida como um composto de transição na síntese de norepinefrina (NE) e epinefrina. No entanto, acreditava-se que a dopamina era mais do que apenas um intermediário na biossíntese dessas catecolaminas. Só no início da década de 1950 foram encontrados estoques de DA nos tecidos, sugerindo que tivesse uma função sinalizadora própria. No final da década, Carlsson e Montagu identificaram cada um, estoques de DA no cérebro(17,18). Logo depois, Hornykiewicz descobriu o déficit de DA no cérebro comprometida pela doença de Parkinson, alimentando o interesse no papel da DA em doenças e distúrbios neurológicos. (19)

A DA consiste em uma molécula catecol ligada a uma etilamina, sendo classificada de catecolamina. A dopamina (DA) está intimamente relacionada à melanina, o pigmento que é formado pela oxidação da dopamina, tirosina ou L-DOPA. A melanina está presente na pele e na cutícula, conferindo à substância negra sua denominação homônima de cor escura. Tanto a dopamina quanto a L-DOPA são facilmente oxidadas por vias não enzimáticas, formando espécies reativas de oxigênio citotóxicas e quinonas. As quinonas de dopamina e dopa formam adutos com alfa-sinucleína, o principal constituinte dos corpos de Lewy na doença de Parkinson. A DA é uma molécula polar que não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica.(18,20–22)

A síntese da DA é similar à da via biosintética da 5-HT. O aminoácido fenilalanina e a tirosina são os precursores da dopamina. Na maioria dos mamíferos, a fenilalanina é convertida em tirosina pela ação da fenilalanina hidroxilase. A redução nos níveis desta enzima resulta em elevação dos níveis de fenilalanina, uma condição conhecida como fenilcetonúria. Para evitar comprometimento intelectual, a fenilcetonúria deve ser controlada por meio de restrições na dieta.(17,18,23)

A tirosina é facilmente transportada para o cérebro por meio de captação. No entanto, ao contrário do triptofano, os níveis cerebrais de tirosina geralmente estão saturados. A conversão de tirosina em L-DOPA (3,4 dihidroxifenilalanina) pela enzima tirosina hidroxilase é o passo limitante na síntese da dopamina. A tirosina hidroxilase é uma enzima de função mista que requer ferro e um cofator bioterina; a atividade enzimática é regulada por fosforilação e por inibição do produto final.(18,20,24)

Quatro isoformas alternadamente emendadas de tirosina hidroxilase foram identificadas em humanos, o que contrasta com vários dos primatas não humanos (duas isoformas) e ratos (uma isoforma). Atualmente, não está claro se as várias isoformas têm funções diferentes. Uma vez gerado, o L-DOPA é rapidamente convertido em dopamina pela enzima aromático L-aminoácido descarboxilase (AADC), que também é responsável pela conversão de L-5-hidroxitriptofano em 5-HT (serotonina).(17,18,20,25)

No sistema nervoso central (SNC) e na periferia, a atividade da aromático L-aminoácido descarboxilase (AADC) é muito alta, e os níveis basais de L-DOPA não podem ser facilmente mensurados. Ao contrário da dopamina, a L-DOPA atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e é convertida em dopamina no cérebro, o que explica sua utilidade no tratamento da doença de Parkinson. As principais vias que contêm dopamina incluem a projeção que liga a substância negra ao neostriado e a projeção que liga a região tegmental ventral às estruturas límbicas, especialmente o córtex límbico.(18)

A ação terapêutica da levodopa, um fármaco antiparkinsoniano, está associada a primeira área, ao mesmo tempo em que se acredita que a ação terapêutica dos fármacos antipsicóticos esteja associada a segunda. Além disso, os neurônios que contêm dopamina no hipotálamo ventral desempenham um papel crucial na regulação da função hipofisária.(22,26)

Foram identificados cinco subtipos de receptores de dopamina, que são divididos em duas categorias: semelhantes ao D1 (D1 e D5) e semelhantes ao D2 (D2, D3, D4). Todos os receptores de dopamina são metabotrópicos, ou seja, exercem suas ações por meio de segundos mensageiros e não diretamente na abertura de canais iônicos. Em geral, a dopamina exerce uma ação moduladora e pode ter efeitos tanto inibitórios quanto excitatórios sobre os neurônios do sistema nervoso central (SNC), dependendo do receptor específico ativado e do contexto neural. Essa ação foi mais bem caracterizada nos neurônios da substância negra que contêm dopamina, nos quais a ativação do receptor D2 abre os canais de potássio pela proteína de acoplamento Gi.(23)

1.3 6-NITRODOPAMINA

As nitrocatecolaminas nitronoradrenalina (NN) e nitroadrenalina foram extraídas de cérebro de rato(27) e 6-nitronoradrenalina (6-NN) foi detectada em microdialisados do corno

dorsal da medula espinhal de rato(28). O transporte de noradrenalina em sinaptossomas de ratos é inibido por 6-NN(29) e a administração intratecal de 6-NN induz analgesia devido à liberação de noradrenalina (28). Essas observações indicam que as nitrocatecolaminas podem atuar como mediadores neuronais no sistema nervoso central.

A liberação basal dependente do endotélio de dopamina (30) e 6-nitrodopamina (6-ND) foi identificada por espectrometria de massa de Tandem em *Chelonoidis carbonaria* aorta (31). Os vasos do cordão umbilical humano (HUCV) também apresentam uma liberação basal de dopamina (32) e 6-ND (33) e a síntese de 6-ND foi inibida pela incubação com o inibidor de síntese de óxido nítrico (NO) L-NAME. Curiosamente, o 6-ND modula a reatividade do HUCV através do antagonismo seletivo dos receptores dopaminérgicos tipo D2, indicando que o 6-ND pode ter papel modulador fora do sistema nervoso central. (33). A avaliação dos anéis aórticos de *Pantherophis guttatus* mostrou que a 6-nitrodopamina foi a principal catecolamina liberada e exerceu uma atividade vasodilatadora, atuando como um antagonista seletivo do receptor tipo D2 da dopamina. (34)

Também foi avaliada a capacidade de modulação do cronotropismo atrial em comparação com as catecolaminas clássicas e foi verificado que a 6-nitrodopamina possui um mecanismo duplo de ação: causa aumento na frequência atrial independente da ativação da PKA e liberação de catecolaminas dos terminais adrenérgicos.(35,36)

Através da avaliação dos vasos periféricos humanos também foi possível verificar que a 6-nitrodopamina é a principal catecolamina liberada pelos vasos em questão. A dopamina derivada do endotélio tem sido identificada como um importante agente contrátil da artéria e da veia poplítea. Além disso, os antagonistas seletivos do receptor D2 da dopamina, como a 6-nitrodopamina, têm demonstrado potencial terapêutico no controle desse tipo de vaso sanguíneo. (37)

1.4 MORFOLOGIA DO VAS DEFERENS DO RATO

1.4.1 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS

O ducto deferente possui cerca de 6 centímetros em camundongos adultos. Se origina no escroto na cauda do epidídimo e termina no ducto ejaculatório da pelve e pode ser diferenciada em porção proximal e distal. As porções do ducto deferente do rato pode ser diferenciada de acordo com suas características do epitélio, lâmina própria, suprimento vascular e da camada muscular que envolve o ducto.(38–40)

1.4.2 PORÇÃO PROXIMAL

Em um corte transversal, o ducto deferente proximal é achatado no plano de seu mesentério de suporte. O achatamento envolve apenas a camada muscular e resulta em uma

distribuição assimétrica de feixes musculares ao redor do ducto. Embora o raio da seção transversal do lúmen seja uniforme ao redor do ducto, o órgão como um todo possui eixos maiores e menores distintos. Os feixes musculares são orientados principalmente longitudinalmente embora na porção proximal do vas deferens uma camada profunda de feixes musculares circulares é encontrada logo abaixo da lâmina própria.(38–40)

A maior parte do suprimento sanguíneo do vas deferente chega lateralmente ao plano de maior eixo próximo ao musculo e dentro do mesentério. Os nervos não parecem acompanhar os feixes vasculares, embora existam alguns neurônios próximos aos vasos sanguíneos principais. Em vez disso, neurônios individuais, tanto mielinizados quanto não mielinizados, percorrem a superfície do revestimento muscular ao redor de toda a sua circunferência para formar um plexo denso. Ramos são enviados profundamente no músculo a partir deste plexo periférico. (38–40)

A topologia do lúmen no ducto deferente proximal é relativamente simples. Sua forma bruta é similar à de um cilindro afilado; o diâmetro luminal diminuindo de um intervalo de 340-350 pm na extremidade do epidídimo para 150-190 pm no ponto médio aproximado do órgão. Isso ocorre tanto porque a altura das células epiteliais aumenta ao longo do ducto quanto porque o diâmetro do epitélio mais a lâmina própria diminui. Também é digno de nota que a densidade da rede capilar subepitelial aumenta distalmente. (38–40)

1.4.3 PORÇÃO DISTAL

As seções transversais do ducto deferente distal são circulares em perfil devido à aquisição de espessas camadas musculares longitudinais. A distribuição dos nervos e vasos sanguíneos principais é semelhante à do canal proximal, exceto que parece haver um número maior de nervos mielinizados aqui do que os encontrados na porção proximal.(38–40)

Na região juncional entre os vasos deferentes proximal e distal, o epitélio começa a apresentar crenulações ou dobras. O que sinaliza o início do extenso dobramento do epitélio que é característico do segmento distal. Em qualquer seção transversal ao longo do canal. (38–40)

Em alguns casos, parece que as dobras internas estão dispostas em espiral ao longo do comprimento do tubo. Os tecidos conjuntivos e capilares da lâmina própria, mas não o músculo, são transportados para dentro das dobras e os capilares formam uma rica rede subepitelial. As mudanças drásticas na geometria do lúmen dificultam a avaliação do diâmetro luminal real nos canais deferentes distais. (38–40)

O lúmen efetivo é representado pela área em forma de estrela nas pontas das microvilosidades, e o volume luminal é bastante reduzido em comparação com as regiões mais proximais. Não se sabe ao certo se o lúmen aumenta de tamanho durante a ejaculação. (38–40)

1.4.4 PORÇÃO TERMINAL

Perto de sua terminação, o epitélio do ducto deferente distal se modifica. As células principais colunares altas que são características dos vasos distais são perdidas em algumas áreas e substituídas por ninhos de pequenas células que fagocitam ativamente os espermatozóide (38–40)

Distalmente a essa área, o ducto deferente torna-se confluyente com os ductos terminais da vesícula seminal, glândula coagulante e glândulas do ducto deferente para formar o ducto ejaculatório. Nessa área de junção, o epitélio característico do ducto deferente distal dá lugar a um epitélio mais simples. (38–40)

Essa estrutura é formada por células colunares com citoplasma infranuclear reduzido e sem microvilosidades evidentes. Essas células assemelham-se às que revestem os ductos das glândulas dos canais deferentes. (41)

1.5 NEUROFISIOLOGIA DA EJACULAÇÃO

A ejaculação compreende dois processos separados: emissão e expulsão. Durante a emissão, há a liberação de espermatozoides e componentes do líquido seminal na uretra prostática. Após essa etapa, a expulsão começa com contrações rítmicas intensas dos músculos estriados perineais e do esfíncter uretral estriado, impulsionando o sêmen para fora do corpo. (41–47)

A expulsão decorre da intensa ativação do sistema nervoso simpático, desencadeando espasmos rítmicos nos músculos perineais e coordenando os esfíncteres interno e externo da uretra. Essas contrações rítmicas são associadas à sensação de orgasmo. Em média, um indivíduo jovem e saudável experimenta de 10 a 15 contrações por ejaculação, com a frequência podendo diminuir durante o orgasmo.(42–45)

A ejaculação requer a ativação tanto do sistema nervoso autônomo quanto do sistema nervoso somático, além do envolvimento dos neurotransmissores não adrenérgicos não colinérgicos (NANC) na regulação da atividade das glândulas acessórias. De acordo com estudos neuroanatômicos, há indícios de que o sistema parassimpático é responsável pela secreção epitelial, enquanto o sistema nervoso simpático controla o tom e as contrações da musculatura lisa no trajeto seminal.(44,47,48)

As observações clínicas têm confirmado a importância crítica do sistema nervoso simpático no controle urogenital masculino. A anejaculação ou ejaculação retrógrada são consequências observadas em pacientes com danos no nervo simpático eferente. Utilizando a

estimulação elétrica do plexo hipogástrico, que abriga neurônios simpáticos pós-ganglionares, é possível realizar a coleta de sêmen em homens com paraplegia.(44,46,49)

O adequado fluxo ejaculatório anterógrado requer a coordenação precisa dos músculos estriados da região pélvica e do esfíncter uretral externo. A inervação motora desses músculos é mediada pelo nervo pudendo. Além disso, a função dos aferentes sensoriais genitais é fundamental na ejaculação, influenciando as respostas contráteis em diferentes estímulos sensitivos. Por exemplo, a aplicação de estimulação vibratória peniana na glândula tem sido eficaz na coleta de espermatozoides em mais de 50% dos casos em homens com lesões na medula espinhal.(44,50–52)

O controle da ejaculação envolve diferentes regiões da coluna vertebral. Neurônios simpáticos pré-ganglionares localizados na coluna intermediolateral e na coluna cinzenta dorsal (T12-L2) inervam a área urogenital. Parassimpáticos pré-ganglionares, responsáveis pela inervação da área urogenital, estão localizados na coluna intermediolateral entre S2-S4. Neurônios somáticos responsáveis pela inervação motora dos esfíncteres pelvipereineal e uretral são encontrados no núcleo de Onuf no corno ventral de S2-S4. Além disso, um grupo de interneurônios espinhais foi identificado em modelos animais como geradores de ejaculação.(41,44,47,49–52)

Um elemento fundamental na indução da ejaculação foi identificado na área lombar entre L3 e L4. Estes segmentos de neurônios espinotalâmicos, conhecidos como geradores espinotalâmicos da ejaculação, coordenam os processos autônomos e somáticos (pudendo), desencadeando o processo ejaculatório. Esses interneurônios integram e coordenam informações somatossensoriais, incluindo impulsos excitatórios e inibitórios supraespinhais. (41,44,47,49–52)

A regulação cerebral da ejaculação é intrincada e deriva da interação entre diversos grupos neurais distribuídos em diferentes regiões cerebrais, subdivididos em sensíveis/integrativos, excitatórios e inibitórios. As áreas cerebrais que participam ativamente da ejaculação são a divisão póstero-medial do núcleo leito dos estriaterminais, a área póstero-dorsal da amígdala, o núcleo pré-óptico póstero-dorsal e a parte parvocelular do tálamo subparafascicular. (41,44,47,49)

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar o papel fisiológico da 6-nitrodopamina, dopamina, noradrenalina e adrenalina no *vas deferens* epididimal isolado de rato (VDEIR).

2.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar o papel da 6-nitrodopamina e demais catecolaminas na contração induzida por EFS em VDEIR.
- II. Avaliar o papel dos antidepressivos tricíclicos na contração induzida por 6-nitrodopamina, dopamina, noradrenalina e adrenalina;
- III. Avaliar o papel dos antagonistas α_1 -adrenérgicos na contração induzida por 6-nitrodopamina, dopamina, noradrenalina e adrenalina;
- IV. Caracterizar o mecanismo farmacológico das contrações induzidas por EFS em ducto deferente isolado de rato;
- V. Quantificar a liberação da dopamina por LC-MS/MS;

3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 Artigo 1 - 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation

José Britto-Júnior, Luiz Ximenes, André Ribeiro, Adriano Fregonesi, Rafael Campos, Luiz Ricardo de Almeida Kiguti, Fabíola Z. Mônica, Edson Antunes, Gilberto De Nucci

Revista: European Journal of Farmacologic

Situação: Aceito a publicação em 29 de setembro de 2021. Publicado on-line em 04 de outubro de 2021.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation

José Britto-Júnior^{a,*}, Luiz Ximenes^a, André Ribeiro^a, Adriano Fregonesi^a, Rafael Campos^{b,c}, Luiz Ricardo de Almeida Kiguti^d, Fabíola Z. Mônica^a, Edson Antunes^a, Gilberto De Nucci^{a,b,d,e}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Campinas, Brazil

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

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

^d Metropolitan University of Santos (UNIMES), Santos, Brazil

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Dopamine
Nitric oxide
Ejaculation
Tricyclic antidepressants
Carbamazepine
Cyclobenzaprine

ABSTRACT

6-nitrodopamine (6-ND) is released from human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity by acting as a dopamine antagonist. Here we investigate whether 6-ND is released by the rat isolated vas deferens and its effect on this tissue. Dopamine, noradrenaline, adrenaline and 6-ND levels were quantified in rat isolated vas deferens by LC-MS-MS. Electric-field stimulation (EFS) and concentration-response curves to 6-ND, noradrenaline, dopamine and adrenaline were performed in the absence and in the presence (30 min) of L-NAME, SCH-23390, haloperidol, PG-01037, sonepiprazole, desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine, carbamazepine, maprotiline, paroxetine, oxcarbazepine and ketanserin in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD).

Basal releases of 6-ND and noradrenaline were detected from the rat isolated vas deferens. 6-ND release was reduced by tissue incubation with L-NAME and from the vas deferens obtained from L-NAME-treated rats.

SCH-23390 caused leftward shifts on concentration-response curves to 6-ND without affecting dopamine- or EFS-induced RIEVD contractions. Haloperidol, PG-01037 and sonepiprazole caused significant rightward shifts on concentration-response curves to dopamine but had no effect on either the 6-ND or EFS-induced RIEVD contractions.

The tricyclic compounds desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine and carbamazepine induced rightward shifts on 6-ND concentration-response curve but did not reduce the noradrenaline, dopamine and adrenaline contractile responses. They also reduced the EFS-induced RIEVD contractions in control but not in tissues obtained from L-NAME-treated animals. Maprotiline, oxcarbazepine, paroxetine and ketanserin had no effect in either 6-ND or EFS-induced RIEVD contractions.

Thus, 6-ND modulates RIEVD contractility, and desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine and carbamazepine act as selective 6-ND receptor antagonists.

1. Introduction

The nitrocatecholamines nitronoradrenaline (NN) and nitroadrenaline have been extracted from rat brain (Tsunoda et al., 2007) and 6-nitronoradrenaline (6-NN) was detected in microdialysates of the rat spinal cord dorsal horn (Chiari et al., 2000). Noradrenaline transport in rat synaptosomes is inhibited by 6-NN (Shintani et al., 1996) and the intratechal administration of 6-NN induces analgesia due to release of

noradrenaline (Chiari et al., 2000). These observations indicate that the nitrocatecholamines may act as neuronal mediators in the central nervous system.

Endothelium-dependent basal release of both dopamine (Britto-Júnior et al., 2020a) and 6-nitrodopamine (6-ND) was identified by tandem mass spectrometry in *Chelonoidis carbonaria* aorta (Campos et al., 2021). Human umbilical cord vessels (HUCV) also present a basal release of both dopamine (Britto-Júnior et al., 2020b) and 6-ND

* Corresponding author. University of Campinas (Unicamp), Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária, 13063-887, Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: josebrittoj@unicamp.br (J. Britto-Júnior).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174544>

Received 7 September 2021; Received in revised form 22 September 2021; Accepted 29 September 2021

Available online 1 October 2021

0014-2999/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Britto-Júnior et al., 2021) and the synthesis of 6-ND was inhibited by incubation with the nitric oxide (NO) synthesis inhibitor L-NAME. Interestingly, 6-ND modulates HUCV reactivity through selective antagonism of dopamine D_2 -like receptors, indicating that 6-ND may have modulatory role outside the central nervous system (Britto-Júnior et al., 2021). Electric field stimulation (EFS) causes a biphasic muscular contraction in the rat isolated vas deferens, which is characterized by an initial purinergic (ATP) component, followed by an adrenergic (noradrenaline) component (French and Scott, 1983). The purinergic element is more prominent in the prostatic portion whereas the adrenergic contraction is more predominant in the epididymal part (Anton, Duncan & McGrath, 1977). In this manuscript, the potential release of 6-ND from rat isolated vas deferens and the effect of this novel catecholamine in the vas deferens contractility have been investigated.

The results here reported show that rat isolated vas deferens presents a basal release of 6-ND in addition to noradrenaline, as detected by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). The dopamine receptor antagonist D_1 (SCH-23390; Hyttel, 1983) caused a left-shift on the concentration-response curve to 6-ND, but it had no effect on the contractions induced by dopamine or EFS in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). The D_2 like (haloperidol; Miranda et al., 1988), D_3 (PG-01037; Grundt et al., 2005) and D_4 (sonopiprazole; Merchant et al., 1996) receptor antagonists caused significant right-shifts on the concentration-response curves to dopamine, but they did not inhibit the 6-ND- or EFS-induced RIEVD contractions.

The tricyclic compounds desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine and carbamazepine caused selective rightward shifts on the concentration-response curves to 6-ND in the RIEVD, without inhibiting the contractile responses to dopamine, noradrenaline and adrenaline. The EFS-induced RIEVD contractions were significantly reduced by these tricyclic compounds, however they had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME. Maprotiline, paroxetine, ketanserin and the tricyclic compound oxcarbazepine had no effect on either 6-ND or EFS-induced contractions.

These results indicate that 6-ND is an endogenous mediator of EFS-induced contractions of RIEVD, and that the selective antagonism of the 6-ND receptor by the tricyclic antidepressants may constitute a novel mechanism of action by which these drugs delay ejaculation in man (Hsu and Shen, 1995).

2. Methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (280–320 g) were provided by the animal care of University of Campinas (UNICAMP) and University of São Paulo (USP). All experimental protocols were authorized by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/UNICAMP: 5557-1/2020) and followed the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (Percie du Sert et al., 2020). Animals were housed in cages ($n = 3$ per cage) located in ventilated cage shelters with constant humidity of $55\% \pm 5\%$ and temperature of $24 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12-h light-dark cycle and received filtered water and standard food *ad libitum*.

2.2. Reagents

Dopamine, adrenaline, noradrenaline, desipramine, serotonin, SCH-23390, ascorbic acid, carbachol, atropine and N^G -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) were acquired from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, Missouri, USA). Amitriptyline, clomipramine, cyclobenzaprine, haloperidol and paroxetine were obtained from Vamsi Labs Ltd. (Solapur, Maharashtra, India). Maprotiline was obtained from Beijing Merson Pharm (Daxing District, Beijing, China). Carbamazepine, oxcarbazepine, ketanserin and sonopiprazole were purchased from Cayman Chemical Co (Michigan, USA). PG-01037 was

bought from Bio-Techne Corporation (Minneapolis, Minnesota, USA).

Dopamine- d_3 hydrochloride, DL-noradrenaline- d_6 hydrochloride and adrenaline- d_6 hydrochloride were acquired from CDN Isotopes (Point Claire, Quebec, Canada). 6-nitrodopamine and 6-nitrodopamine- d_4 were purchased from Toronto Research Chemicals Inc (Toronto, Ontario, Canada). Aluminium oxide was purchased from Dinamica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, São Paulo, Brazil). Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), calcium chloride (CaCl_2), magnesium sulfate (MgSO_4), sodium bicarbonate (NaHCO_3), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) and glucose were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Acetonitrile and methanol were bought from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and formic acid from Mallinckrodt (St Louis, Missouri, USA).

2.3. L-NAME treatment

Rats were chronically treated with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (20 mg/rat/day) in the drinking water for 4 weeks minimum (Ribeiro et al., 1992). Control animals received tap water alone.

2.4. Rat isolated vas deferens (RIVD) preparations

Euthanasia was performed by isoflurane overdose, in which animals were exposed to a concentration greater than 5% until 1 min after the breathing stops. Exsanguination was performed to confirm the euthanasia. The vas deferens was removed and immediately placed in Krebs-Henseleit's solution (KHS) of the following composition (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 5.6 mM glucose). Epididymal portions of vas deferens were surgically dissected (length, 1.5 cm, each) for functional studies.

2.5. Basal release of catecholamines in RIVD

Two whole strips of RIVD from one rat were suspended in 5-mL organ bath containing KHS (pH 7.4) and ascorbic acid (3 mM) continuously gassed with a mixture of 95% O_2 -5% CO_2 at 37°C for 30 min. The RIVD whole strips were incubated in the absence and in the presence of L-NAME (100 μM , 30 min). Two aliquots of 2 mL of the supernatant were transferred to two tubes and stored at -20°C until analysis (Britto et al., 2020b, 2021). The same procedure was employed to evaluate the basal release of catecholamines from RIEVD of animals chronically treated with L-NAME.

2.5.1. Extraction and quantification of 6-nitrodopamine (6-ND) by LC-MS/MS analysis

The extraction and quantification of 6-ND in KHS were performed as reported previously (Campos et al., 2021). Briefly, 6-ND was extracted from 1 mL of KHS by solid phase extraction (SPE). Calibrators and quality controls (QCs) prepared in blank KHS and the KHS samples obtained from RIVD strips for 30 min were spiked with 50 μL of the internal standard (IS) solution (6-ND- d_4 , 100 ng/mL). Extraction cartridges were conditioned with 1 mL of methanol and then equilibrated with 2 mL of deionized water. The samples were transferred to the extraction cartridges and washed three times with deionized water. The samples were eluted with 0.9 mL methanol/deionized water (90/10, v/v) plus 0.1% formic acid and followed by evaporation under N_2 flow at 50°C . The dry residues were dissolved with 100 μL acetonitrile/deionized water (50/50, v/v) plus 0.1% formic acid, transferred to vials and submitted to chromatographic analysis.

The separation of 6-ND was performed on a 150 mm $\times$ 3.0 mm Shim-pack GIST-HP C_{18} column, 3- μm particle size (Shimadzu, Duisburg, Germany) held at 65°C . A 75% of mobile phase A consisting of deionized water with 0.1% formic acid (v/v) and 25% of mobile phase B consisting of acetonitrile/deionized water (90/10, v/v) plus 0.1% formic acid at a flow rate of 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ in an isocratic mode were used. The detection of 6-ND and IS was carried out by a LC-MS-8060 triple

quadrupole mass spectrometer (MS/MS) (Shimadzu, Kyoto), operating in positive ionization mode. The analyses were performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The protonated ions $[M + H]^+$ and their respective ion products monitored were 199.10 > 181.95 and 203.10 > 186.00 for 6-ND and 6-ND-d4, respectively.

2.5.2. Extraction and quantification of dopamine, noradrenaline and adrenaline by LC-MS/MS analysis

The extraction and quantification of dopamine, noradrenaline and adrenaline in KHS with ascorbic acid (3 mM) were carried out as previously described (Britto et al., 2020c). Briefly, 100 μ L of the internal standards (dopamine-d3, noradrenaline-d6 and adrenaline-d6 at 100 ng/mL) were added to the KHS (2 mL) followed by 1.5 mL of deionized water. After vortexing for 10 s, 100 mg of Al_2O_3 was added and left for incubation for 20 min in an orbital agitator. The tubes were then centrifuged at 2000 g for 4 min at 4 °C and the supernatant discarded. The residue was washed four times with 2 mL of deionized water. After the final washing, 200 μ L of a solution containing trifluoroacetic acid 0.1% in HCN/H₂O (60/40; v/v) were added. After vortexing for 40 s, the Eppendorf tubes were centrifuged for 2000 g for 5 min and the supernatant transferred to the vials for injection. The samples were analyzed by liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, LC-MS-8050 (Shimadzu, Kyoto). The separation of catecholamines was performed on a 100 $\times$ 4.6 mm Lichrospher RP-8 column (GL Sciences Inc., Tokyo) using acetonitrile/water (5/95, v/v) with 0.1% formic acid as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. The mass spectrometer operated in positive electrospray ionization mode (ES⁺) for catecholamine detection. The analyses were executed in selected Multiple Reaction Monitoring (MRM) detection mode. The protonated ions $[M + H]^+$ and their respective ion products monitored were 154.00 > 91.15, 170.10 > 107.10 and 184.20 > 107.00 for dopamine, noradrenaline and adrenaline, respectively and 157.00 > 93.00, 176.10 > 158.10 and 190.00 > 171.95 for dopamine-d3, noradrenaline-d6 and adrenaline-d6, respectively.

2.6. Preparation of rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) for the in vitro functional assays

The RIEVD was suspended vertically between metal hooks in 10-mL organ baths containing KHS (pH 7.4), continuously gassed with a mixture of 95%O₂: 5%CO₂ at 37 °C. Tissues were allowed to equilibrate under a resting tension of 10 mN, and the isometric tension was registered using a PowerLab system (ADInstruments, Sydney, Australia). Following a 45-min stabilization period, the RIEVD were contracted with a single concentration of noradrenaline (NA, 3 μ M) to verify the tissue viability.

Cumulative concentration-response curves to 6-ND, dopamine, noradrenaline, adrenaline, carbachol and serotonin (5-HT) were performed in RIEVD strips, in the absence and presence of L-NAME (100 μ M, 30 min), SCH-23390 (100 nM, 30 min), haloperidol (100 nM, 30 min), PG-01037 (10 nM, 30 min), sonopirazole (100 nM, 30 min), desipramine (100, 30 min), clomipramine (100 nM, 30 min), amitriptyline (100, 30 min), cyclobenzaprine (100 nM, 30 min), carbamazepine (100 nM, 30 min), maprotiline (100 nM, 30 min), paroxetine (100 nM, 30 min), oxcarbazepine (100 nM, 30 min), ketanserin (10 nM, 30 min) and atropine (10 nM, 30 min). In another set of experiments the effect of desipramine, clomipramine, amitriptyline, cyclobenzaprine and carbamazepine on the 6-ND concentration-response curve were evaluated at 3 different concentrations (30, 100 and 300 nM).

Contractions of RIEVD induced by EFS were also evaluated. The RIEVD were submitted to EFS at 60 V for 20 s, at 2–16 Hz in square-wave pulses, 0.3 ms pulse width, and 0.1 ms delay, using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical, Industrial Park, RI, USA). EFS-induced RIEVD contractions were evaluated in the absence and in the presence of L-NAME (100 μ M, 30 min), SCH-23390 (100 nM, 30 min), haloperidol (100 nM, 30 min), PG-01037 (10 nM, 30 min), sonopirazole (100 nM,

30 min), desipramine (100 nM, 30 min), clomipramine (100 nM, 30 min), amitriptyline (100 nM, 30 min), cyclobenzaprine (100 nM, 30 min), carbamazepine (100 nM, 30 min), maprotiline (100 nM, 30 min), paroxetine (100 nM, 30 min), oxcarbazepine (100 nM, 30 min), ketanserin (10 nM, 30 min) and atropine (10 nM, 30 min).

2.7. Data analysis

Nonlinear regression analysis to determine the pEC₅₀ was carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, version 6.0, San Diego, California, USA) with the constraint that $F = 0$. All concentration-response data were evaluated for a fit to a logistics function in the form: $E = E_{max}/[1 + (10c/10x)^n] + F$, where E represents the increase in response contractile induced by the agonist, E_{max} is the effect agonist maximum, c is the logarithm of concentration of the agonist that produces 50% of E_{max} , x is the logarithm of the concentration of the drug; the exponential term, n , is a curve fitting parameter that defines the slope of the concentration-response line, and F is the response observed in the absence of added drug. The results were expressed as mN. One strip was used as the control response and the other strip was incubated with an antagonist/inhibitor. Student's two-tail unpaired t -test was employed and the differences between groups. In addition, standard ANOVA, followed by the Newman-Keuls post-test, were used when more than two groups were involved, as for the experiments shown in Figs. 3–8. The distribution of the log values (pEC₅₀) was normal for each agonist, confirmed by the Shapiro-Wilk test (Motulsky, 2014). A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Levels of 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in RIVD strips by LC-MS-MS

The calibration curve of 6-ND was linear for concentrations of 0.1–10 ng/mL, with a correlation coefficient higher than 0.99 (data not shown). The limit of quantification was 0.1 ng/mL. A basal release of 6-ND was detected in RIVD strips (Fig. 1A and B). Pre-treatment of the RIVD strips with L-NAME (100 μ M) for 30 min caused a significant reduction of basal 6-ND release ($p = 0.0021$; Fig. 1A). A smaller, but significant reduction of 6-ND levels, was also observed in RIVD obtained from animals chronically treated with L-NAME (Fig. 1B).

The calibration curves for dopamine, noradrenaline and adrenaline were linear for concentrations of 0.1–10.0 ng/mL, with a correlation coefficient higher than 0.99 (data not shown). The limit of quantification was 0.1 ng/mL. A basal release of noradrenaline was detected (0.4 ± 0.2 ng/mL; $n = 10$), but it was not significantly affected by pre-treatment with L-NAME for 30 min (0.5 ± 0.3 ng/mL, $n = 10$; $p = 0.6153$). Dopamine and adrenaline concentrations in RIVD were below the limit of quantification (data not shown).

3.2. Effect of dopamine receptor antagonists on RIEVD contractions induced by dopamine, 6-ND and EFS

Dopamine (1 nM–1 mM) and 6-ND (1 nM–1 mM; pEC₅₀ 4.64 ± 0.10 $n = 16$) produced concentration-dependent contractions and EFS (2–16 Hz) caused frequency-dependent contractions of RIEVD (Fig. 2). Incubation with the dopamine D₁ receptor antagonist SCH-23390 (100 nM) had no effect on dopamine concentration-curve (Fig. 2A) but caused a significant leftward shift on the concentration-response curves to 6-ND ($p = 0.0349$; Fig. 2B). The EFS-induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation with SCH-23390 (100 nM; Fig. 2C).

Incubation with the dopamine D₂-like receptor antagonist haloperidol (100 nM) caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.0017$; Fig. 2D), but had no effect on the concentration-response curves to 6-ND ($p = 0.4518$; Fig. 2E). The

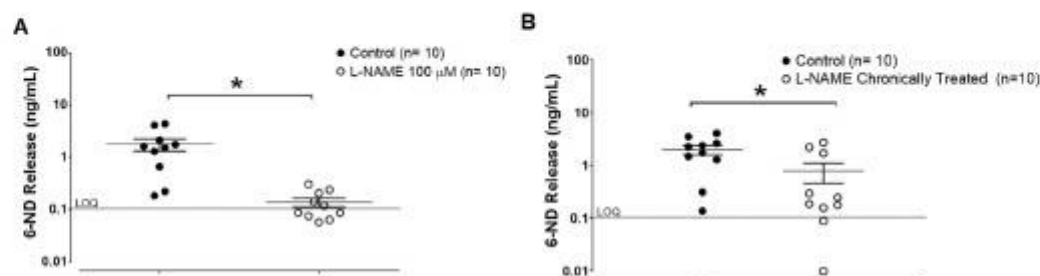


Fig. 1. Basal release of 6-nitrodopamine (6-ND) by rat isolated vas deferens (RIVD) as quantified by tandem mass spectrometry. Panel A shows the effect a 30 min-period incubation of the RIVD in Krebs-Henseleit's solution with or without L-NAME (100 μ M). Panel B shows the basal release of 6-ND from RIVD obtained from control animals and from animals chronically treated with L-NAME. * $P < 0.05$ control vs L-NAME. n means the number of vas deferens strips.

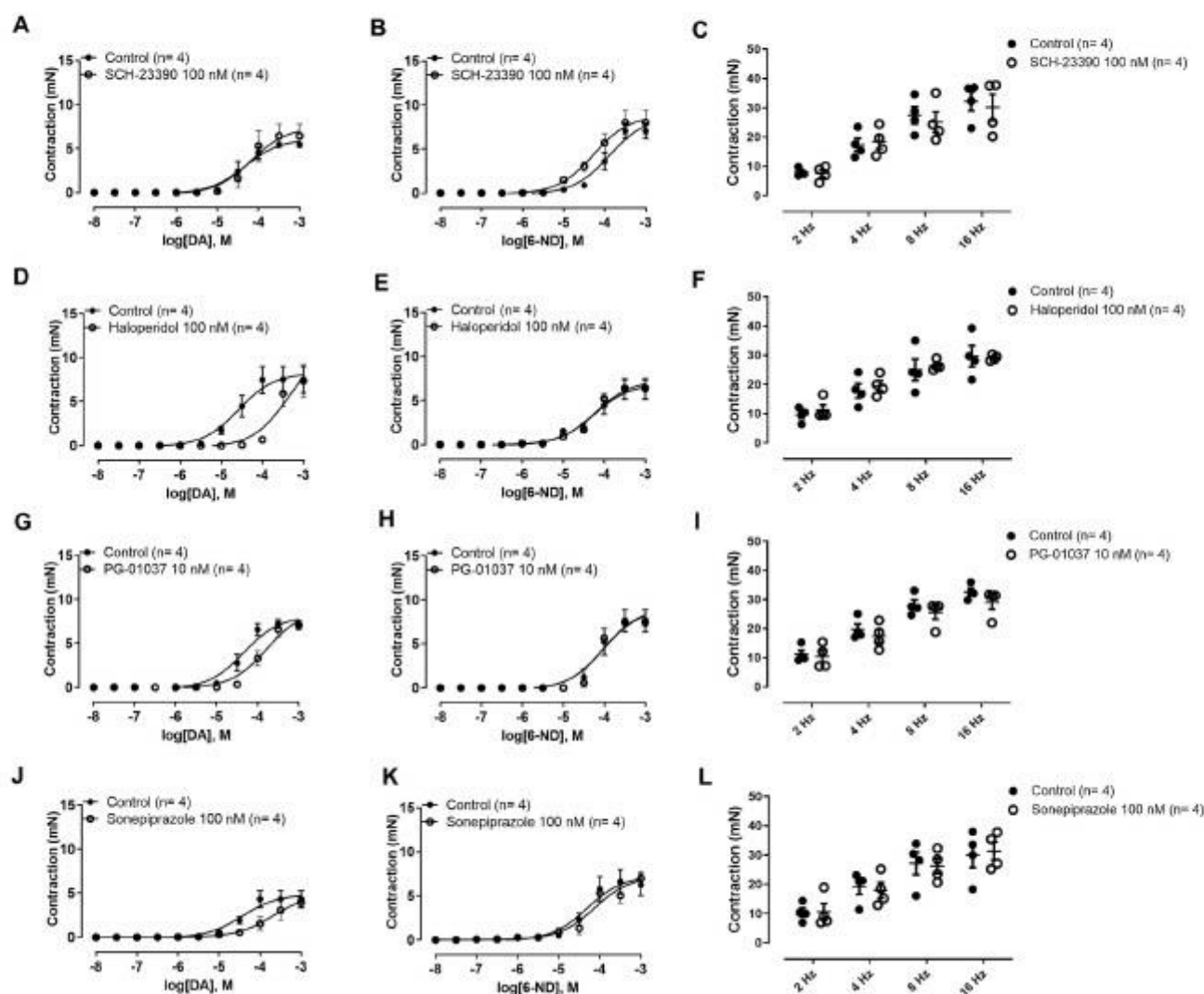


Fig. 2. Effects of dopaminergic receptor antagonists SCH-23390 (100 nM; panels A–C), haloperidol (100 nM; panels D–F), PG-01037 (10 nM; panels G–I) and sonepiprazole (100 nM; panels J–L) on the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) contractions induced by dopamine, 6-nitrodopamine (6-ND) and electric-field stimulation (EFS). Note that haloperidol, PG-01037 and sonepiprazole (but not SCH-23390) causes leftward shifts on concentration-response curves to dopamine. None of these antagonists affected the 6-ND-induced contractions, except SCH-23390 that produced a leftward shift in the concentration-response curves. The EFS-induced contractions were not affected by any antagonist. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

EFS-induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation with haloperidol (100 nM; Fig. 2F).

Incubation with the dopamine D_3 receptor antagonist PG-01037(10

nM) caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.0029$; Fig. 2G) but no had effect on the concentration-response curves to 6-ND ($p = 0.4977$; Fig. 2H). The EFS-

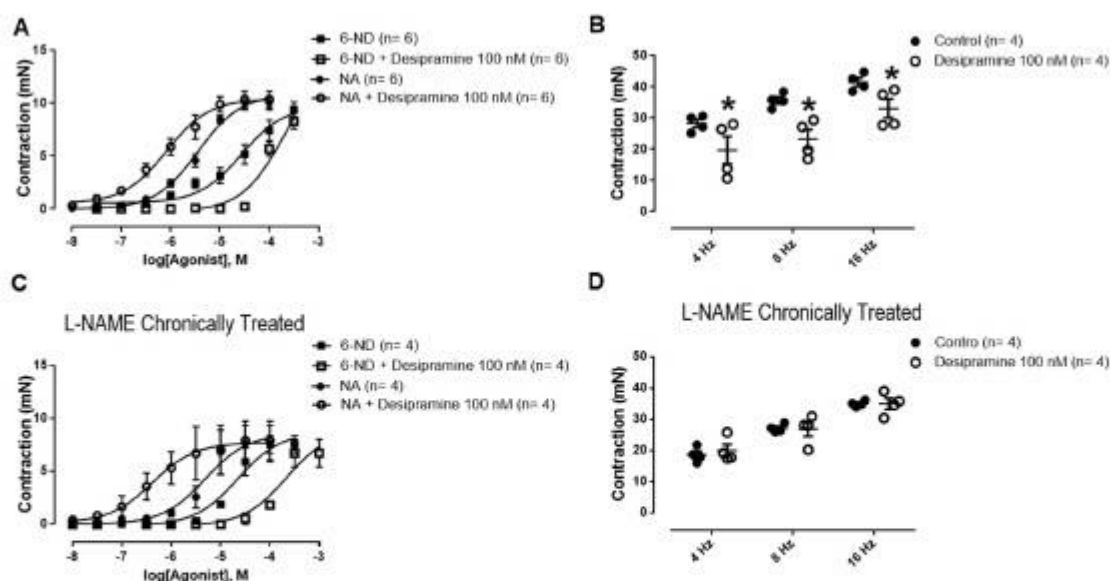


Fig. 3. Effect of desipramine (100 nM) in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) obtained from control (Panels A and B) and from L-NAME chronically treated rats (Panels C and D). Desipramine caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to 6-ND and a significant leftward shift of the concentration-response curves to NA in RIEVD obtained from control (panel A) and from L-NAME chronically treated rats (Panel C). Electric-field stimulation (EFS) caused frequency-dependent contractions of the RIEVD obtained from control (Panel B) and from L-NAME chronically treated rats (Panel D). Desipramine (100 nM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS in RIEVD obtained from control animals (Panel B) but had no effect on those obtained from L-NAME chronically treated rats (Panel D). $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

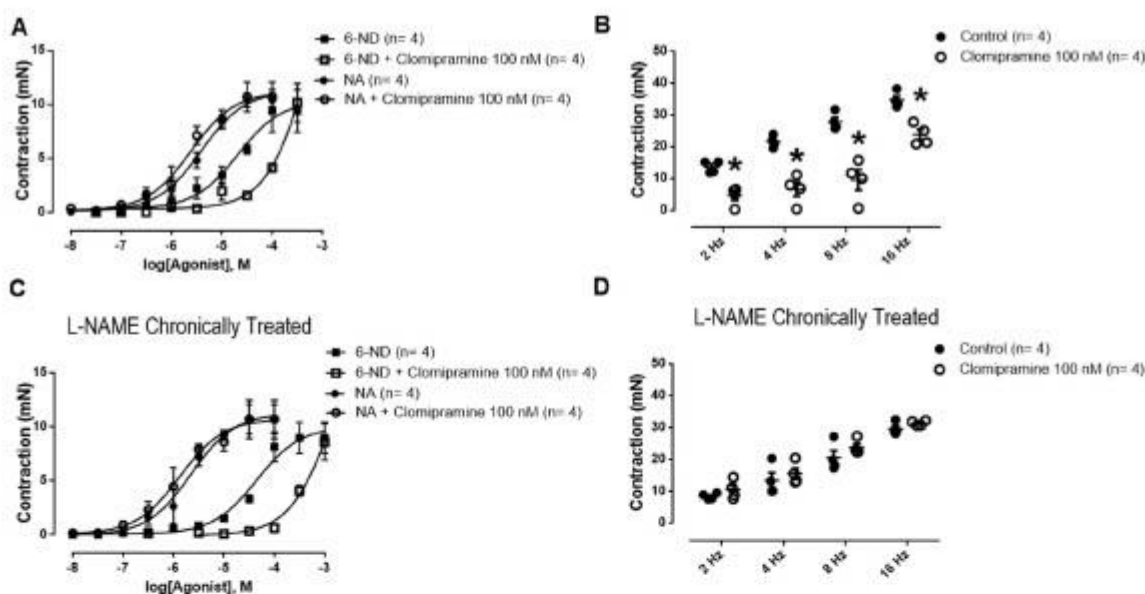


Fig. 4. Effect of clomipramine (100 nM) in rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) obtained from control (Panels A and B) and from L-NAME chronically treated rats (Panels C and D). Clomipramine caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to 6-ND but it did not affect the concentration-response curves to NA in RIEVD obtained from control (panel A) and from L-NAME chronically treated rats (Panel C). Electric-field stimulation (EFS) caused frequency-dependent contractions of the RIEVD obtained from control (Panel B) and from L-NAME chronically treated rats (Panel D). Clomipramine (100 nM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS in RIEVD obtained from control animals (Panel B) but had no effect on those obtained from L-NAME chronically treated rats (Panel D). $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation with PG-01037 (10 nM; Fig. 2I).

Incubation with the dopamine D₄ receptor antagonist sonepiprazole (100 nM) caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.0121$; Fig. 2J) but had no effect on the concentration-response curves to 6-ND ($p = 0.2022$; Fig. 2L). The EFS-induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation

with sonepiprazole (100 nM; Fig. 2M).

3.3. Effect of desipramine on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Incubation with desipramine (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0254$) on the concentration-response curves to 6-ND

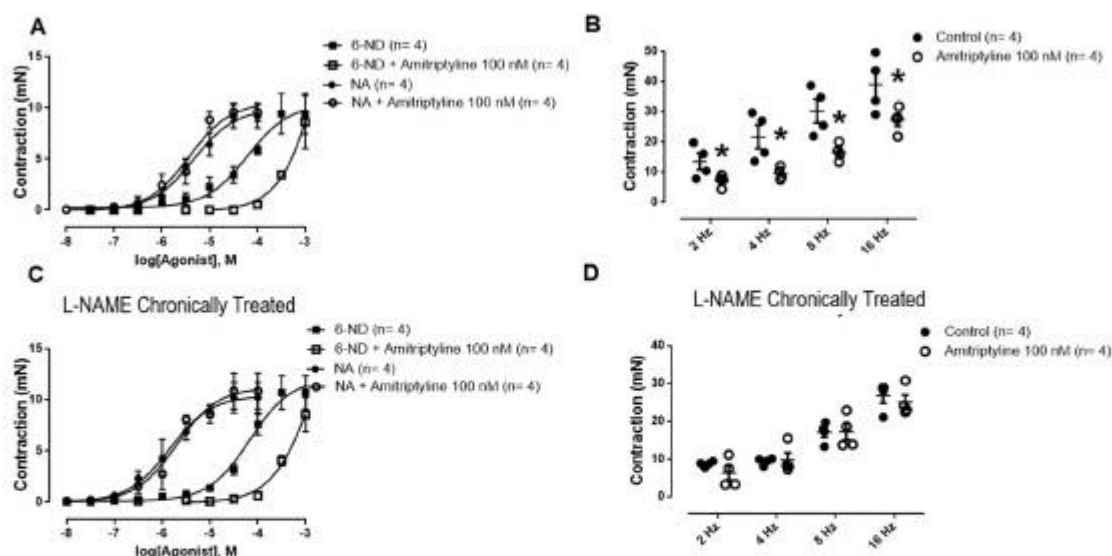


Fig. 5. Effect of amitriptyline (100 nM) in rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) obtained from control (Panels A and B) and from L-NAME chronically treated rats (Panels C and D). Amitriptyline caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to 6-ND but it did not affect the concentration-response curves to NA in RIEVD obtained from control (panel A) and from L-NAME chronically treated rats (Panel C). Electric-field stimulation (EFS) caused frequency-dependent contractions of the RIEVD obtained from control (Panel B) and from L-NAME chronically treated rats (Panel D). Amitriptyline (100 nM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS in RIEVD obtained from control animals (Panel B) but had no effect on those obtained from L-NAME chronically treated rats (Panel D). $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

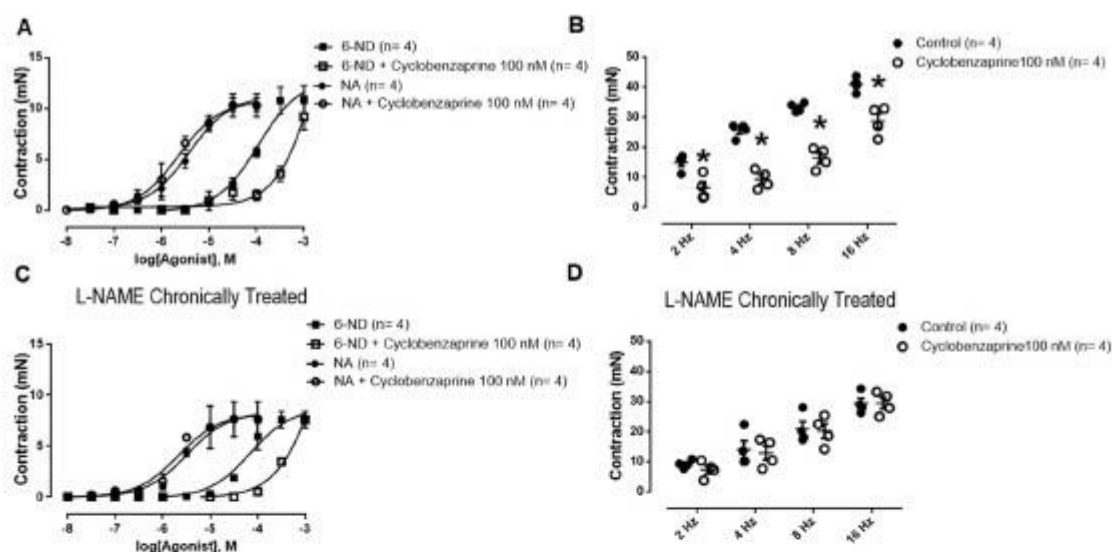


Fig. 6. Effect of cyclobenzaprime (100 nM) in rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) obtained from control (Panels A and B) and from L-NAME chronically treated rats (Panels C and D). Cyclobenzaprime caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to 6-ND but it did not affect the concentration-response curves to NA in RIEVD obtained from control (panel A) and from L-NAME chronically treated rats (Panel C). Electric-field stimulation (EFS) caused frequency-dependent contractions of the RIEVD obtained from control (Panel B) and from L-NAME chronically treated rats (Panel D). Cyclobenzaprime (100 nM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS in RIEVD obtained from control animals (Panel B) but had no effect on those obtained from L-NAME chronically treated rats (Panel D). $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

(Fig. 3A) and a significant leftward shift ($pEC_{50} 5.45 \pm 0.08$ and 6.08 ± 0.11 with and without desipramine, respectively) on the concentration-response curves to noradrenaline (Fig. 3A). The rightward shift on the 6-ND concentration-response curve was concentration-dependent (6.0 ± 0.7 , 13.8 ± 1.7 and 30.5 ± 5.3 for 30, 100 and 300 nM, respectively, $n = 4$; $p = 0.0013$, Fig. S01A). Electric-field stimulation caused frequency-dependent RIEVD contractions (Fig. 3B), which were all significantly reduced by prior incubation with desipramine (100 nM; Fig. 3B).

Similarly, in RIEVD obtained from chronic L-NAME treatment,

desipramine (100 nM) also caused a significant rightward shift ($p = 0.0001$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 3C) and a significant leftward shift ($p = 0.0109$) on the concentration-response curves to noradrenaline (Fig. 3C). However, in chronic L-NAME-treated preparations, desipramine (100 nM) failed to significantly affect the EFS-induced RIEVD contractions in all frequencies tested (Fig. 3D).

Desipramine (100 nM) caused no significant shifts ($p = 0.6289$) on the concentration-response curve to dopamine (Table 1) but provoked a significant leftward shift ($p = 0.0210$) on concentration-response curve

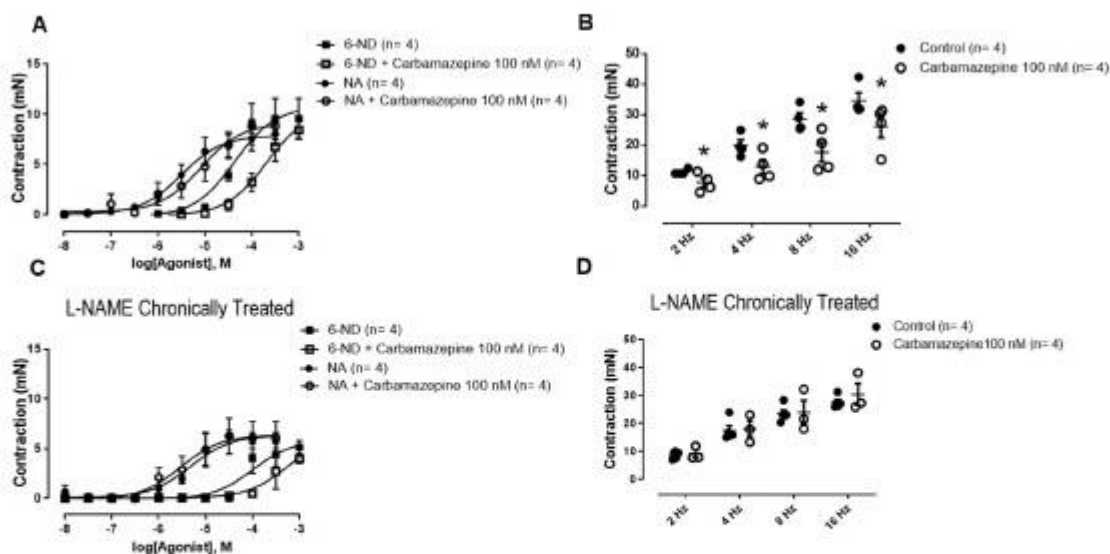


Fig. 7. Effect of carbamazepine (100 nM) in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) obtained from control (Panels A and B) and from L-NAME chronically treated rats (Panels C and D). Carbamazepine caused a significant rightward shift of the concentration-response curves to 6-ND but it did not affect the concentration-response curves to NA in RIEVD obtained from control (panel A) and from L-NAME chronically treated rats (Panel C). Electric-field stimulation (EFS) caused frequency-dependent contractions of the RIEVD obtained from control (Panel B) and from L-NAME chronically treated rats (Panel D). Carbamazepine (100 nM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS in RIEVD obtained from control animals (Panel B) but had no effect on those obtained from L-NAME chronically treated rats (Panel D). $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

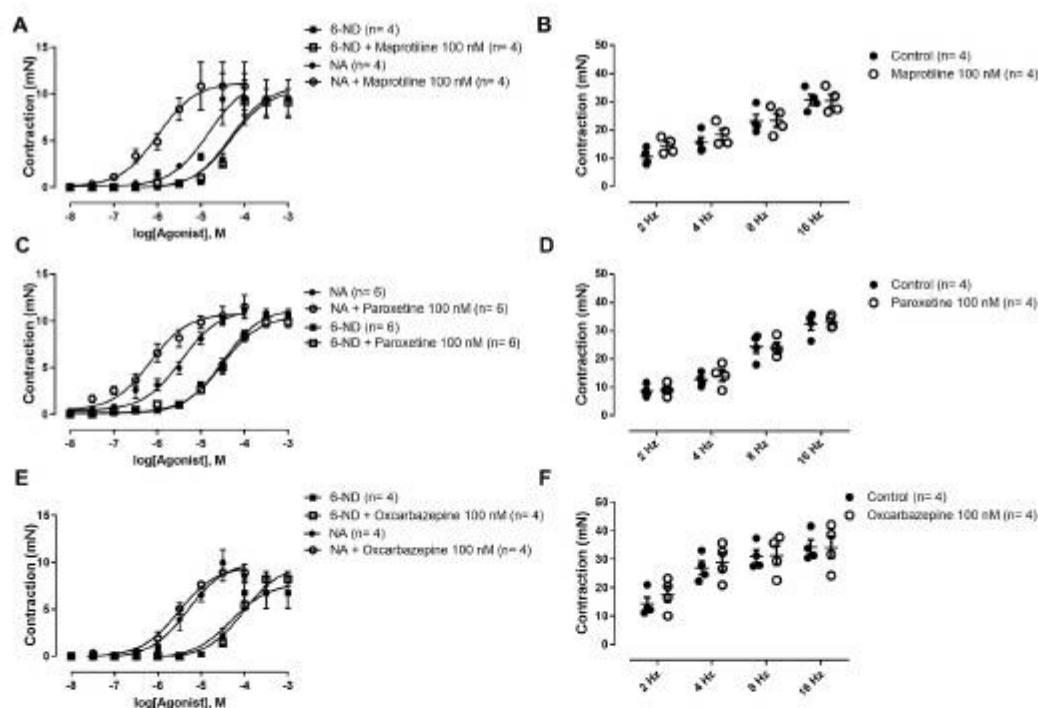


Fig. 8. Effect of maprotiline (100 nM, panel A and B), paroxetine (100 nM, panel C and D) and oxcarbazepine (100 nM, panel E and F) in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). Maprotiline caused significant leftward shift of the concentration-response curves to NA but it did not affect the concentration-response curves to 6-ND (panel A). The contractions of the RIEVD induced by EFS were not affected by maprotiline (100 nM; Panel B). Paroxetine caused significant leftward shift of the concentration-response curves to NA but it did not affect the concentration-response curves to 6-ND (panel C). The contractions of the RIEVD induced by EFS were not affected by paroxetine (100 nM; Panel D). Oxcarbazepine caused no significant shift of the concentration-response curves to NA and 6-ND (panel E). The contractions of the RIEVD induced by EFS were not affected by oxcarbazepine (100 nM; Panel F). $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

to adrenaline (Table 2). In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, desipramine (100 nM) caused no significant shift ($p = 0.4702$) on the concentration-response curve to dopamine (Table 3)

but maintained a significant leftward shift ($p = 0.0003$) on concentration-response curve to adrenaline (Table 4).

Desipramine had no effects on the E_{max} values of 6-ND (Fig. 3A,C),

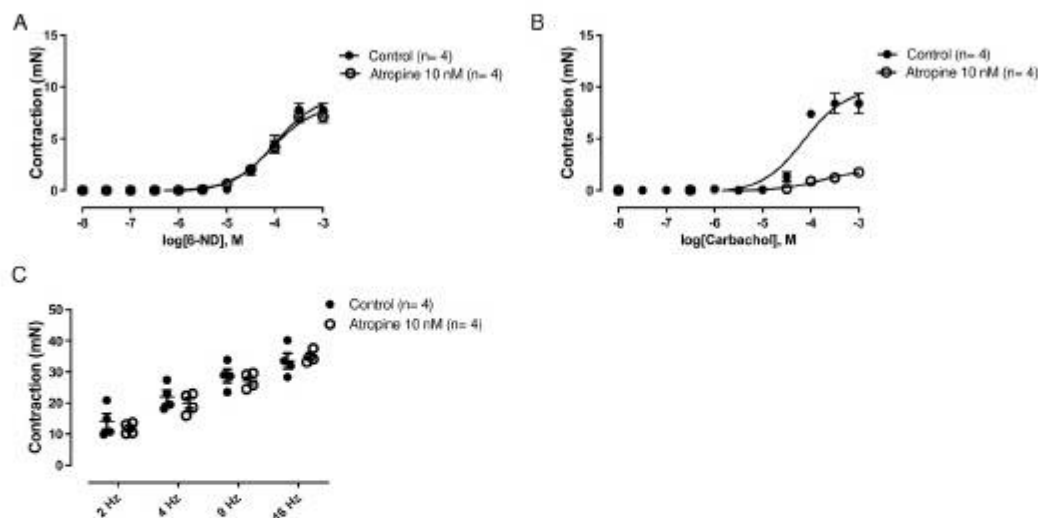


Fig. 9. Effect of atropine (10 nM) in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). Atropine no caused significant leftward shift of the concentration-response curves to ND (panel A) but it did not affect the concentration-response curves to carbachol (panel B). The contractions of the RIEVD induced by EFS were not affected by atropine (10 nM; Panel C). $P < 0.05$ compared with respective control values. n means the number of vas deferens strips.

Table 1

The potency (pEC_{50}) and maximum response (E_{max}) of the concentration-response curves to dopamine in rat isolated epididymal vas deferens.

Dopamine	pEC_{50} (log[M])	E_{max} (mN)	n
Control	4.93 ± 0.13	10.47 ± 1.34	6
Desipramine (100 nM)	4.83 ± 0.19	10.87 ± 1.34	6
Control	4.76 ± 0.25	11.90 ± 2.07	4
Clomipramine (100 nM)	4.82 ± 0.32	11.94 ± 2.42	4
Control	4.67 ± 0.30	8.50 ± 1.77	4
Amitriptyline (100 nM)	4.65 ± 0.28	7.94 ± 2.10	4
Control	4.60 ± 0.43	8.37 ± 1.26	4
Cyclobenzaprine (100 nM)	4.50 ± 0.45	8.46 ± 1.23	4
Control	4.37 ± 0.32	8.19 ± 1.10	4
Maprotiline (100 nM)	4.43 ± 0.20	8.16 ± 0.84	4
Control	4.44 ± 0.10	7.92 ± 0.92	4
Paroxetine (100 nM)	4.54 ± 0.15	6.58 ± 1.27	4
Control	4.47 ± 0.19	6.51 ± 1.60	4
Carbamazepine (100 nM)	4.48 ± 0.17	6.06 ± 1.21	4
Control	4.51 ± 0.14	8.15 ± 0.54	4
Oxcarbazepine (100 nM)	4.47 ± 0.19	8.98 ± 1.03	4

pEC_{50} is defined as the negative logarithm of the EC_{50} ; E_{max} is the maximal effect at high drug; n means the number of vas deferens strips.

noradrenaline (Fig. 3A,C), dopamine (Tables 1 and 3) or adrenaline (Tables 2 and 4).

3.4. Effect of clomipramine on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Incubation with clomipramine (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0001$) on the concentration-response curves to 6-ND without affecting the concentration-response curves to noradrenaline ($p = 0.2865$; Fig. 4A). The rightward shift on the 6-ND concentration-response curve was concentration-dependent (3.0 ± 1.4 , 17.5 ± 5.7 and 19.5 ± 4.5 for 30, 100 and 300 nM, respectively, $n = 4$; $p = 0.0057$; Fig. S01B). Electric-field stimulation caused frequency-dependent RIEVD contractions (Fig. 3B), which were significantly reduced by prior incubation with clomipramine in all frequencies tested (100 nM; Fig. 4B).

In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, clomipramine (100 nM) caused significant rightward shift ($p = 0.0024$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 4C) but produced no significant shift ($p = 0.1146$) of the concentration-response curves to noradrenaline (Fig. 4C). In RIEVD obtained from animals chronically

Table 2

The potency (pEC_{50}) and maximum response (E_{max}) of the concentration-response curves to adrenaline on rat isolated epididymal vas deferens.

Adrenaline	pEC_{50} (log[M])	E_{max} (mN)	n
Control	4.43 ± 0.16	9.92 ± 1.60	4
Desipramine (100 nM)	$5.07 \pm 0.12^*$	9.58 ± 1.17	4
Control	4.58 ± 0.14	9.31 ± 0.83	4
Clomipramine (100 nM)	4.88 ± 0.24	8.02 ± 0.59	4
Control	4.76 ± 0.24	8.80 ± 1.32	4
Amitriptyline (100 nM)	5.06 ± 0.35	8.12 ± 1.15	4
Control	4.97 ± 0.30	7.56 ± 1.07	4
Cyclobenzaprine (100 nM)	4.98 ± 0.25	7.19 ± 1.10	4
Control	5.03 ± 0.29	8.19 ± 1.10	4
Maprotiline (100 nM)	$5.71 \pm 0.17^{**}$	8.16 ± 0.84	4
Control	4.76 ± 0.13	8.53 ± 0.71	4
Paroxetine (100 nM)	$5.38 \pm 0.10^{**}$	6.97 ± 0.80	4
Control	4.73 ± 0.11	6.86 ± 1.48	4
Carbamazepine (100 nM)	4.72 ± 0.06	5.80 ± 1.68	4
Control	4.95 ± 0.14	8.58 ± 0.42	4
Oxcarbazepine (100 nM)	4.73 ± 0.22	8.27 ± 0.42	4

pEC_{50} is defined as the negative logarithm of the EC_{50} ; E_{max} is the maximal effect at high drug; n means the number of vas deferens strips.

* $P < 0.05$ compared with respective control values.

** $P < 0.01$ compared with respective control values.

Table 3

The potency (pEC_{50}) and maximum response (E_{max}) of the concentration-response curves to dopamine on isolated epididymal vas deferens of rats chronically treated with L-NAME.

Dopamine	pEC_{50} (log[M])	E_{max} (mN)	n
Chronic L-NAME	4.41 ± 0.16	6.75 ± 1.12	4
Desipramine (100 nM)	4.40 ± 0.10	8.32 ± 0.89	4
Chronic L-NAME	4.57 ± 0.17	7.67 ± 1.87	4
Clomipramine (100 nM)	4.26 ± 0.07	8.10 ± 0.70	4
Chronic L-NAME	4.78 ± 0.33	7.99 ± 1.61	4
Amitriptyline (100 nM)	4.62 ± 0.18	8.86 ± 0.90	4
Chronic L-NAME	4.69 ± 0.20	5.77 ± 1.01	4
Cyclobenzaprine (100 nM)	4.63 ± 0.20	5.16 ± 0.20	4
Chronic L-NAME	4.71 ± 0.22	6.32 ± 0.77	4
Carbamazepine (100 nM)	4.51 ± 0.14	6.37 ± 0.68	4

pEC_{50} is defined as the negative logarithm of the EC_{50} ; E_{max} is the maximal effect at high drug; n means the number of vas deferens strips.

Table 4

The potency (pEC_{50}) and maximum response (E_{max}) of the concentration-response curves to adrenaline on isolated epididymal vas deferens of rats chronically treated with L-NAME.

Adrenaline	pEC_{50} (log[M])	E_{max} (mN)	n
Chronic L-NAME	5.48 ± 0.15	6.53 ± 0.80	4
Desipramine (100 nM)	$6.63 \pm 0.26^{**}$	6.44 ± 1.55	4
Chronic L-NAME	5.49 ± 0.21	6.53 ± 0.80	4
Clomipramine (100 nM)	5.18 ± 0.20	7.46 ± 1.33	4
Chronic L-NAME	5.26 ± 0.36	6.06 ± 0.98	4
Amitriptyline (100 nM)	5.07 ± 0.40	5.46 ± 1.21	4
Chronic L-NAME	5.41 ± 0.24	7.99 ± 1.61	4
Cyclobenzaprine (100 nM)	4.69 ± 0.35	8.86 ± 0.90	4
Chronic L-NAME	5.56 ± 0.33	7.63 ± 0.62	4
Carbamazepine (100 nM)	5.54 ± 0.13	7.38 ± 0.29	4

pEC_{50} is defined as the negative logarithm of the EC_{50} ; E_{max} is the maximal effect at high drug; n means the number of vas deferens strips.

$^{**}p < 0.01$ compared with respective control values.

treated with L-NAME, desipramine (100 nM) failed to significantly affect the EFS-induced contractions at any frequency (Fig. 4D).

Clomipramine (100 nM) caused no significant shifts on the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.8961$; Table 1) and adrenaline ($p = 0.3353$; Table 2). In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, clomipramine also failed to affect the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.1692$; Table 3) and adrenaline ($p = 0.3311$; Table 4).

Clomipramine had no effects on the E_{max} values of 6-ND, noradrenaline (Fig. 4A and C), dopamine (Tables 1 and 3) or adrenaline (Tables 2 and 4).

3.5. Effect of amitriptyline on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Incubation with amitriptyline (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0151$) on the concentration-response curves to 6-ND without significantly affecting the concentration-response curves to noradrenaline ($p = 0.4190$; Fig. 5A). The rightward shift on the 6-ND concentration-response curve was concentration-dependent (4.2 ± 3.0 , 21.1 ± 4.8 and 29.1 ± 0.1 for 30, 100 and 300 nM, respectively, $n = 4$; $p = 0.0001$; Fig. S01C). EFS-induced RIEVD contractions were significantly reduced by prior incubation with amitriptyline in all frequencies tested (100 nM; Fig. 5B).

In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, amitriptyline (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0022$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 5C), but no changes on the concentration-response curves to noradrenaline were observed ($p = 0.9952$; Fig. 5C). In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, amitriptyline (100 nM) failed to significantly affect the EFS-induced contractions (Fig. 5D).

Amitriptyline (100 nM) did not significantly affect the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.9548$; Table 1) or adrenaline ($p = 0.5122$; Table 2). The chronic treatment with L-NAME also failed to change the effects of amitriptyline on the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.3462$; Table 3) and adrenaline ($p = 0.3648$; Table 4).

Amitriptyline had no effect on the E_{max} of 6-ND, noradrenaline (Fig. 5A and C), dopamine (Tables 1 and 3) or adrenaline (Tables 2 and 4).

3.6. Effect of cyclobenzaprine on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Incubation with cyclobenzaprine (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0205$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 6A), without affecting the responses to noradrenaline ($p = 0.3740$; Fig. 6A). The rightward shift on the 6-ND concentration-

response curve was concentration-dependent (2.4 ± 3.6 , 13.3 ± 3.3 and 28.1 ± 7.0 for 30, 100 and 300 nM, respectively, $n = 4$; $p = 0.0006$ for 100 and 300 nM only; Fig. S01D). The EFS-induced RIEVD contractions were significantly reduced by cyclobenzaprine in all frequencies tested (Fig. 6B).

In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, cyclobenzaprine (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0002$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 6C) but no changes on the responses to noradrenaline were observed ($p = 0.23843$; Fig. 6C). In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, cyclobenzaprine failed to significantly affect the EFS-induced contractions at any frequency (Fig. 6D).

Cyclobenzaprine (100 nM) caused no significant shifts on the concentration-response curve to dopamine ($p = 0.4849$; Table 1) and adrenaline ($p = 0.2060$; Table 2). In the chronic L-NAME group, cyclobenzaprine affected neither the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.4186$; Table 3) nor to adrenaline ($p = 0.0754$; Table 4).

Cyclobenzaprine had no effect on the E_{max} of 6-ND, noradrenaline (Fig. 6A and C), dopamine (Tables 1 and 3) or adrenaline (Tables 2 and 4).

3.7. Effect of carbamazepine on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Incubation with carbamazepine (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0071$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 7A), without affecting ($p = 0.0878$) the concentration-response curves to noradrenaline (Fig. 7A). The rightward shift on the 6-ND concentration-response curve was concentration-dependent (7.7 ± 1.6 and 8.3 ± 3.2 for 30 and 100 nM, respectively, $n = 4$; $p = 0.0212$). For 300 nM, the shift was not significant (2.2 ± 1.8) due to the major E_{max} reduction observed (8.71 ± 1.16 and 3.73 ± 1.12 mN, control and 300 nM, respectively; $n = 4$; $p = 0.0109$; Fig. S01E). Electric-field stimulation caused frequency-dependent contractions of the RIEVD (Fig. 7B), which were all significantly reduced by prior incubation with carbamazepine (100 nM; Fig. 7B).

In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, carbamazepine (100 nM) caused a significant rightward shift ($p = 0.0223$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 7C) but no changes on the responses to noradrenaline were observed ($p = 0.4956$; Fig. 7C). In RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME, carbamazepine (100 nM) failed to significantly affect the EFS-induced contractions at any frequency (Fig. 7D).

Carbamazepine (100 nM) caused no significant shifts on the concentration-response curve to dopamine ($p = 0.4948$; Table 1) and adrenaline ($p = 0.4736$; Table 2). In the chronic L-NAME group, carbamazepine affected neither the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.4510$; Table 3) nor to adrenaline ($p = 0.9784$; Table 4).

Carbamazepine (100 nM) had no effect on the E_{max} of 6-ND, noradrenaline (Fig. 7A and C), dopamine (Tables 1 and 3) or adrenaline (Tables 2 and 4).

3.8. Effect of maprotiline, paroxetine and oxcarbazepine on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Incubation with maprotiline (100 nM) caused no significant rightward shift ($p = 0.4129$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 8A) but produced a significant leftward shift on the concentration-response curves to noradrenaline ($p = 0.0378$; Fig. 8A). The EFS-induced RIEVD contractions were not affected by maprotiline in all frequencies tested (Fig. 8B).

Paroxetine (100 nM) caused no significant shift ($p = 0.8830$) on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 8C) but produced a significant leftward shift ($p = 0.0002$) on the concentration-response curves to noradrenaline (Fig. 8C). The EFS-induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation with paroxetine (Fig. 8D).

Incubation with oxcabazepine (100 nM) caused no significant shifts on the concentration-response curves to 6-ND ($p = 0.2017$; Fig. 8E) and noradrenaline ($p = 0.0680$; Fig. 8E). The EFS-induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation with oxcabazepine (Fig. 8F).

These compounds had no effect on dopamine concentration-response curves (Table 1). Maprotiline and paroxetine, but not oxcabazepine, caused a significant leftward shift on the concentration-response curves to adrenaline (Table 2).

3.9. Effect of ketanserin on RIEVD contractions induced by 6-ND, noradrenaline and 5-HT

Incubation with the 5-HT_{2A} antagonist ketanserin (10 nM) caused no significant shifts on the concentration-response curves to 6-ND ($pEC_{50} = 4.35 \pm 0.12$ and 4.35 ± 0.14 ; control and treated, respectively; $n = 4$, $p = 0.4484$) and noradrenaline ($pEC_{50} = 5.03 \pm 0.20$ and 4.99 ± 0.09 ; control and treated, respectively; $n = 4$, $p = 0.8538$), but caused a significant right shift ($p = 0.0002$) on the concentration-response curves to 5-HT ($pEC_{50} = 4.70 \pm 0.12$ and 3.12 ± 0.02 ; control and treated respectively; $n = 4$).

Ketanserin (10 nM) had no effect on the E_{max} of 6-ND (9.94 ± 1.38 and 9.54 ± 2.04 mN; control and treated respectively; $n = 4$), noradrenaline (6.70 ± 1.86 and 7.90 ± 0.75 mN; control and treated, respectively; $n = 4$) and 5-HT (4.72 ± 0.75 and 4.14 ± 0.88 mN; control and treated, respectively; $n = 4$).

The EFS-induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation with ketanserin (Table 5).

3.10. Effect of atropine on RIEVD contractions induced by carbachol, 6-ND and EFS

Incubation with the muscarinic antagonist atropine (10 nM) caused no significant shifts on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 9 A; $p = 0.4060$) but abolish the concentration-response curves to carbachol (Fig. 9B; $p = 0.0003$).

The EFS-induced RIEVD contractions were not affected by prior incubation with atropine (Fig. 9 C).

3.11. Effects of addition of L-NAME on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Incubation of RIEVD with L-NAME in vitro (100 μ M) did not significantly change the concentration-response curves to dopamine ($p = 0.9349$), adrenaline ($p = 0.2277$), noradrenaline ($p = 0.9349$) and 6-ND ($p = 0.438$) at the level of both pEC_{50} and E_{max} values (Tables 3 and 6). Similarly, incubation with L-NAME (100 μ M) caused no effect on the EFS-induced RIEVD contractions (Table 7).

4. Discussion

Our results clearly demonstrate for the first time that RIVD presents a basal release of 6-ND, as characterized by LC-MS-MS. The basal release of 6-ND was inhibited (92.3%) by incubation with L-NAME, indicating that the synthesis of 6-ND is coupled to NO synthesis, as observed in the human umbilical cord vessels. However, in RIEVD strips obtained from

Table 5
Effect of ketanserin (10 nM) on isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation (EFS) of control rats in the presence of L-NAME (100 μ M).

Frequency	Control (mN)	L-NAME (mN)	n
2 Hz	10.67 $\pm$ 1.39	12.64 $\pm$ 2.43	4
4 Hz	15.60 $\pm$ 1.88	16.89 $\pm$ 2.81	4
8 Hz	23.33 $\pm$ 2.22	25.03 $\pm$ 1.83	4
16 Hz	30.76 $\pm$ 1.89	31.75 $\pm$ 1.96	4

Table 6

The potency (pEC_{50}) and maximum response (E_{max}) of the concentration-response curves to dopamine, noradrenaline, adrenaline and 6-nitrodopamine in rat isolated epididymal vas deferens in the presence of L-NAME (100 μ M).

Agonist	pEC_{50} (log[M])	E_{max} (mN)	n
Control + Dopamine	5.22 $\pm$ 0.30	8.87 $\pm$ 1.61	5
L-NAME + Dopamine	5.54 $\pm$ 0.13	8.87 $\pm$ 1.18	5
Control + Noradrenaline	5.78 $\pm$ 0.13	9.32 $\pm$ 0.43	5
L-NAME + Noradrenaline	5.76 $\pm$ 0.18	10.68 $\pm$ 1.37	5
Control + Adrenaline	5.28 $\pm$ 0.13	10.15 $\pm$ 0.45	5
L-NAME + Adrenaline	5.01 $\pm$ 0.16	12.04 $\pm$ 1.54	5
Control + 6-Nitrodopamine	5.04 $\pm$ 0.19	10.71 $\pm$ 0.74	5
L-NAME + 6-Nitrodopamine	4.96 $\pm$ 0.08	10.18 $\pm$ 0.78	5

pEC_{50} is defined as the negative logarithm of the EC_{50} ; E_{max} is the maximal effect at high drug; n means the number of vas deferens strips.

Table 7

Effect of L-NAME (100 μ M) on electric-field stimulation (EFS)-induced contractions of rat isolated epididymal vas deferens from control rats in the presence of L-NAME (100 μ M).

Frequency	Control (mN)	L-NAME (mN)	n
2 Hz	12.72 $\pm$ 1.59	13.17 $\pm$ 1.44	4
4 Hz	21.50 $\pm$ 2.68	21.04 $\pm$ 0.78	4
8 Hz	27.62 $\pm$ 2.26	26.62 $\pm$ 1.26	4
16 Hz	35.06 $\pm$ 2.12	32.31 $\pm$ 1.34	4

animals chronically treated with L-NAME, the inhibition of basal 6-ND release was less pronounced (60.7%). A similar degree of inhibition by chronic L-NAME treatment (50%) was reported for 6-nitronoradrenaline extracted from rat brain (Tsunoda et al., 2007). Despite the in vitro L-NAME incubation produces >90% inhibition of basal release of 6-ND, it had no effect on the EFS-induced RIVD contractions; in contrast, the inhibition of basal 6-ND release by chronic L-NAME treatment was lower (60%), but that was associated with a significant decrease of the EFS-induced contractions (Ventura and Burnstock, 1997). One possible explanation for this apparent paradox is that 6-ND may be stored in vesicles as it happens with noradrenaline and would be released upon EFS.

The contractile responses for 6-ND were observed in 1–10 μ M range whereas the levels detected were under 50 nM. This apparent discrepancy could be explained by the difference between the local concentration (where the mediator is released) and the concentration needed to be reached in the organ bath to give the same concentration. This is illustrated in the rat isolated perfused mesenteric vascular bed, where exogenous NO at doses that produced smaller responses within the mesenteric bed than endogenously generated NO did not survive to the assay tissues whereas the endogenously generated NO did not (Warner et al., 1989). In addition, the amounts of 6-ND and noradrenaline released are in the same range as those of noradrenaline following extraction and quantification by HPLC coupled to electrochemical detection (Bell et al., 1984; Celuch and Sioley, 1988).

Dopamine and 6-ND presented basically the same pEC_{50} values in the RIEVD (4.73 and 4.69, respectively), which were less potent than noradrenaline (5.59) and adrenaline (5.48). Interestingly, the selective α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin inhibits the noradrenaline- and dopamine-induced RIEVD contractions, indicating that these catecholamines activate the same population of α_1 -adrenergic receptors (Leedham and Pennefather, 1982). However, it is unlikely that 6-ND is acting on α_1 -adrenergic receptors since in contrast to dopamine, noradrenaline and adrenaline, 6-ND does not cause contractions of HUCV (Brito-Júnior et al., 2021). The α_1 -adrenoceptor antagonist blocks the contractions induced by noradrenaline in the human umbilical artery (Bodelsson and Stjernquist, 1995) and by adrenaline in the human umbilical vein (Errasti et al., 1999), establishing the presence of functional α_1 -adrenoceptors in HUCV.

Could 6-ND be acting on dopaminergic receptors? Dopamine D₁ receptors have been identified in the sympathetic nerve endings of guinea-pig vas deferens (Furukawa and Morishita, 1997). Activation of dopamine D₁ receptors stimulates adenylate cyclase to increase the intracellular cAMP levels (Sibley and Monsma Jr., 1992). Interestingly, the D₁ receptor agonist fenoldopam (Zeng et al., 2004) causes relaxation of both human umbilical arteries and veins (Britto-Junior et al., 2021). The dopamine D₁ antagonist SCH-23390 did not affect the contractions of the RIEVD induced by 6-ND. It rather caused a significant leftward shift on the concentration-response curve to 6-ND, indicating the presence of functional dopamine D₁ receptors in the rat vas deferens.

The dopamine D₂-like antagonist haloperidol antagonized the dopamine-induced contraction of the rat vas deferens, although at the concentration employed (250 nM), it certainly blocks the post-synaptic α_1 adrenergic receptor (K_i 7.6 nM; Arnt and Skarsfeldt, 1998). Indeed, the use of N-0923, a selective dopamine D₂ receptor agonist, demonstrated the presence of these receptors only in the mouse but not in rat vas deferens (Martin et al., 1993). However, the finding that haloperidol (100 nM) caused a significant right shift in the concentration-response curve to dopamine, without affecting the responses to 6-ND, demonstrates that 6-ND is not acting at this dopaminergic (or adrenergic) receptor.

To date, there is no report on the presence of dopamine D₃ receptors in vas deferens. The right shift caused by the D₃ receptor antagonist PG-01037 on the concentration-response curve to dopamine suggests the presence of this receptor in the rat vas deferens. However, since it did not affect the responses to 6-ND, demonstrating that this dopaminergic receptor is not involved in the contraction induced by 6-ND in this tissue.

Guinea-pig vas deferens express functional dopamine D₄ receptors (Morishita and Katsuragi, 1999). Indeed, the D₄ receptor antagonist sonepiprazole did evoke a significant rightward shift in the concentration-response curve to dopamine, indicating the existence of functional dopamine D₄ receptors in the RIEVD. However, at the same concentration, it demonstrated did not affect the concentration-response curve to 6-ND, indicating that 6-ND is not activating this receptor. In addition, the lack of effect of all above mentioned dopamine antagonists on the EFS-induced contractions suggests that dopamine does not modulate this phenomenon. Indeed, no basal release of dopamine was detected from the rat vas deferens.

The tricyclic antidepressants can block α_1 -adrenergic receptors (Feighner, 1999; Nojimoto et al., 2010). Amitriptyline (Sánchez et al., 1999) and clomipramine (Millan et al., 2001) block α_1 -adrenergic receptor in rat cortex at 61 and 15.5 nM, respectively, whereas desipramine (Cusack et al., 1994) blocks human α_1 -adrenergic receptor at 100 nM. However, the finding that these tricyclic compounds caused rightward shifts only in the concentration-response curves to 6-ND indicates that they are not acting as α_1 receptor antagonists. Indeed, the tetracyclic compound maprotiline inhibits human brain α_1 adrenergic receptor at 90 nM (Richelson and Pfenning, 1984) but had no effect on either concentration-response curves to 6-ND or EFS-induced RIEVD contractions. These results suggest that mechanism by which the tricyclic antidepressants antagonizes 6-ND is not by interaction with the α_1 -adrenergic receptors.

The common mechanism of action of all tricyclic antidepressants are blockade of histaminergic H₁ receptors (Gillman, 2007). It is unlikely that 6-ND is acting on these receptors in the RIEVD, since histamine has a depressor effect on EFS-induced vas deferens contractions (Vohra, 1979). Another mechanism of action of tricyclic antidepressants involves inhibition of serotonin (SERT) and noradrenaline (NET) transporters, favouring the serotonin and noradrenaline re-uptake (Gillman, 2007). For instance, amitriptyline inhibits human cloned SERT and NET at 67 nM and 63 nM, respectively (Vaishnavi et al., 2004), desipramine inhibits rat brain SERT (Dutta et al., 2019) and NET (Muth et al., 1986) at 106 and 0.15 nM, respectively, and clomipramine inhibits rat cortex SERT (Cheetham et al., 1993) and human NET (Tatsumi et al., 1997) at 5

and 38 nM, respectively. The centrally acting muscle relaxant cyclobenzaprine also inhibits human SERT and NET at 108 and 36 nM, respectively (Mestres et al., 2011). Paroxetine also inhibits rat cortex SERT (Kung et al., 1995) and rat NET (Sánchez et al., 1999) at 0.5 and 81 nM, respectively, but it had no effect on the concentration-response curves to 6-ND or EFS-induced RIEVD contractions, indicating that SERT and NET blockade cannot be responsible for the effects observed with the drugs above mentioned.

Serotonin also causes contractions of the rat vas deferens, primarily by activation of post-synaptic 5-HT receptors located in the epididymal half (Hay and Wadsworth, 1982; Karasawa et al., 1985). Ketanserin blocks 5-HT_{2A} (0.88 nM; Wouterse et al., 1986), 5-HT_{1A} (0.5 nM; Janowsky et al., 2014) and 5-HT_{1B} (1.9 μ M; Markstein et al., 1986) receptors. Amitriptyline, clomipramine and desipramine also block 5-HT_{2A} receptors (Gillman, 2007). However, the finding that ketanserin had no effect on the concentration-response curve to 6-ND exclude that the antagonism observed with the tricyclic antidepressants involves serotonin receptors. Acetylcholine is released by RIEVD (Knoll et al., 1972), however atropine failed to affect the contractions induced by nerve stimulation (Burnstock and Holman, 1964) or by 6-ND, indicating the lack of involvement of cholinergic receptors.

Thus, we propose that the tricyclic antidepressants cyclobenzaprine and carbamazepine are acting as antagonists of the 6-ND receptor. This is further supported by the lack of effect of these drugs on the EFS-induced contractions of RIEVD strips obtained from animals chronically treated with L-NAME. What do we know about this novel 6-ND receptor in the vas deferens? The results demonstrate that the 6-ND receptor is blocked by tricyclic structures such as dibenzazepines (desipramine, clomipramine and carbamazepine) and dibenzocycloheptenes (amitriptyline and cyclobenzaprine), but not by tetracyclic compounds such as maprotiline or modified dibenzazepines like oxcarbazepine. The inhibition was observed at concentrations in the lower range compared to the tricyclic antidepressant C_{max} (Aldeman et al., 1997; Filser et al., 1988; Kuss and Jungkrunz, 1988) or hundred times lower when compared to the therapeutic plasma levels of carbamazepine and oxcarbazepine (Patsalos et al., 2008).

What is the physiological role of 6-ND in the vas deferens? Pharmacology identifies physiological roles of mediators through the actions of antagonists/inhibitors. As discussed above, the tricyclic antidepressants cyclobenzaprine and carbamazepine antagonize 6-ND in the vas deferens. Tricyclic antidepressants can cause delayed ejaculation (Rothmore, 2020). This adverse reaction is also observed with cyclobenzaprine (Kraus et al., 2015) and carbamazepine (Leris et al., 1997). Clomipramine is used as treatment of premature ejaculation in man (Waldinger, 2018). In a randomized, double-blind clinical trial, using on-demand fixed dose of either clomipramine (25 mg) or paroxetine (20 mg) in 30 men with lifelong premature ejaculation (Waldinger et al., 2004), clomipramine led to a clinical relevant ejaculation delay whereas paroxetine had no clinical relevant effect. During ejaculation, sperm moves through the epididymis to the vas deferens (Wu and De Cicco, 2020). The finding that 6-ND is released in substantially greater amounts than noradrenaline (20-fold approximately) generates the exciting possibility of its involvement in the ejaculatory process.

5. Conclusion

6-nitrodopamine is an endogenous modulator of the rat vas deferens contractility. The antagonism of the 6-ND receptor by tricyclic compounds reveals a novel mechanism of action of tricyclic antidepressants.

CRedit authorship contribution statement

José Brito-Junior: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Writing – review & editing, Writing – original draft. Luiz Ximenes: Methodology. André Ribeiro: Methodology. Adriano Fregonesi: Methodology. Rafael Campos: Methodology. Luiz Ricardo de

Almeida Kiguti: Methodology. Fabiola Z. Mónica: Methodology, Supervision. Edson Antunes: Funding acquisition, Methodology, Supervision, Visualization, Writing – review & editing, Writing – original draft. Gilberto De Nucci: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Visualization, Writing – review & editing, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing or financial interests.

Acknowledgment

JB and LX thank CAPES for PhD fellowship (001). EA & FM thank FAPESP (2017/15175-1). GDN thanks FAPESP (2019/16805-4), FAPESP (2469/21) and CNPq (303839/2019-8).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174544>.

References

- Alderman, J., Preskorn, S.H., Greenblatt, D.J., Harrison, W., Penenberg, D., Allison, J., Chung, M., 1997. Desipramine pharmacokinetics when coadministered with paroxetine or sertraline in extensive metabolizers. *J. Clin. Psychopharmacol.* (4), 284–291.
- Anton, P.G., Duncan, M.E., McGrath, J.C., 1997. An analysis of the anatomical basis for the mechanical response to motor nerve stimulation of the rat vas deferens. *J. Physiol.* 273 (1), 23–43. <https://doi.org/10.1111/jphysiol.1977.sp012079>.
- Arnt, J., Skarsfeldt, T., 1998. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18 (2), 63–101. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00112-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00112-7).
- Bell, C., Gillespie, J.S., Macrae, I.M., 1984. Release of noradrenaline and dopamine by nerve stimulation in the Guinea-pig and rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol. Mar.* 81 (3), 563–569. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1984.tb01010.x>.
- Bodelsson, G., Stjernquist, M., 1995. Characterization of contractile adrenoceptors in the human umbilical artery. *Eur. J. Pharmacol.* 25 (282), 95–101. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00277-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00277-1).
- Britto-Júnior, J., Jacintho, P.F., Figueiredo Murari, G.M., Campos, R., Moreno, R.A., Antunes, E., Mónica, F.Z., De Nucci, G., 2020a. Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels. *Life Sci.* 15 (243), 117257. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117257>.
- Britto-Júnior, J., Pinheiro, D.H.A., Justo, A.F.O., Figueiredo Murari, G.M., Campos, R., Mariano, P.V., de Souza, V.B., Schenka, A.A., Mónica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2020b. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacol. Res. Perspect.* 8 (4), e00612. <https://doi.org/10.1002/prp2.612>.
- Britto-Júnior, J., Antunes, N.J., Campos, R., Sucupira, M., Mendes, G.D., Fernandes, F., Moraes, M.O., Moraes, M.E.A., De Nucci, G., 2020c. Determination of dopamine, noradrenaline, and adrenaline in Krebs-Henseleit solution by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and measurement of their basal release from Chelonoidis carbonaria aortae in vitro. *Biomed. Chromatogr.* 35 (2), e4978. <https://doi.org/10.1002/bmc.4978>. Epub 2020 Sep 13. PMID: 32866321.
- Britto-Júnior, J., Coelho-Silva, W.C., Murari, G.F., Serpellone Nash, C.E., Mónica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2021. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci.* 26 (276), 119425. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119425>.
- Burnstock, G., Holman, M.E., 1964. An electrophysiological investigation of the actions of some autonomic blocking drugs on transmission in the guinea-pig vas deferens. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 23 (3), 600–612. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1964.tb01613.x>.
- Campos, R., Pinheiro, D.H.A., Britto-Júnior, J., de Castro, H.A., Mendes, G.D., Moraes, M.O., Moraes, M.E.A., Lopes-Martins, R.A.B., Antunes, N.J., De Nucci, G., 2021. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from Chelonoidis carbonaria aortae in vitro. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 22 (1173), 122668. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122668>.
- Celuch, S.M., Stoley, B.D., 1988. Regional distribution of dopamine, 5-hydroxytryptamine, and noradrenaline in the rat vas deferens. *Neurochem. Res.* 13 (10), 967–972. <https://doi.org/10.1007/BF00970770>.
- Cheetham, S.C., Viggers, J.A., Slater, N.A., Heal, D.J., Buckett, W.R., 1993. [3H] paroxetine binding in rat frontal cortex strongly correlates with [3H]5-HT uptake: effect of administration of various antidepressant treatments. *Neuropharmacology* 32 (8), 737–743. [https://doi.org/10.1016/0020-3908\(93\)90181-2](https://doi.org/10.1016/0020-3908(93)90181-2).
- Chiari, A., Li, X.H., Xu, Z., Pan, H.L., Eisenach, J.C., 2000. Formation of 6-nitro-norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. *Neuroscience* 101 (1), 189–196. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00328-6).
- Cusack, B., Nelson, A., Richelson, E., 1994. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. *Psychopharmacology (Berl)* 114 (4), 559–565. <https://doi.org/10.1007/BF02244985>.
- Dutta, A.K., Santra, S., Harutyunyan, A., Das, B., Lisieski, M.J., Xu, L., Antonio, T., Reith, M.E.A., Perrine, S.A., 2019 Nov 5. D-578, an orally active triple monoamine reuptake inhibitor, displays antidepressant and anti-PTSD like effects in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 862, 172632. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172632>. Epub 2019 Aug 29. PMID: 31473161.
- Errasti, A.E., Velo, M.P., Torres, R.M., Sardi, S.P., Rothlin, R.P., 1999. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in human umbilical vein. *Br. J. Pharmacol.* 126 (2), 437–442. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702320>.
- Feighner, J.P., 1999. Mechanism of action of antidepressant medications. *J. Clin. Psychiatr.* 60 (Suppl. 4), 4–11 discussion 12–3.
- Filzer, J.G., Kaumeier, S., Brand, T., Schanz, H., Terlinden, R., Müller, W.E., 1988. Pharmacokinetics of amitriptyline and amitriptylinolide after intravenous or oral administration in humans. *Pharmacopsychiatry* 21 (6), 381–383.
- French, A.M., Scott, N.C., 1983. Feedback inhibition of responses of rat vas deferens to twin pulse stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 21. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(83\)90187-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(83)90187-5). 86(3–4):379–83.
- Furukawa, T., Morishita, H., 1997. Existence of dopamine D1 receptor on the sympathetic nerve endings in the Guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 11, 229–234. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)83049-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)83049-x), 328(2–3).
- Gillman, P.K., 2007. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br. J. Pharmacol.* 151 (6), 737–748. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707253>.
- Grundt, P., Carlson, E.E., Cao, J., Bennett, C.J., McElveen, E., Taylor, M., Luedtke, R.R., Newman, A.H., 2005. Novel heterocyclic trans olefin analogues of N-[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]butyl]arylcaboxamides as selective probes with high affinity for the dopamine D3 receptor. *J. Med. Chem.* 10, 839–848. <https://doi.org/10.1021/jm049465g>, 48(3).
- Hay, D.W., Wadsworth, R.M., 1982. The contractile effects of 5-hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 77 (4), 605–613. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1982.tb09338.x>.
- Hsu, J.H., Shen, W.W., 1995. Male sexual side effects associated with antidepressants: a descriptive clinical study of 32 patients. *Int. J. Psychiatr. Med.* 25 (2), 191–201. <https://doi.org/10.2190/1DHU-Y7L7-9GKG-V7WV>.
- Hyttel, J., 1983. SCH 23390 - the first selective dopamine D-1 antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 15, 153–154. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(83\)90381-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(83)90381-3), 91(1).
- Janowsky, A., Eshleman, A.J., Johnson, R.A., Wolfgram, K.M., Hinrichs, D.J., Yang, J., Zabriskie, T.M., Smilstein, M.J., Riscoe, M.K., 2014 Jul. Mefloquine and psychotomimetics share neurotransmitter receptor and transporter interactions in vitro. *Psychopharmacology (Berl)* 231 (14), 2771–2783. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3446-0>. Epub 2014 Feb 2. PMID: 24488404; PMCID: PMC4097020.
- Karasaawa, A., Kubo, K., Shuto, K., Nakamizo, N., 1985. Interaction of 5-hydroxytryptamine and ketanserin in rat vas deferens subjected to low frequency field stimulation. *Jpn. J. Pharmacol.* 37 (3), 285–291. <https://doi.org/10.1254/jip.37.285>.
- Knoll, J., Somogyi, G.T., Illés, P., Vizi, E.S., 1972. Acetylcholine release from isolated vas deferens of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 274 (2), 198–202. <https://doi.org/10.1007/BF00501855>.
- Kraus, M.B., Wie, C.S., Gorlin, A.W., Wisenbaugh, E.S., Rosenfeld, D.M., 2015. Painful ejaculation with cyclobenzaprine: a case report and literature review. *Sex. Med.* 19 (4), 343–345. <https://doi.org/10.1002/sm2.93>, 3.
- Kung, M.P., Essman, W.D., Frederick, D., Meegalla, S., Goodman, M., Mu, M., Lucki, I., Kung, H.F., 1995 Aug. IPT: a novel iodinated ligand for the CNS dopamine transporter. *Synapse* 20 (4), 316–324. <https://doi.org/10.1002/syn.890200405>. PMID: 7482291.
- Kuss, H.J., Jungkuntz, G., 1986. Nonlinear pharmacokinetics of chlorimipramine after infusion and oral administration in patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 10 (6), 739–748.
- Leedham, J.A., Pennefather, J.N., 1982 Oct. Dopamine acts at the same receptors as noradrenaline in the rat isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 77 (2), 293–299. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1982.tb09298.x>. PMID: 6291687; PMCID: PMC2044591.
- Leris, A.C., Stephens, J., Hines, J.E., McNicholas, T.A., 1997 Mar. Carbamazepine-related ejaculatory failure. *Br. J. Urol.* 79 (3), 485. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1997.11336.x>. PMID: 9117241.
- Markstein, R., Hoyer, D., Engel, G., 1986 Aug. 5-HT1A-receptors mediate stimulation of adenylate cyclase in rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 333 (4), 335–341. <https://doi.org/10.1007/BF00500006>. PMID: 2945992.
- Martin, P.L., Kelly, M., Cusack, N.J., 1993. (-)-2-(N-propyl-N-2-thienylethylamino)-5-hydroxytryptalin (N-0923), a selective D2 dopamine receptor agonist demonstrates the presence of D2 dopamine receptors in the mouse vas deferens but not in the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 267 (3), 1342–1348.
- Merchant, K.M., Gill, G.S., Harris, D.W., Huff, R.M., Eaton, M.J., Lookingland, K., Lutzke, B.S., McCall, R.B., Piercey, M.P., Schreur, P.J., Sethi, V.H., Smith, M.W., Svensson, K.A., Tang, A.H., VonVoigtlander, P.F., Tenbrink, R.E., 1996. Pharmacological characterization of U-101387, a dopamine D4 receptor selective antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 279 (3), 1392–1403.
- Mestres, J., Seifert, S.A., Oprea, T.I., 2011 Nov. Linking pharmacology to clinical reports: cyclobenzaprine and its possible association with serotonin syndrome. *Clin. Pharmacol. Ther.* 90 (5), 662–665. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.177>. Epub 2011 Oct 5. PMID: 21975349; PMCID: PMC3809033.

- Millan, M.J., Dekeyne, A., Papp, M., La Rochelle, C.D., MacSweeney, C., Peglioni, J.L., Brocco, M., 2001 Aug. S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: II. Behavioral profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 298 (2), 581–591. PMID: 11454919.
- Miranda, H.P., Wolstenholme, W.W., Moreu, G.M., Santiago, P.A., 1988. Effects of haloperidol on neurotransmitter activity in the rat vas deferens. *Gen. Pharmacol.* 19 (1), 123–127. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(88\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(88)90017-1).
- Morishita, H., Katsuragi, T., 1999. Existence and pharmacological properties of dopamine D4 receptors in Guinea pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 18 (2), 255–261. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00312-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00312-X).
- Motulsky, H., 2014. Normality tests. In: *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 203–208.
- Muth, E.A., Haskins, J.T., Moyer, J.A., Husbands, G.E., Nielsen, S.T., Sigg, E.B., 1986 Dec 15. Antidepressant biochemical profile of the novel bicyclic compound Wy-45,030, an ethyl cyclohexanol derivative. *Biochem. Pharmacol.* 35 (24), 4493–4497. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90769-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90769-0). PMID: 3790168.
- Nojimoto, P.D., Mueller, A., Hebel-Barbosa, F., Akinaga, J., Lima, V., Kiguti, L.R., Pupo, A.S., 2010 Jul-Aug. The tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline and imipramine are weak antagonists of human and rat $\alpha 1B$ -adrenoceptors. *Neuropharmacology* 59 (1–2), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.03.015>. Epub 2010 Apr 2. PMID: 20363235.
- Patsalos, P.N., Berry, D.J., Bourgeois, B.F., Cloyd, J.C., Glauser, T.A., Johannessen, S.I., Leppik, L.E., Tomson, T., Perucca, E., 2008. Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommittee on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 49 (7), 1239–1276.
- Percie du Sert, N., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Hurst, V., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E. S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H., 2020. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 14, e3000411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>, 18(7).
- Ribeiro, M.O., Antunes, E., de Nucci, G., Lovisolo, S.M., Zatz, R., 1992 Sep. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20 (3), 298–303. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.20.3.298>. PMID: 1516948.
- Richelson, E., Pfenning, M., 1984. Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. *Eur. J. Pharmacol.* 17 (104) [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90403-5) (3–4):277–86.
- Rothmore, J., 2020. Antidepressant-induced sexual dysfunction. *Med. J. Aust.* 212 (7), 329–334. <https://doi.org/10.5694/mja2.50522>.
- Sánchez, C., Hyttel, J., 1999. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19 (4), 467–489. <https://doi.org/10.1023/a:100696824213>. PMID: 10379421.
- Shintani, P., Kinoshita, T., Kanba, S., Ishikawa, T., Suzuki, E., Sakakawa, N., Kato, R., Asai, M., Nakaki, T., 1996. Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 271 (271) <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13561> (23): 13561–5.
- Sibley, D.R., Monsma Jr., F.J., 1992. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (2), 61–69. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90025-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90025-2).
- Tatsumi, M., Groshan, K., Blakely, R.D., Richelson, E., 1997. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* 11 (340) [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01393-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01393-9) (2–3):249–58.
- Tsunoda, M., Uchino, E., Imai, K., Hayakawa, K., Punatsu, T., 2007. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. *J. Chromatogr. A* 1164 (1–2), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.005>.
- Vaishnavi, S.N., Nemeroff, C.B., Plott, S.J., Rao, S.G., Kranzler, J., Owens, M.J., 2004. Milnacipran: a comparative analysis of human monoamine uptake and transporter binding affinity. *Biol. Psychiatry* 1 (3), 320–322. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.07.006>, 55.
- Ventura, S., Burnstock, G., 1997. Evidence against nitergic neuromodulation in the rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 3 (1), 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01172-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01172-2), 334.
- Vohra, M.M., 1979. A postsynaptic inhibitory histamine H2-receptor in the mouse isolated vas deferens. *Agents Actions* 9 (4), 319–326. <https://doi.org/10.1007/BF01970655>.
- Waldinger, M.D., 2018. Drug treatment options for premature ejaculation. *Expert Opin. Pharmacother.* 19 (10), 1077–1085. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1494725>.
- Waldinger, M.D., Zwinderman, A.H., Olivier, B., 2004. On-demand treatment of premature ejaculation with clomipramine and paroxetine: a randomized, double-blind fixed-dose study with stopwatch assessment. *Eur. Urol.* 46 (4), 510–515. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.05.005> discussion 516.
- Warner, T.D., de Nucci, G., Vane, J.R., 1989. Comparison of the survival of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 97 (3), 777–782. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb12016.x>.
- Wouters, W., van Hertrooy, J.J., Krekel, M.D., Laduron, P.M., 1986. Reconstitution of solubilized serotonin-S2 receptors into phospholipid vesicles. *J. Recept. Res.* 6 (3–4), 271–282. <https://doi.org/10.3109/10799898609074814>.
- Wu, E.H., De Cicco, F.L., 2021. Anatomy, abdomen and pelvis, male genitourinary tract. 2020 Sep 15. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Zeng, C., Wang, D., Yang, Z., Wang, Z., Asico, L.D., Wilcox, C.S., Eisner, G.M., Welch, W. J., Felder, R.A., Jose, P.A., 2004. Dopamine D1 receptor augmentation of D3 receptor action in rat aortic or mesenteric vascular smooth muscles. *Hypertension* 43 (3), 673–679. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000118958.27649.6f>.

3.2 Artigo 2 - Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens

José Britto-Júnior, André Ribeiro, Luiz Ximenes, Antonio Tiago Lima, Felipe Fernandes Jacintho, Adriano Fregonesi, Fabíola Z. Mónica, Edson Antunes, Gilberto De Nucci

Revista: European Pharmacologic

Situação: Aceito a publicação em 20 de dezembro de 2021. Publicado on-line em 22 de dezembro de 2021



Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens

José Britto-Júnior^{a,*}, André Ribeiro^a, Luiz Ximenes^a, Antonio Tiago Lima^a, Felipe Fernandes Jacintho^a, Adriano Fregonesi^a, Fabíola Z. Mônica^a, Edson Antunes^a, Gilberto De Nucci^{a,b,c,d}

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

^b Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^c Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil

^d Brazil University, Fernandópolis, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Premature ejaculation
Nitrocatecholamines
EFS
L-NAME
Idazoxan

ABSTRACT

6-nitrodopamine (6-ND) is released from rat isolated vas deferens and modulates electrical-field stimulation (EFS) contractions of the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) via a specific receptor which is blocked by tricyclic antidepressants. Here, the effects of selective α_1 -adrenergic receptor antagonists on RIEVD contractions induced by 6-ND, dopamine, noradrenaline, adrenaline and EFS were investigated. Doxazosin and tamsulosin (3–10 nM) caused significant rightward shifts of the concentration-response curve to 6-ND, but had no effect on dopamine-, noradrenaline- and adrenaline-induced contractions. Alfuzosin (10 nM) produced rightward shifts on concentration-response curves to all catecholamines. Silodosin (10 nM) and terazosin (100 nM) displaced to the right the noradrenaline, dopamine and adrenaline curves, but higher concentrations of both antagonists (100 and 300 nM, respectively) were required to displace the 6-ND curves. The EFS-induced contractions were significantly inhibited only at the concentrations that the α_1 -adrenergic receptor antagonists caused rightward shifts on the 6-ND concentration-response curves. The inhibition of EFS-induced contractions by doxazosin (10 nM), tamsulosin (10 nM), alfuzosin (10 nM), silodosin (100 nM) and terazosin (300 nM), were not observed in RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME. This work demonstrates that α_1 -adrenoceptor antagonists act as 6-ND receptor antagonists in RIEVD, opening the possibility that many actions previously attributed to noradrenaline could be due to 6-ND antagonism. In addition, blockade of the 6-ND receptors by both tricyclic antidepressants and α_1 -adrenergic receptor antagonists may represent the common mechanism of action responsible for their therapeutic use in the treatment of premature ejaculation.

1. Introduction

Ejaculation is used as a synonym for the external ejection of semen and comprises two phases, namely, emission, which is the ejection into the prostatic urethra of spermatozoa mixed with fluids secreted by the accessory sexual glands through epididymis, ductus deferens, seminal vesicles, and prostate smooth muscles; and expulsion, that is defined as the release of the semen from the urethra by involuntary contractions of the striated perineal muscles (Puppo and Puppo, 2016). Rat vas deferens exhibits basal release of both 6-nitrodopamine (6-ND) and noradrenaline, as identified by tandem mass spectrometry (Britto-Júnior et al.,

2021a; Ximenes et al., 2021). 6-Nitrodopamine causes rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) contractions, which is blocked by the tricyclic antidepressants desipramine, clomipramine and amitriptyline, the skeletal muscle relaxant cyclobenzaprine and the anti-epileptic drug carbamazepine (Britto-Júnior et al., 2021a). Many of the antidepressant drugs are associated with male sexual adverse reactions such as anorgasmia or delayed ejaculation that can lead to non-compliance treatment (Monteiro et al., 1987; Segraves, 1989; Segraves, 2007; Segraves and Balon, 2014). Accordingly, tricyclic antidepressants are often used in the treatment of premature ejaculation (Giuliano and Hellstrom, 2008; Giuliano and Clément, 2012). Since the mechanism(s) by which

* Corresponding author. University of Campinas (Unicamp), Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária, 13063-887, Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: josebrittojr@gmail.com (J. Britto-Júnior).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174716>

Received 25 October 2021; Received in revised form 25 November 2021; Accepted 20 December 2021

Available online 22 December 2021

0014-2999/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

the tricyclic antidepressants delay the ejaculation is(are) not clear, the antagonism of 6-ND action on the vas deferens could be an important peripheral mechanism of action of these drugs (Britto-Júnior et al., 2021a).

Alpha₁-adrenoceptor antagonists are now commonly used in the treatment of the symptoms of lower urinary tract obstruction (Anderson et al., 1997). Prazosin (U'Prichard et al., 1978; Docherty, 2019), terazosin (Frishman et al., 1988; O'Leary, 2001), alfuzosin (Ramsay et al., 1988) and doxazosin (Elliott et al., 1982; Wilt and MacDonald, 2006) are classified as non-subtype selective α_1 -adrenergic antagonists (Martin, 2010) whereas tamsulosin (Lepor et al., 1988; Dunn et al., 2002) and silodosin (Yamagishi et al., 1966; Keating, 2015) are considered highly selective α_{1A} -adrenergic antagonists (Roehrborn, 2009). However, the use of this class of drugs in the treatment of lower urinary tract symptoms (LUTS) has been linked to ejaculatory abnormalities such as retrograde ejaculation, reduced ejaculate volume and absence of ejaculate in 4–11% of patients (Höfner et al., 1999; Djavan et al., 2004). These adverse reactions are apparently not dependent on the receptor subtype selectivity since the incidence of abnormal ejaculation was similar in patients receiving either tamsulosin or alfuzosin (Hellstrom and Sikka, 2006). Interestingly, terazosin has been successfully used for the treatment of premature ejaculation (Başar et al., 2005).

Here it was investigated the effect of several α_1 -adrenoceptor antagonists on the contractile activity of 6-ND and other catecholamines (dopamine, noradrenaline and adrenaline) on the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). In addition, it was also assessed the action of these α_1 -adrenoceptor antagonists on the electric-field stimulation (EFS)-induced RIEVD contractions. Because the release of 6-ND is coupled to nitric oxide (NO) and that is inhibited by the NO synthesis inhibitor N^G-L-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; Britto et al., 2021b), we also investigated the effects α_1 -adrenoceptor antagonists on the contractions of RIEVD obtained from control and animals chronically treated with the nitric oxide inhibitor N^G-L-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

2. Methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (280–320 g) were provided by the animal care of University of Campinas (UNICAMP; Campinas, São Paulo, Brazil) and Animais de Laboratório Criação e Com. LTDA (ANILAB; Paulínia, São Paulo, Brazil). All experimental protocols were authorized by the Ethics Committee in Animal Use of UNICAMP (CEUA/UNICAMP, protocols numbers 5746-1/2020 and 5831-1/2021) and followed the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (Percie du Sert et al., 2020). Animals were housed in cages (three per cage) located in ventilated cage shelters with constant humidity of 55% ± 5% and temperature of 24 ± 1 °C under a 12-h light-dark cycle. Animals received filtered water and standard food *ad libitum*.

2.2. Reagents

Dopamine, adrenaline, prazosin, idazoxan and N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) were obtained from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, Missouri, USA). Tamsulosin was obtained from Swati Spentose Pvt Ltd (Vapi, Gujarat, India). Doxazosin was obtained from Nifty Labs Pvt Ltd (Hyderabad, Telangana, India). Alfuzosin, silodosin, noradrenaline and terazosin were purchased from Cayman Chemical Co (Michigan, USA). 6-nitrodopamine was bought from Toronto Research Chemicals Inc (Toronto, Ontario, Canada). Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), calcium chloride (CaCl₂), magnesium sulfate (MgSO₄), sodium bicarbonate (NaHCO₃), potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) and glucose were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

2.3. L-NAME treatment

Rats were chronically treated with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (20 mg/rat/day) in the drinking water for 4 weeks minimum (Ribeiro et al., 1992). Control animals received tap water alone.

2.4. Rat isolated vas deferens isolation and preparation

Euthanasia was performed by isoflurane overdose, in which animals were exposed to a concentration greater than 5% until 1 min after the breathing stops. Exsanguination was performed to confirm the euthanasia. The vas deferens was removed and immediately placed in Krebs-Henseleit's solution (KHS) of the following composition: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄ and 5.6 mM glucose. Epididymal portions of vas deferens were surgically dissected (length, 1.5 cm each) for functional studies. The RIEVD strips were suspended vertically between metal hooks in 10-mL organ baths containing KHS (pH 7.4), continuously gassed with a mixture of 95%O₂: 5%CO₂ at 37 °C. Tissues were allowed to equilibrate under a resting tension of 10 mN, and the isometric tension was registered using a PowerLab system (ADInstruments, Sydney, Australia). Following a 45-min stabilization period, the RIEVD strips were initially contracted with a single concentration of noradrenaline (NA, 10 μ M) to verify the tissue viability.

2.5. In vitro functional assays in RIEVD preparations

Cumulative concentration-response curves to 6-ND were performed in RIEVD strips in the absence and presence of doxazosin (1, 3 and 10 nM, 30 min), tamsulosin (0.1, 1 and 10 nM, 30 min), alfuzosin (1, 3 and 10 nM, 30 min), silodosin (10, 30 and 100 nM, 30 min), terazosin 0.1, 0.3 and 1 μ M, 30 min), prazosin (1, 3 and 10 nM, 30 min) or idazoxan (1 μ M, 30 min). In separate RIEVD preparations, cumulative concentration-response curves to dopamine, noradrenaline and adrenaline were performed in the absence and presence of doxazosin (10 nM, 30 min), tamsulosin (10 nM, 30 min), alfuzosin (10 nM, 30 min), silodosin (10 nM, 30 min), terazosin (100 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) or idazoxan (1 μ M, 30 min).

2.6. Electric-field stimulation (EFS) in isolated RIEVD preparations

The contractions of RIEVD induced by EFS were evaluated in control and L-NAME-treated rats. Briefly, RIEVD strips were submitted to EFS at 60 V for 20 s, at 2–16 Hz in square-wave pulses, 0.3 ms pulse width, and 0.1 ms delay, using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical, Industrial Park, RI, USA). In control animals, EFS-induced RIEVD contractions were evaluated in the absence and in the presence of doxazosin (1, 3 and 10 nM, 30 min), tamsulosin (0.1, 1 and 10 nM, 30 min), alfuzosin (1 and 10 nM, 30 min), silodosin (10 and 100 nM, 30 min), terazosin (100 and 300 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) or idazoxan (0.01, 0.1 and 1 μ M, 30 min). In L-NAME-treated rats, EFS-induced RIEVD contractions were evaluated in the absence and in the presence doxazosin (10 nM, 30 min), tamsulosin (10 nM, 30 min), alfuzosin (10 nM, 30 min), silodosin (100 nM, 30 min), terazosin (300 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) or idazoxan (1 μ M, 30 min). In separate RIEVD strips obtained from control and L-NAME-treated rats, the effects of prazosin (1 and 10 nM, 30 min) in preparations previously incubated with idazoxan (1 μ M, 30 min) were investigated. The contractile responses were expressed as mN.

2.7. Data analysis

Nonlinear regression analysis to determine the pEC₅₀ was carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, version 6.0, San Diego, California, USA) with the constraint that F = 0. All concentration-response data were evaluated for a fit to a logistics function in

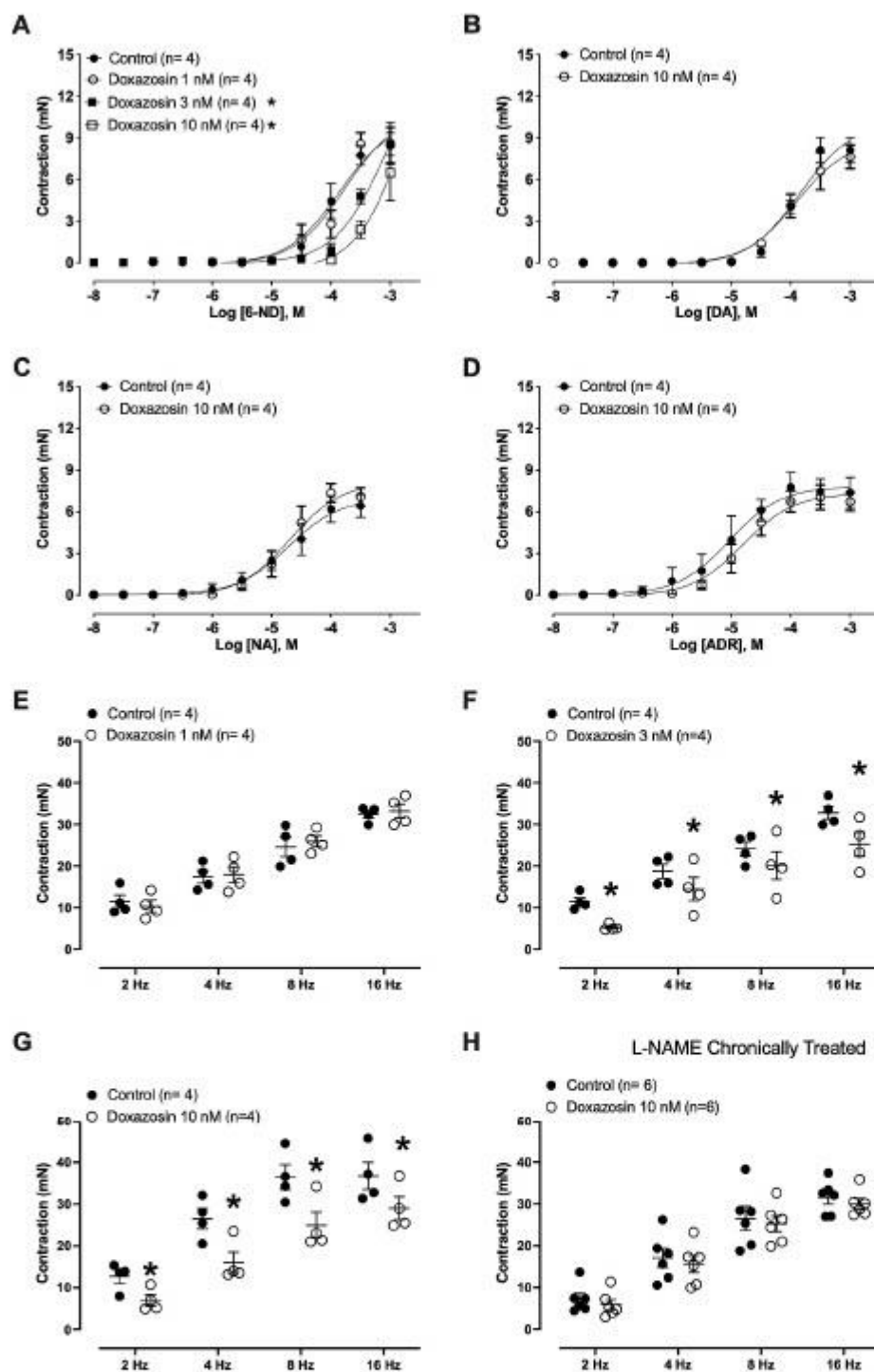


Fig. 1. Effect of doxazosin in the rat isolated epididymal vas deferens (R1EVD). Doxazosin (3 and 10 nM) caused significant concentration-dependent rightward shifts of the concentration-response curves to 6-ND (Panel A). Doxazosin (10 nM) had no effect on the contractions induced by dopamine (Panel B), noradrenaline (Panel C) and adrenaline (Panel D). Doxazosin (1 nM; Panel E) caused no reduction in the contractions induced by EFS but at higher concentrations (3 nM; Panel F) and (10 nM; Panel G) caused significant inhibition of EFS-induced contractions of the R1EVD obtained from control animals. Doxazosin (10 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of the R1EVD obtained from animals chronically treated with L-NAME (Panel H). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

the form: $E = E_{\max} / (1 + (10c/10x)^n) + F$, where E represents the increase in response contractile induced by the agonist, $E_{\max}$ is the effect agonist maximum, c is the logarithm of concentration of the agonist that produces 50% of $E_{\max}$, x is the logarithm of the concentration of the drug; the exponential term, n , is a curve fitting parameter that defines the slope of the concentration-response line, and F is the response observed in the absence of added drug. The values of pEC_{50} data represent the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of n experiments. Values of $E_{\max}$ were expressed in mN. One strip was used as the control response and the other strip was incubated with an antagonist/

inhibitor. Student's two-tail unpaired t -test was employed and the differences between groups. In addition, standard ANOVA, followed by the Newman-Keuls post-test, were used when more than two groups were involved. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. The distribution of the log values (pEC_{50}) was normal for each agonist, confirmed by the Shapiro-Wilk test (Motulsky, 2014). For 6-ND, the pA_2 values of the antagonists were calculated from the intercept on the concentration axis and by application of the equation; $pA_2 = \log (\text{antagonist concentration}) - \log (CR-1) - \log (\text{antagonist concentration})$ (Arunlakshana and Schild, 1959).

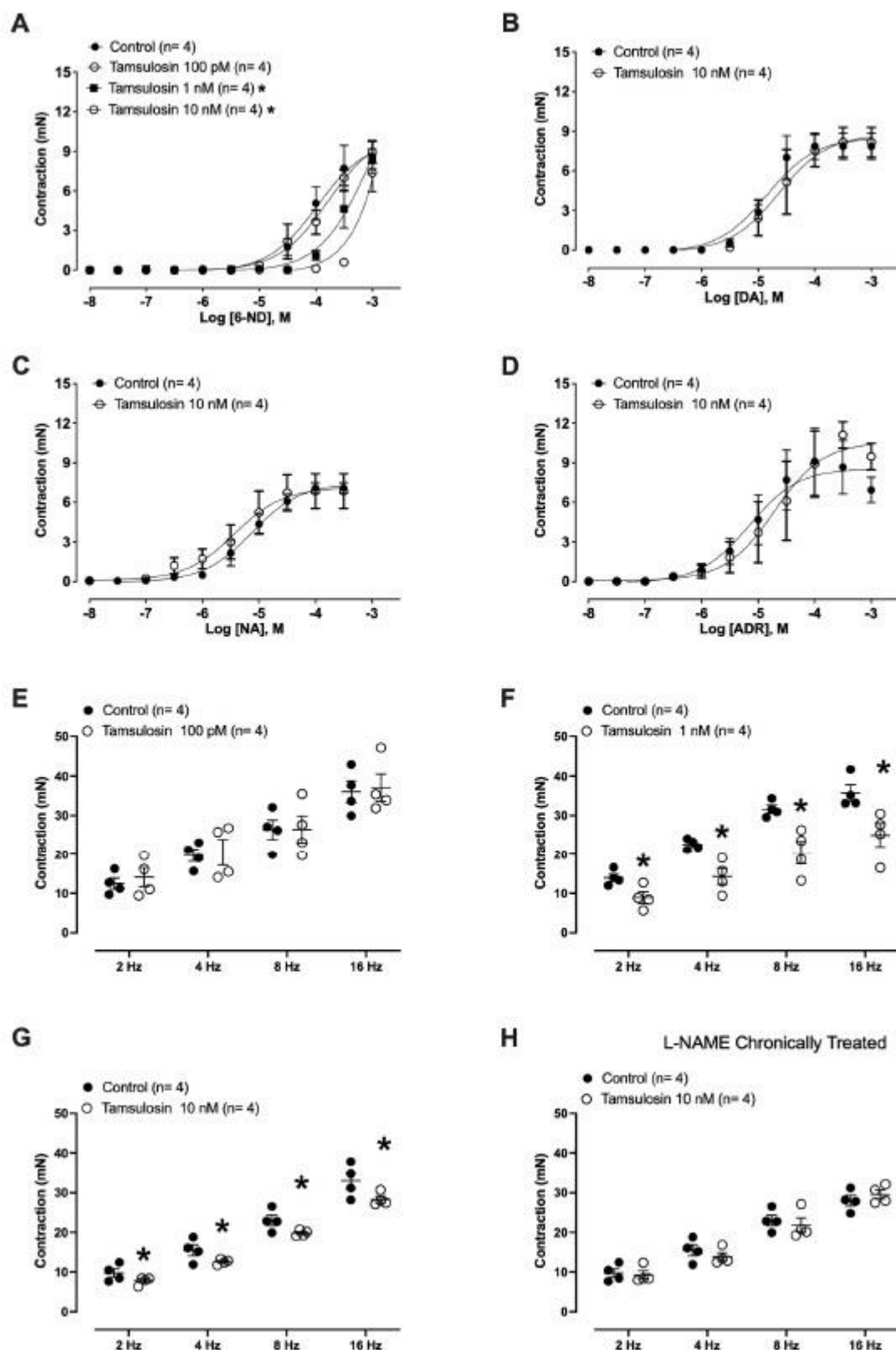


Fig. 2. Effect of tamsulosin in the rat isolated epididymal vas deferens (RJEVD). Tamsulosin (1 and 10 nM) caused significant concentration-dependent rightward shifts of the concentration-response curves to 6-ND (Panel A). Tamsulosin (10 nM) had no effect on the contractions induced by dopamine (Panel B), noradrenaline (Panel C) and adrenaline (Panel D). Tamsulosin (100 pM; Panel E) caused no reduction in the contractions induced by EFS but at higher concentrations (1 nM; Panel F) and (10 nM; Panel G) caused significant inhibition of EFS-induced contractions of the RJEVD obtained from control animals. Tamsulosin (10 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of the RJEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME (Panel H). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

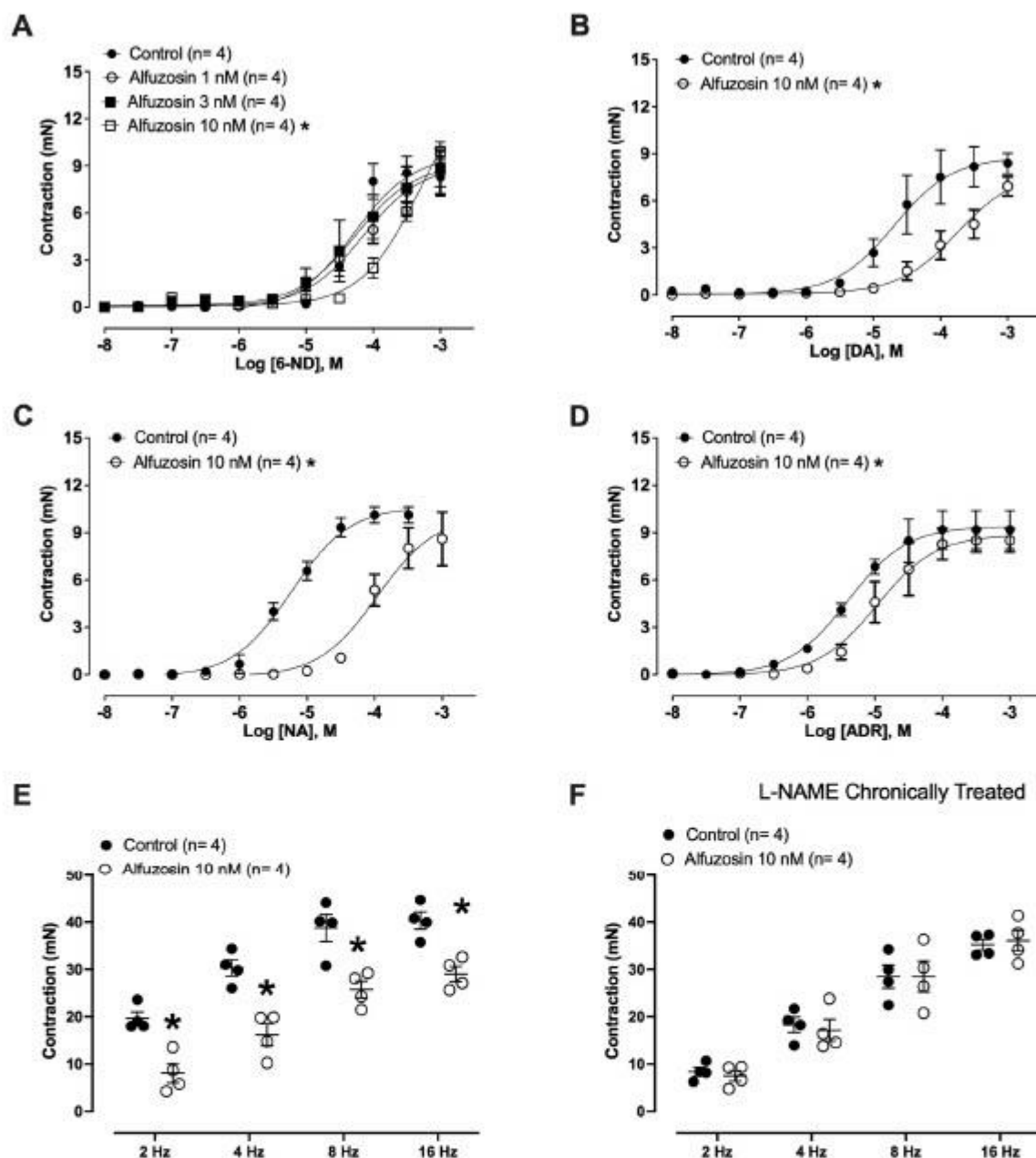


Fig. 3. Effect of alfuzosin in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). Alfuzosin (10 nM) caused rightward shifts of the concentration-response curves to 6-ND (Panel A), dopamine (Panel B), noradrenaline (Panel C) and adrenaline (Panel D). Alfuzosin (10 nM) caused reduction in the contractions induced by EFS of the RIEVD obtained from control animals (Panel E) but not in the contractions induced by EFS of the RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME (Panel F). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

3. Results

3.1. Effect of doxazosin on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Doxazosin (3 and 10 nM) produced concentration-dependent rightward shifts on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 1A; $p = 0.0119$ and $p = 0.0375$, respectively) with a pA_2 value of 9.15 ± 0.13 ($n = 4$). Doxazosin (10 nM) had no effect on the RIEVD contractions induced by dopamine (Fig. 1B; $p = 0.3179$), noradrenaline (Fig. 1C; $p = 0.4708$) and adrenaline (Fig. 1D; $p = 0.2892$).

Doxazosin (1 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD (Fig. 1E), but at higher concentrations (3 and 10 nM), doxazosin

significantly reduced the EFS-induced contractions of the RIEVD in all frequencies tested (Fig. 1F and G, respectively). In RIEVD obtained from L-NAME-treated rats, doxazosin (10 nM) had no effect on the EFS-induced contractions (Fig. 1H).

3.2. Effect of tamsulosin on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Tamsulosin (1 and 10 nM) produced concentration-dependent rightward shifts on the concentration-response curve to 6-ND (Fig. 2A; $P = 0.0378$ and $p = 0.0001$, respectively) with a pA_2 value of 9.66 ± 0.09 ($n = 4$). Tamsulosin (10 nM) had no effect on the RIEVD contractions induced by dopamine (Fig. 2B; $p = 0.2179$), noradrenaline

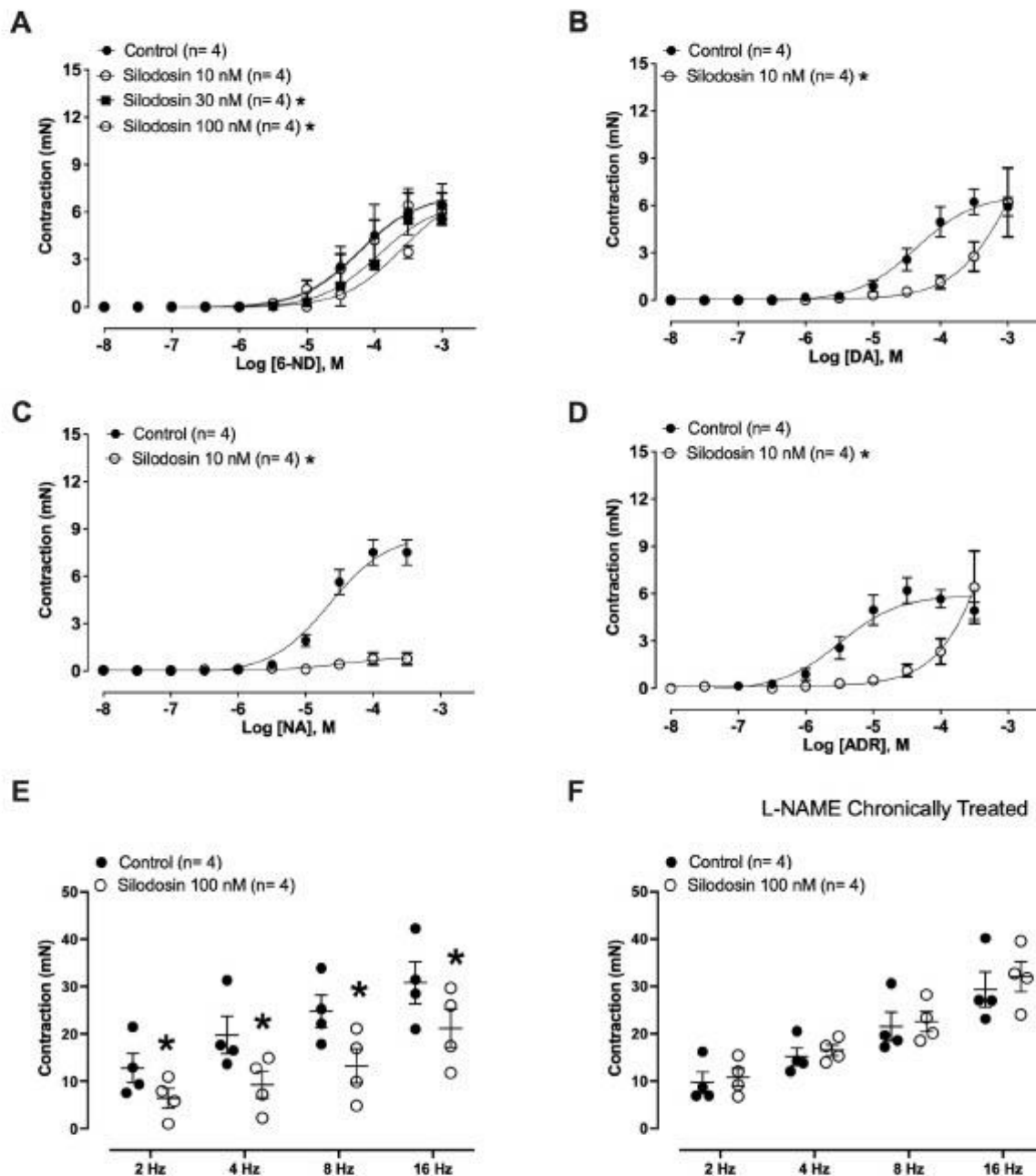


Fig. 4. Effect of silodosin in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). Silodosin (30 and 100 nM) induced significant concentration-dependent rightward shifts on the 6-ND induced contractions of the RIEVD (Panel A). Silodosin (10 nM) induced concentration rightward shifts on the contractions induced by dopamine (Panel B) and adrenaline (Panel D) of the RIEVD. Silodosin (10 nM) practically abolished the concentration-response curve to noradrenaline (Panel C) of the RIEVD. Silodosin (100 nM) caused reduction in the contractions induced by EFS of the RIEVD obtained from control animals (Panel E) but not in the contractions induced by EFS of the RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME (Panel F). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

(Fig. 2C; $p = 0.1988$) and adrenaline (Fig. 2D; $p = 0.1994$).

Tamsulosin (100 pM) had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD (Fig. 2E), but at higher concentrations (1 and 10 nM), it caused significant inhibitions of EFS-induced contractions in all frequencies (Fig. 2F and G, respectively). Tamsulosin (10 nM) failed to affect the EFS-induced contractions when RIEVD were obtained from animals chronically treated with L-NAME (Fig. 2H).

3.3. Effect of alfuzosin on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Alfuzosin at 10 nM produced a rightward shift on the RIEVD contractions induced by 6-ND (Fig. 3A; $p = 0.0004$) with a pA_2 value of 8.86 ± 0.07 ($n = 4$). At 10 nM, alfuzosin also produced rightward shifts in the concentration response curves to dopamine (Fig. 3B; $p = 0.0310$), noradrenaline (Fig. 3C; $p = 0.0001$) and adrenaline (Fig. 3D; $p = 0.0366$).

Alfuzosin (1 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD (Fig. S01), but at 10 nM caused a significant inhibition of EFS-

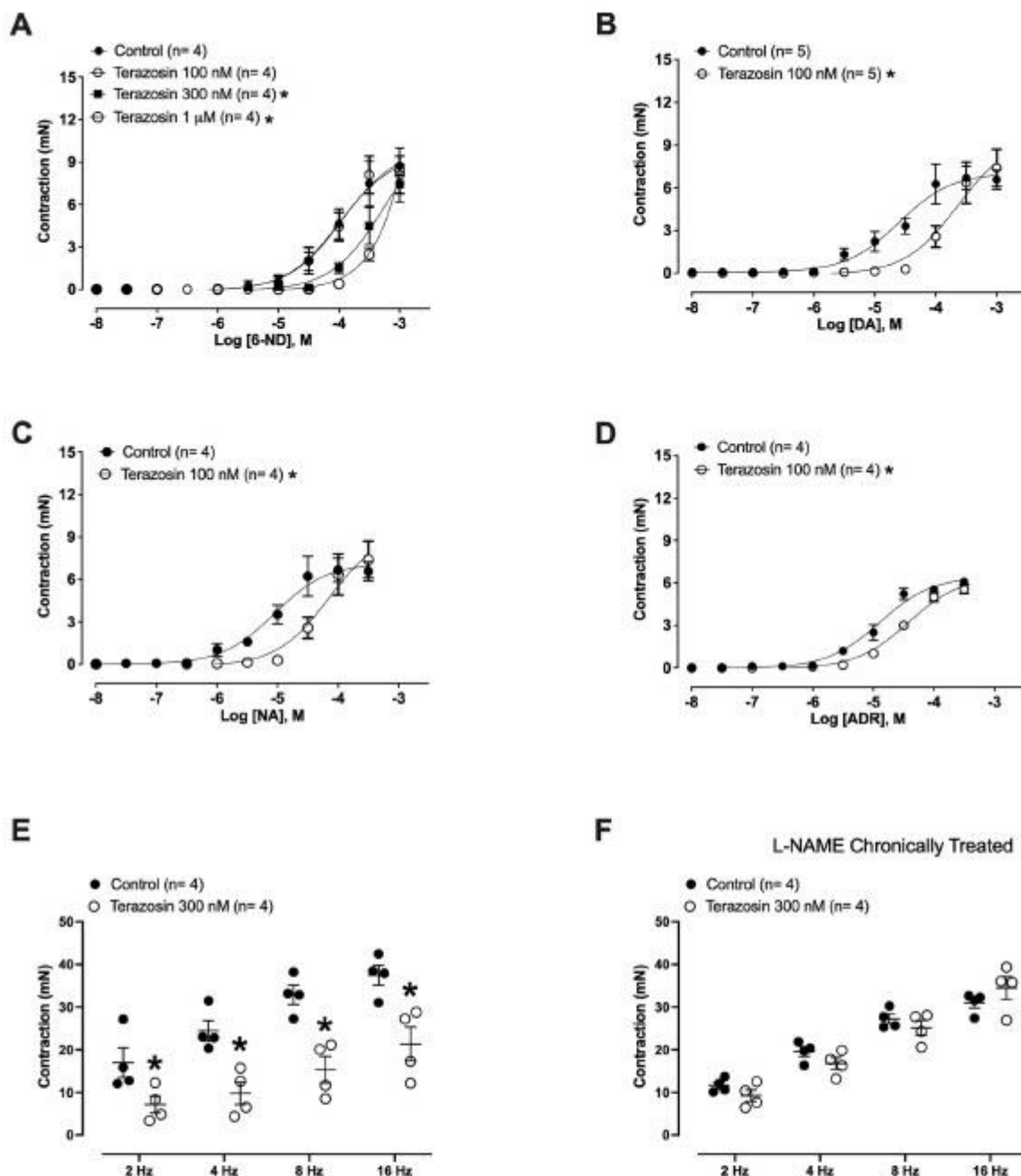


Fig. 5. Effect of terazosin in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). Terazosin (300 nM and 1 μM) induced significant concentration-dependent rightward shifts on the 6-ND induced contractions of the RIEVD (Panel A). Terazosin (100 nM) caused rightward shifts of the concentration-response curves dopamine (Panel B), noradrenaline (Panel C) and adrenaline (Panel D). Terazosin (300 nM; Panel E) caused significant ($p < 0.05$) reduction in the contractions induced by EFS of the RIEVD obtained from control animals (Panel E) but not from RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME (Panel F). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

induced contractions in RIEVD from control (Fig. 3E) but not from L-NAME-treated rats (Fig. 3F).

3.4. Effect of silodosin on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Silodosin (30 and 100 nM) produced concentration-dependent rightward shifts on the concentration-response curves to 6-ND (Fig. 4A; $p = 0.0442$ and $p = 0.0142$, respectively). The pA_2 value for silodosin was 7.70 ± 0.18 ($n = 4$). Silodosin (10 nM) induced concentration rightward shifts on the RIEVD contractions induced by dopamine

(Fig. 4B; $p = 0.0139$) and adrenaline (Fig. 4D; $p = 0.0310$), and practically abolished the noradrenaline-induced contractions (Fig. 4C; $p = 0.0001$).

Silodosin (10 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD (Fig. S02). At 100 nM, silodosin significantly inhibited the EFS-induced contractions of the RIEVD from control (Fig. 4E) but not from the L-NAME-treated rats (Fig. 4F).

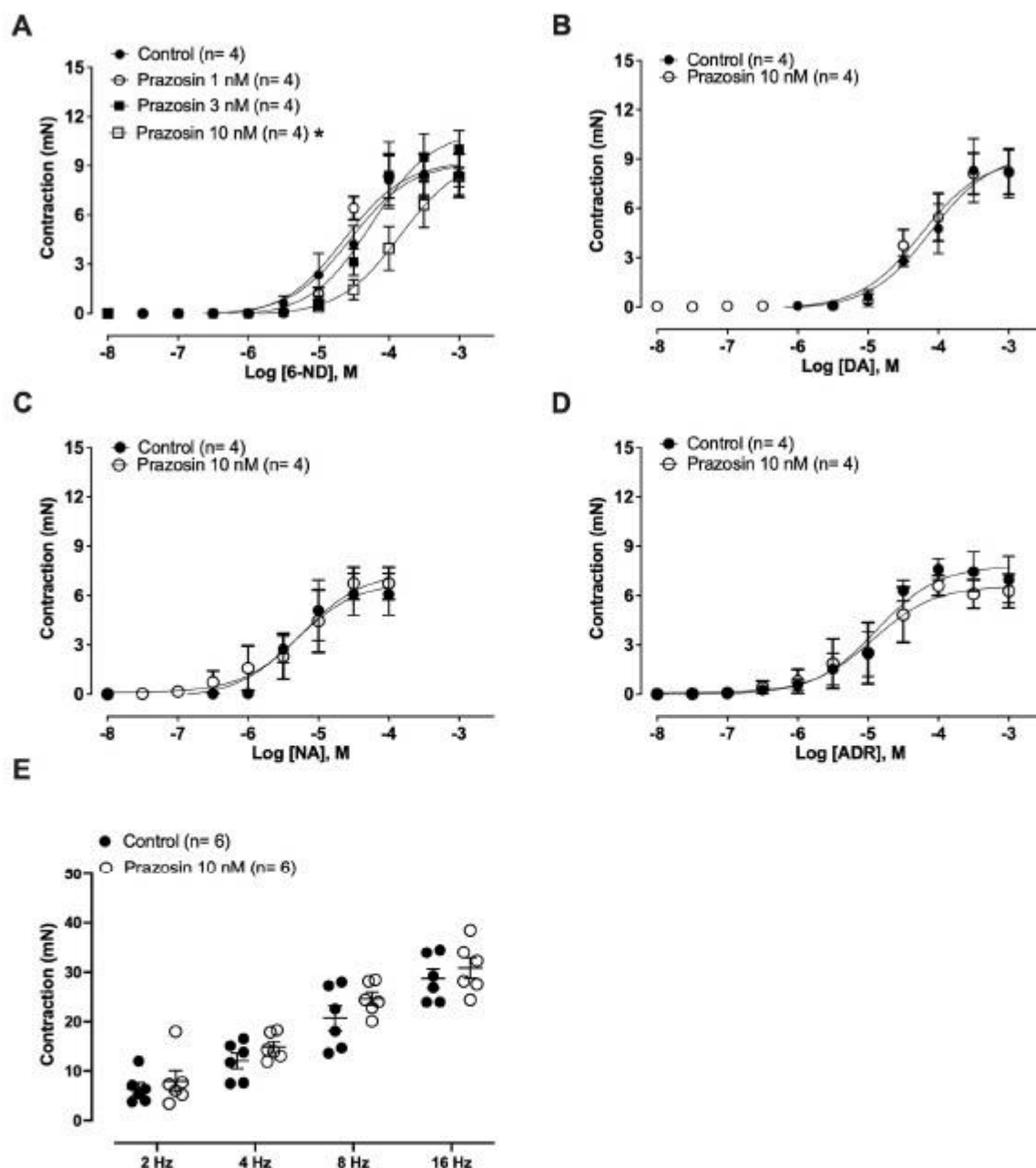


Fig. 6. Effect of prazosin in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD). Prazosin (10 nM) caused rightward shifts of the concentration-response curves to 6-ND. Prazosin (10 nM) had no effect on the contractions induced by dopamine (Panel B), noradrenaline (Panel C) and adrenaline (Panel D). Prazosin (10 nM) did not cause a significant reduction in the contractions induced by EFS of the RIEVD obtained from control animals (Panel E). * $P < 0.05$ compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

3.5. Effect of terazosin on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Terazosin (300 nM and 1 μ M) induced concentration-dependent rightward shifts on the 6-ND-induced contractions (Fig. 5A; $P = 0.0039$ and $p = 0.0001$, respectively) with a pA_2 value of 7.20 ± 0.06 ($n = 4$). Terazosin (100 nM) induced concentration rightward shifts on the RIEVD contractions induced by dopamine (Fig. 5B; $p = 0.0020$), noradrenaline (Fig. 5C; $p = 0.0023$) and adrenaline (Fig. 5D; $p = 0.0009$).

Terazosin (100 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD (Fig. S03), but at 300 nM caused a significant inhibition of EFS-induced contractions in RIEVD strips from control (Fig. 5E) but not from

L-NAME-treated animals (Fig. 5F).

3.6. Effect of prazosin on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Prazosin at 10 nM produced a concentration-dependent rightward shift on the concentration-response curve to 6-ND (Fig. 6A; $p = 0.0071$). The pA_2 value for prazosin was 8.82 ± 0.07 ($n = 4$). Prazosin (10 nM) had no effects on the RIEVD contractions induced by dopamine (Fig. 6B; $p = 0.4263$), noradrenaline (Fig. 6C; $p = 0.4649$) and adrenaline (Fig. 6D; $p = 0.3649$) of the RIEVD.

Prazosin (10 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD (Fig. 6E).

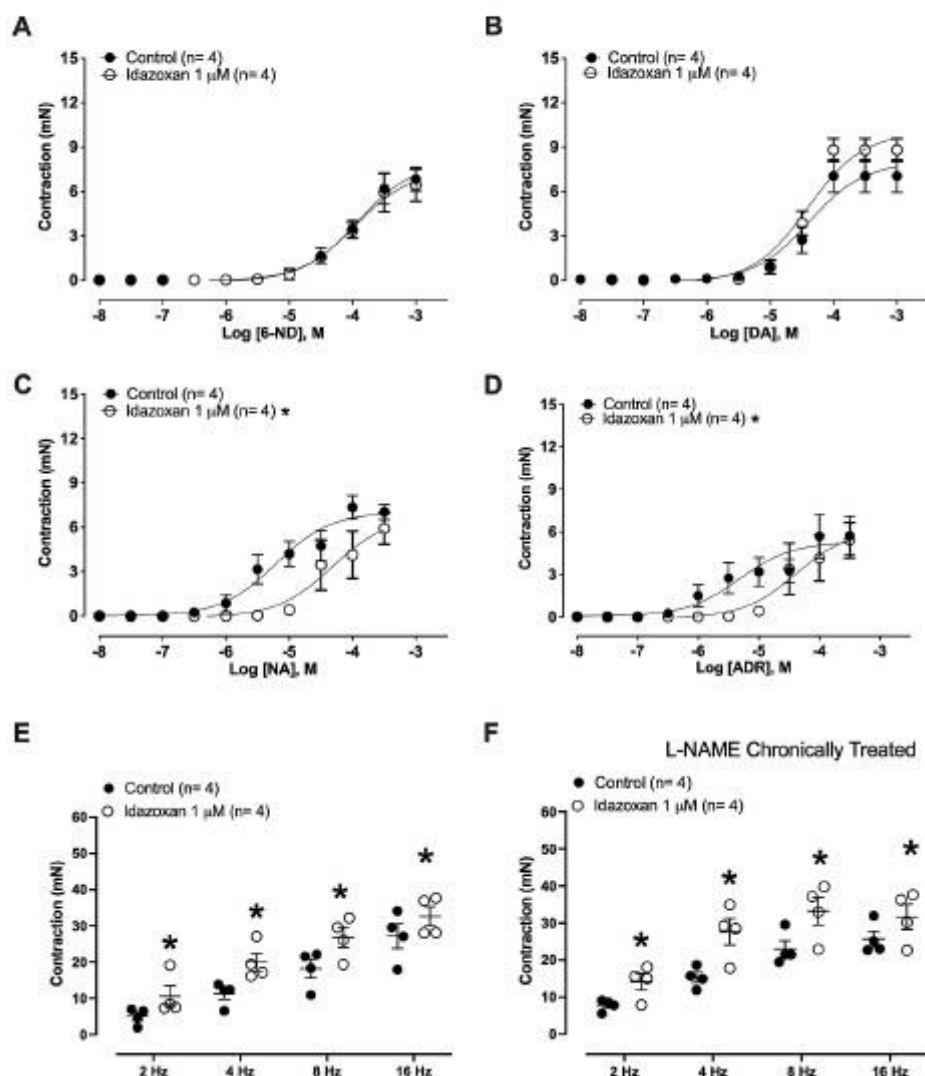


Fig. 7. Effect of idazoxan (1 μM) in the rat isolated epididymal vas deferens (RIEVD) on the concentration-response curves to 6-ND (Panel A), dopamine (Panel B), noradrenaline (Panel C) and adrenaline (Panel D). Idazoxan (1 μM; Panel E) potentiated the contractions induced by EFS of the RIEVD from control and from L-NAME chronically treated rats. (Panel F). *P < 0.05 compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

3.7. Effect of idazoxan on RIEVD contractions induced by catecholamines and EFS

Idazoxan was investigated at 0.01, 0.1 and 1 μM. At 0.01 μM, it had no effect, at 0.1 μM it caused a $32 \pm 7\%$ increase and at 1 μM caused $82 \pm 24\%$ increase in the EFS-induced contractions (Fig. S04). Idazoxan (1 μM) had no effect on the contractions of the RIEVD induced by 6-ND (Fig. 7A; $p = 0.2532$) and dopamine (Fig. 7B; $p = 0.3162$), but caused significant rightward shifts on the contractions induced by noradrenaline (Fig. 7C; $p = 0.0229$) and adrenaline (Fig. 7D; $p = 0.0220$) of the RIEVD.

Idazoxan (1 μM) significantly potentiated the EFS-induced contractions in the RIEVD strips obtained from both control (Fig. 7E) and L-NAME-treated rats (Fig. 7F).

3.8. Effect of prazosin on EFS-induced contractions of RIEVD pre-incubated with idazoxan

Prazosin (1 nM) had no effect on the EFS-induced contractions of RIEVD obtained from control animals which were pre-incubated (30 min) with idazoxan (1 μM; Fig. S05). Prazosin (10 nM) caused a

significant inhibition of EFS-induced contractions of the RIEVD preparations pre-incubated (30 min) with idazoxan (1 μM) in all frequencies (Fig. 8A). However, prazosin (10 nM) failed to affect the EFS-induced contractions when the RIEVD were obtained from animals chronically treated with L-NAME which were previously incubated with idazoxan (1 μM; Fig. 8B).

4. Discussion

Our results clearly demonstrate that α_1 -adrenergic receptor antagonists cause concentration-dependent antagonism of the contractions induced by 6-ND in the rat isolated epididymal vas deferens. The population of α_1 -adrenergic receptors in the rat vas deferens has been extensively characterized through functional, molecular and radioligand binding studies. The α_1 -adrenergic receptor subtypes α_{1A} , α_{1B} and α_{1D} are encoded by three different genes (ADRA1A, ADRA1B and ADRA1D) as single-chain protein products (Avellar et al., 2009). Vas deferens, epididymis and other genitourinary tissues present abundant *Adra1a* and *Adra1d* mRNAs and lower levels of *Adra1b* transcripts (Piascik et al., 1997; Queiróz et al., 2008). Although the logical assumption would be that 6-ND is acting as an α_1 -adrenergic receptor

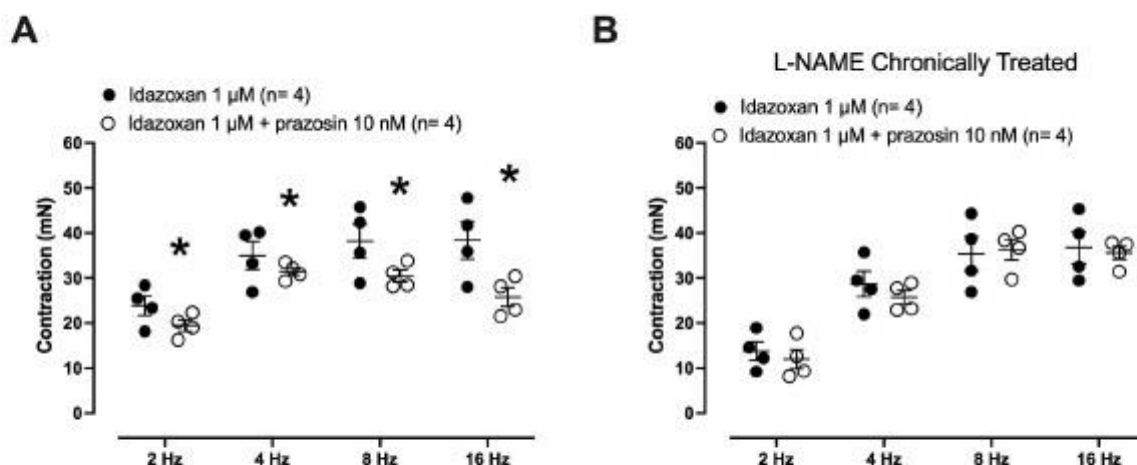


Fig. 8. Effect of prazosin on EFS-induced contractions of RIEVD which were pre-incubated (30 min) with idazoxan. Electric-field stimulation (EFS) caused frequency-dependent contractions of the RIEVD obtained from control animals (Panel A) and from L-NAME chronically treated rats (Panel B). Prazosin (10 nM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS but had no effect on the EFS-induced contractions of the RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME which were previously incubated (30 min) with idazoxan (1 μM). *P < 0.05 compared with respective control values. N means the number of vas deferens strips.

agonist, several pieces of pharmacological and clinical evidence discussed below do not support this hypothesis.

The first piece of evidence comes from the comparative profile of 6-ND with dopamine, noradrenaline and adrenaline in other tissues. Unlike the latter catecholamines, 6-ND causes no contractions in human umbilical cord vessels (HUCV; Britto-Junior et al., 2021b). Human umbilical cord vessels do express functional α_1 -adrenergic receptors since the contractions induced by noradrenaline in the human umbilical artery (Bodelsson and Stjernquist, 1995) and by adrenaline in the human umbilical vein (Errasti et al., 1999) were blocked by the α_1 -adrenergic antagonist prazosin. Similar results were observed in *Chelonoidis carbonaria* aortic rings where in contrast to dopamine, noradrenaline and adrenaline, 6-ND had no contractile activity (Britto-Junior et al., 2021c). In both HUCV and *Chelonoidis carbonaria* aortic rings, 6-ND acts as a selective dopamine D_2 -like receptor antagonist.

The second piece of evidence is supported by the results obtained with the α_1 -adrenergic receptor antagonists in the EFS-induced RIEVD contractions. The EFS-induced contraction presents a biphasic response, where the first phase is classified as non-adrenoceptor mediated and predominates in the prostatic portion, whereas the second phase is believed until now to be due mainly to noradrenaline release, and predominates in the epididymal portions (Brown et al., 1983). Our results clearly demonstrate that α_1 -adrenergic receptor antagonists only inhibit EFS-induced RIEVD contractions when employed at concentrations that provoke rightward shifts of the concentration response curve to 6-ND, indicating that 6-ND, but not noradrenaline, is the major mediator of this phenomenon. The finding that silodosin at 10 nM abolished noradrenaline-induced contractions but had no effect in either 6-ND- or EFS-induced RIEVD contractions clearly establishes that noradrenaline is not involved in this phenomenon. This is further clarified by the finding that doxazosin at 10 nM has no effect on the noradrenaline-induced contractions; yet, at this concentration, this antagonist inhibits both 6-ND and EFS-induced contractions. The results obtained with prazosin could be considered initially as “non-compliant”, since at 10 nM, prazosin inhibited 6-ND-induced contractions and yet, it had no effect on the noradrenaline- and EFS-induced RIEVD contractions. However, prazosin has a high affinity for rodent α_2 -adrenergic receptors, but a low affinity for non-rodent ones (Bylund, 1985) and a pre-synaptic α_2 -adrenoceptor blocking activity in the rat vas deferens (Vizi et al., 1983). Thus, the lack of effect of prazosin at 10 nM in the EFS-induced contractions could be due to the combination of its inhibitory effects on the 6-ND receptor and the pre-synaptic α_2 -adrenergic

receptor. Idazoxan is a pre-synaptic α_2 -adrenergic receptor antagonist (Doxey et al., 1983) that potentiates electrically induced contractions of the rat vas deferens (Doxey et al., 1985). In idazoxan-pretreated preparations, it is now possible to identify the inhibitory effect of prazosin at 10 nM on the EFS-induced contractions, due to the antagonist action on the 6-ND receptor.

The third piece of evidence is the loss of the inhibitory effect of all α_1 -adrenergic antagonists on the EFS-induced contractions in RIEVD obtained from animals chronically treated with L-NAME. The synthesis of 6-ND is coupled to NO synthesis (Britto-Junior et al., 2021a) and that chronic treatment with L-NAME is associated with reduction by about of 50% of the amounts of 6-noradrenaline extracted from porcine and rat brains (Tsunoda et al., 2007) and more importantly with a 60% reduction of the amounts of 6-ND released from rat isolated vas deferens (Britto-Junior et al., 2021a). Thus, the loss of the inhibitory effect of the α_1 -adrenergic antagonists on the EFS responses could be explained by the reduction of 6-ND synthesis in these animals.

The fourth piece of evidence comes from clinical observations. Both tricyclic antidepressants (Beaumont, 1977; Segraves, 1989) and α_1 -adrenergic receptor antagonists (Cavallini, 1995; Hsieh et al., 1999; Debruyne, 2000) cause ejaculation disorders and are therapeutically used for the treatment of premature ejaculation. Although the pathophysiology of ejaculation disorders is probably multifactorial, the pharmacological mechanisms of action of both tricyclic antidepressants and α_1 -adrenergic receptor antagonists are reasonably established. Tricyclic antidepressants inhibit both serotonin (SERT) and noradrenaline (NET) transporters, responsible for the re-uptake of serotonin and noradrenaline, respectively (Feighner, 1999; López-Muñoz and Alamo, 2009). This mechanism of action causes an increase of both serotonin and noradrenaline in the synaptic cleft. Since α_1 -adrenergic receptor antagonists also cause delayed ejaculation and has an opposite pharmacodynamic effect, this apparent paradox indicates that these drugs must be acting in different places to explain its efficacy in the treatment of premature ejaculation. However, an exciting possibility is that α_1 -adrenergic antagonists could be acting as 6-ND receptor antagonists in the vas deferens. Since tricyclic antidepressants block 6-ND receptor in the rat vas deferens (Britto-Junior et al., 2021a), this would establish a common peripheral mechanism by which this class of compounds cause ejaculation abnormalities. Indeed, the finding that both tricyclic antidepressants and α_1 -adrenergic antagonists selectively antagonize 6-ND-induced contractions of the rat isolated vas deferens offers the interesting hypothesis that 6-ND must be the main peripheral mediator

of the emission process.

5. Conclusion

In conclusion, the results here presented reinforce the concept that 6-ND is an endogenous modulator of the rat vas deferens. The observation that α_1 -adrenergic antagonists act as 6-ND receptor antagonists opens the possibility that many actions previously attributed to noradrenaline could be actually due to the presence of this novel mediator 6-ND.

CRediT authorship contribution statement

José Brito-Júnior: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **André Ribeiro:** Investigation, Methodology. **Luiz Ximenes:** Investigation, Methodology. **Antonio Tiago Lima:** Investigation, Methodology. **Felipe Fernandes Jacintho:** Investigation, Methodology. **Adriano Fregonesi:** Methodology. **Fabiola Z. Mônica:** Methodology, Supervision. **Edson Antunes:** Funding acquisition, Methodology, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Gilberto De Nucci:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Writing – review & editing, Investigation, Visualization, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing or financial interests.

Acknowledgment

JBj & LX thank CAPES for PhD fellowship (001). FFJ thanks FAPESP for PhD fellowship (2018/24971-9). ATL thanks Capes for master's fellowship. EA & FM thank FAPESP (2017/15175-1). GDN thanks FAPESP (2019/16805-4), FAEPEX (2469/21) and CNPq (303839/2019-8).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174716>.

References

- Andersson, K.E., Lepor, H., Wyllie, M.G., 1997. Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity. *Prostate* 30 (3), 202–215. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0045\(19970215\)30:3<202::aid-pros9>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0045(19970215)30:3<202::aid-pros9>3.0.co;2-n).
- Arunlakshana, O., Schild, H.O., 1959. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 14 (1), 48–58. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1959.tb00928.x>. PMID: 13651579.
- Avellar, M.C., Lázari, M.P., Porto, C.S., 2009. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81 (3), 321–344. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000300002>.
- Başar, M.M., Yilmaz, E., Ferhat, M., Başar, H., Batıslam, E., 2005. Terazosin in the treatment of premature ejaculation: a short-term follow-up. *Int. Urol. Nephrol.* 37 (4), 773–777. <https://doi.org/10.1007/s11255-005-3616-4>.
- Beaumont, G., 1977. Sexual side-effects of clomipramine (Anafranil). *J. Int. Med. Res.* 5 (Suppl. 1), 37–44.
- Bodelson, G., Stjernquist, M., 1995. Characterization of contractile adrenoceptors in the human umbilical artery. *Eur. J. Pharmacol.* 25/282 (1–3), 95–101. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00277-r](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00277-r).
- Britto-Júnior, J., Ximenes, L., Ribeiro, A., Fregonesi, A., Campos, R., Kiguti, L.R.A., Mônica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2021a. 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 1 (911), 174544. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174544>.
- Britto-Júnior, J., Coelho-Silva, W.C., Murari, G.F., Serpellone-Nash, C.E., Mônica, F.Z., Antunes, E., De Nucci, G., 2021b. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci.* 1 (276), 119425. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119425>.
- Britto-Júnior, J., Campos, R., Peixoto, M., Lima, A.T., Jacintho, F.F., Mônica, F.Z., Moreno, A.M., Antunes, E., De Nucci, G., 2021c. 6-nitrodopamine is an endogenous selective antagonist of dopamine-induced contractions of chelonoidis carbonaria aorta. *Biology Open*. Submitted.
- Brown, D.A., Docherty, J.R., French, A.M., MacDonald, A., McGrath, J.C., Scott, N.C., 1983. Separation of adrenergic and non-adrenergic contractions to field stimulation in the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 79 (2), 379–393. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1983.tb11010.x>.
- Bylund, D.B., 1985. Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22 (5), 835–843. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(85\)90536-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(85)90536-2).
- Cavallini, G., 1995. Alpha-1 blockade pharmacotherapy in primitive psychogenic premature ejaculation resistant to psychotherapy. *Eur. Urol.* 1995;28 (2), 126–130. <https://doi.org/10.1159/000475036>.
- Debruyne, P.M., 2000. Alpha blockers: are all created equal? *Urology* 1;56 (5 Suppl. 1), 20–22. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00744-5](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00744-5).
- Djavan, B., Chapple, C., Milani, S., Marberger, M., 2004. State of the art on the efficacy and tolerability of alpha1-adrenoceptor antagonists in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia. *Urology* 64 (6), 1061–1068.
- Docherty, J.R., 2019. The pharmacology of α_1 -adrenoceptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 15 (855), 305–320. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.04.047>. PMID: 31067439.
- Dosey, J.C., Roach, A.G., Smith, C.F., 1983. Studies on RX 781094: a selective, potent and specific antagonist of alpha 2-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 78 (3), 489–505. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1983.tb06809.x>.
- Dosey, J.C., Roach, A.G., Samuel, J., 1985. Effects of desipramine on stimulation-induced contractions of the vas deferens of rats pretreated either chronically with desipramine or acutely with idazoxan. *Clin. Sci. (Lond.)* 68 (Suppl. 10), 155s–159s. <https://doi.org/10.1042/cs068s155>.
- Dunn, C.J., Matheson, A., Pauls, D.M., 2002. Tamsulosin: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. *Drugs Aging* 19 (2), 135–161. <https://doi.org/10.2165/00002512-200219020-00004>. PMID: 11950378.
- Elliott, H.L., Meredith, P.A., Sumner, D.J., McLean, K., Reid, J.L., 1982. A pharmacodynamic and pharmacokinetic assessment of a new alpha-adrenoceptor antagonist, doxazosin (UK33274) in normotensive subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 13 (5), 699–703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1982.tb01439.x>.
- Errasti, A.E., Velo, M.P., Torres, R.M., Sardi, S.P., Rothlin, R.P., 1999. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in human umbilical vein. *Br. J. Pharmacol.* 126 (2), 437–442. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702320>.
- Feighner, J.P., 1999. Mechanism of action of antidepressant medications. *J. Clin. Psychiatr.* 60 (Suppl. 4), 4–11 discussion 12–3. PMID: 10086478.
- Frishman, W.H., Eisen, G., Lapsker, J., 1988. Terazosin: a new long-acting alpha 1-adrenergic antagonist for hypertension. *Med. Clin.* 72 (2), 441–448. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30778-7](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30778-7). PMID: 2894488.
- Giuliano, P., Clement, P., 2012. Pharmacology for the treatment of premature ejaculation. *Pharmacol. Rev.* 64 (3), 621–644. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004952>. PMID: 22679220.
- Giuliano, P., Hellstrom, W.J., 2008. The pharmacological treatment of premature ejaculation. *BJU Int.* 102 (6), 668–675. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.07719.x>. PMID: 18485043.
- Hellstrom, W.J., Sikka, S.C., 2006. Effects of acute treatment with tamsulosin versus alfuzosin on ejaculatory function in normal volunteers. *J. Urol.* 176 (4 Pt 1), 1529–1533.
- Höfner, K., Claes, H., De Reijke, T.M., Folkestad, B., Speakman, M.J., 1999. Tamsulosin 0.4 mg once daily: effect on sexual function in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction. *Eur. Urol.* 36 (4), 335–341. <https://doi.org/10.1159/000019996>. PMID: 10473995.
- Hsieh, J.T., Liu, S.P., Hsieh, C.H., Cheng, J.T., 1999. An in vivo evaluation of the therapeutic potential of sympatholytic agents on premature ejaculation. *BJU Int.* 84 (4), 503–506. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1999.00173.x>. PMID: 10468770.
- Keating, G.M., 2015. Silodosin: a review of its use in the treatment of the signs and symptoms of benign prostatic hyperplasia. *Drugs* 75 (2), 207–217. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0344-z>. PMID: 25575983.
- Lepor, H., Baumann, M., Shapiro, E., 1988. The stereospecificity of LY253352 for alpha 1-adrenoceptor binding sites in the brain and prostate. *Br. J. Pharmacol.* 95 (1), 139–144. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb16557.x>. PMID: 2851347; PMID: PMC1854123.
- López-Muñoz, P., Alamo, C., 2009. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr. Pharmaceut. Des.* 15 (14), 1563–1586. <https://doi.org/10.2174/138161209788168001>. PMID: 19442174.
- Martin, M.C., 2010. The pharmacological profile of the α_1 A-adrenoceptor antagonist silodosin. *Eur. Urol. Suppl.* 9 (4), 486–490.
- Monteiro, W.O., Noshirvani, H.F., Marks, I.M., Lelliott, P.T., 1987. Anorgasmia from clomipramine in obsessive compulsive disorder: a controlled trial. *Br. J. Psychiatry* 151, 107–112.
- Motulsky, H., 2014. Normality Tests. In: *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 203–208.
- O'Leary, M.P., 2001. Tamsulosin: current clinical experience. *discussion 48 Urology* 58 (6 Suppl. 1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(01\)01346-2](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01346-2). PMID: 11750250.
- Percie du Sert, N., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holtgate, S.T., Howells, D.W., Hurst, V., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lüdter, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, P., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E. S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H., 2020. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 14;18 (7), e3000411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>.

- Piascik, M.T., Hrometz, S.L., Edelmann, S.E., Guarino, R.D., Hadley, R.W., Brown, R.D., 1997. Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 283 (2), 854–868. PMID: 9353407.
- Puppo, V., Puppo, G., 2016. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: premature ejaculation is not a disease. *Clin. Anat.* 29 (1), 111–119. <https://doi.org/10.1002/ca.22655>. PMID: 26457680.
- Queiróz, D.B., Porto, C.S., Grossman, G., Petrusz, P., Avellar, M.C., 2008. Immunolocalization of alpha(1A)-adrenoceptors in rat and human epididymis. *Cell Tissue Res.* 332 (3), 509–522. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0576-x>. PMID: 18351393.
- Ramsay, J.W., Scott, G.J., Whitfield, H.N., 1988. A double-blind controlled trial of a new alpha-1 blocking drug in the treatment of bladder outflow obstruction. *Br. J. Urol.* 57 (6), 657–659. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1985.tb07026.x>. PMID: 2417649.
- Ribeiro, M.O., Antunes, E., De Nucci, G., Lovisolo, S.M., Zatz, R., 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20 (3), 298–303. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.20.3.298>. PMID: 1516948.
- Roehrborn, C.G., 2009. Efficacy of alpha-adrenergic receptor blockers in the treatment of male lower urinary tract symptoms. *Rev. Urol.* 11 (Suppl. 1), S1–S8.
- Segraves, R.T., 1989. Effects of psychotropic drugs on human erection and ejaculation. *Arch. Gen. Psychiatr.* 46, 275–284.
- Segraves, R., 2007. Sexual dysfunction associated with antidepressant therapy. *Urol. Clin.* 24, 575–579.
- Segraves, R.T., Balon, R., 2014. Antidepressant-induced sexual dysfunction in men. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 121, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.003>. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24239785.
- Tsunoda, M., Uchino, E., Imai, K., Hayakawa, K., Funatsu, T., 2007. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. *J. Chromatogr. A* 1164 (1–2), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.005>.
- U'Prichard, D.C., Charness, M.E., Robertson, D., Snyder, S.H., 1978. Prazosin: differential affinities for two populations of alpha-noradrenergic receptor binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 1;50 (1), 87–89. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90258-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90258-3). PMID: 28235.
- Vizi, E.S., Ludvig, N., Rónai, A.Z., Polly, G., 1983. Dissociation of presynaptic alpha 2-adrenoceptors following prazosin administration: presynaptic effect of prazosin. *Eur. J. Pharmacol.* 25;95 (3–4), 287–290. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(83\)90648-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(83)90648-9). PMID: 6317415.
- Wilt, T.J., MacDonald, R., 2006. Doxazosin in the treatment of benign prostatic hypertrophy: an update. *Clin. Interv. Aging* 1 (4), 389–401. <https://doi.org/10.2147/cia.2006.1.4.389>. PMID: 18046916; PMCID: PMC2699642.
- Ximenes, L.E., Brito-Júnior, J., Silva-Filho, W., Jacintho, F., Cuppoloni, M., Fregonesi, A., De Nucci, G., 2021. Pd62-12 6-nitrodopamine is released by rat isolated vas deferens and modulates its contractility. *J. Urol.* 206 (3) e1077–e1077.
- Yamagishi, R., Akiyama, K., Nakamura, S., Hora, M., Masuda, N., Matsuzawa, A., Murata, S., Ujii, A., Kurashina, Y., Iizuka, K., Kitazawa, M., 1966. Effect of KMD-3213, an alpha 1a-adrenoceptor-selective antagonist, on the contractions of rabbit prostate and rabbit and rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 7;315 (1), 73–79. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(96\)00589-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(96)00589-4). PMID: 8960867.

3.3 Artigo 3 - 6-NITRODOPAMINE IS RELEASED BY RAT ISOLATED VAS DEFERENS AND MODULATES ITS CONTRACTILITY

Luiz Eduardo Ximenes, José Britto-Júnior, Walter Silva-Filho, Felipe Jacintho, Milton Cuppoloni, Adriano Fregonesi, and Gilberto De Nucci

Revista: Journal of Urology

Situação: Publicado on-line em 01 de setembro de 2001



PD62-12

6-NITRODOPAMINE IS RELEASED BY RAT ISOLATED VAS DEFERENS AND MODULATES ITS CONTRACTILITY

Luiz Eduardo Ximenes*, José Brito-Júnior, Walter Silva-Filho, Felipe Jacintho, Campinas, Brazil; Milton Cuppoloni, São Paulo, Brazil; Adriano Fregonesi, Gilberto De Nucci, Campinas, Brazil

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: 6-nitrodopamine (6-ND) is released by human umbilical cord vessels and acts as a dopamine D₂-receptor antagonist in this tissue *in vitro*. Here it was investigated whether 6-ND is released by rat isolated vas deferens (RVD) and its action on this tissue *in vitro*.

METHODS: Segments of RVD were suspended in 5 mL organ bath containing Krebs-Henseleit's solution (KHS) containing ascorbic acid (3 mM) solution for 30 min and the quantification of 6-ND was performed by LC-MS-MS. For *in vitro* reactivity assay, RVD epididymal strips were suspended between two metal hooks in 10-mL organ baths containing KHS, continuously gassed with a mixture of 95%O₂: 5% CO₂ (pH 7.4) at 37°C.

RESULTS: The detected basal release of 6-ND was 1.8 ± 0.3 ng/mL ($n=10$) which was inhibited when the RVD strips were pre-treated with the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME (0.8 ± 0.2 ng/mL, $n=10$). 6-ND and noradrenaline caused concentration-dependent contractions of RVD (pEC_{50} 4.7 ± 0.1 and 5.6 ± 0.1 , respectively; $n=22$). Desipramine (100 nM) inhibited 6-ND induced contractions (pEC_{50} 3.7 ± 0.1 , $n=5$) but potentiated noradrenaline-induced contractions of RVD (pEC_{50} 6.6 ± 0.1 , $n=5$). Similar results were observed in human isolated vas deferens. Electric field stimulation (EFS) caused frequency dependent (4, 8 and 16 Hz) contractions which were inhibited by desipramine (100 nM, $n=4$; Figure A). This inhibitory effect of desipramine (100 nM) was not observed in the RVD from animals chronically treated with L-NAME ($n=4$, Figure B).

CONCLUSIONS: This is the first demonstration that 6-ND is released by vas deferens. The finding that L-NAME inhibits both the release of 6-ND and the contractions induced by EFS, indicates that 6-ND, and not noradrenaline, may be the mediator responsible for the EFS-induced contractions of RVD. This hypothesis is further supported by the inhibition caused by desipramine in both 6-ND and EFS-induced contractions of RVD.

Source of Funding: CAPES Foundation and FAPESP

4 DISCUSSÃO

Os achados de nossa pesquisa evidenciam de forma inédita que a VDEIR possui uma liberação basal de 6-ND, a qual foi identificada por meio da técnica LC-MS-MS. Observou-se que a liberação basal de 6-ND foi substancialmente inibida (92,3%) após a incubação com L-NAME, sugerindo uma ligação entre a síntese de 6-ND e a produção de NO, como evidenciado em vasos do cordão umbilical humano.

No entanto, em amostras de VDEIR obtidas de animais que receberam tratamento crônico com L-NAME, observou-se uma redução menos acentuada na inibição da liberação basal de 6-ND (60,7%). Resultados semelhantes de inibição (50%) pelo tratamento crônico com L-NAME foram observados para a 6-nitronoradrenalina extraída do cérebro de ratos. (27).

Embora a incubação *in vitro* com L-NAME tenha levado a uma inibição de mais de 90% na liberação basal de 6-ND, não houve efeito nas contrações induzidas por EFS em VDEIR. Por outro lado, a inibição da liberação basal de 6-ND pelo tratamento crônico com L-NAME foi de aproximadamente 60%, porém, isso foi correlacionado com uma redução significativa nas contrações induzidas por EFS. (53). Uma explicação plausível para essa aparente contradição é que o 6-ND pode estar contido em vesículas, seguindo o mesmo padrão observado com a noradrenalina, e ser liberado no espaço sináptico em resposta aos estímulos.

As respostas contráteis para 6-ND foram registradas em concentrações entre 1 e 10 μ M, enquanto os níveis detectados foram inferiores a 50 nM. Essa discrepância aparente pode ser elucidada pela distinção entre a concentração local (onde o mediador é liberado) e a concentração necessária para ser alcançada no ambiente de banho de órgãos para produzir o mesmo efeito.

Isso é evidenciado no leito vascular mesentérico perfundido isolado de ratos, onde o óxido nítrico (NO) exógeno, em doses que geraram respostas menores dentro do leito mesentérico, conseguiu persistir nos tecidos do ensaio, ao contrário do NO gerado endogenamente. (54). Além disso, as quantidades de 6-ND liberadas são comparáveis às de noradrenalina após extração e quantificação usando HPLC acoplada à detecção eletroquímica. (55,56).

Dopamina e 6-ND apresentaram valores de pEC₅₀ semelhantes no VDEIR (4,73 e 4,69, respectivamente), os quais foram menos potentes do que os observados para noradrenalina (5,59) e adrenalina (5,48). É interessante notar que o antagonista seletivo de α 1-adrenoceptores, prazosina, inibe as contrações VDEIR induzidas tanto por noradrenalina quanto por dopamina, sugerindo que essas catecolaminas ativam a mesma população de receptores α 1-adrenérgicos.(57).

No entanto, é improvável que o 6-ND esteja atuando nos receptores α_1 -adrenérgicos, pois ao contrário da dopamina, noradrenalina e adrenalina, o 6-ND não causa contrações do HUCV (Britto-Júnior et al., 2021). O antagonista do α_1 -adrenoceptor bloqueia as contrações induzidas tanto pela noradrenalina na artéria umbilical humana quanto pela adrenalina na veia umbilical humana, demonstrando a presença de α_1 -adrenoceptores funcionais no HUCV.(58,59)

Existe a possibilidade de que o 6-ND esteja exercendo efeitos sobre os receptores dopaminérgicos? Foi identificada a presença de receptores de dopamina D1 nas terminações nervosas simpáticas dos vasos deferentes de porquinhos-da-índia (60). A ativação dos receptores de dopamina D₁ estimula a adenilato ciclase a aumentar os níveis intracelulares de cAMP (24).

Curiosamente, o agonista do receptor D₁ fenoldopam (61) causa relaxamento das artérias e veias umbilicais humanas(62). O antagonista de dopamina D1 SCH-23390 não afetou as contrações do VDEIR induzidas por 6-ND. Ao invés disso, observou-se um deslocamento importante para a esquerda na curva de concentração-resposta para 6-ND, sugerindo a existência de receptores de dopamina D1 ativos no ducto deferente do rato.

O antagonista dopaminérgico D₂-like haloperidol antagonizou a contração induzida por dopamina dos vasos deferentes de ratos, embora na concentração empregada (250 nM), certamente bloqueie o receptor pós-sináptico α_1 adrenérgico (K_i 7,6 nM ; (63). De fato, o emprego de N-0923, um agonista seletivo do receptor D2 da dopamina, revelou a presença desses receptores apenas no camundongo, não sendo identificados no ducto deferente do rato. (64).

No entanto, a descoberta de que o haloperidol (100 nM) causou um deslocamento importante para a direita na curva concentração-resposta à dopamina, sem afetar as respostas ao 6-ND, sugere que o 6-ND não está agindo sobre esse receptor dopaminérgico (ou adrenérgico).

É importante salientar que não há relatos de receptores de dopamina D₃ no canal deferente. O desvio à direita causado pelo antagonista do receptor D3 PG-01037 na curva concentração-resposta à dopamina sugere a presença desse receptor no ducto deferente do rato. Porém, este não afetou as respostas a 6-ND, demonstrando que receptor dopaminérgico não está envolvido no processo de contração induzida pelo 6-ND.

Os vasos deferentes da cobaia expressam receptores funcionais de dopamina D4 (65). O antagonista do receptor D₄, sonopiprazole, provocou um desvio significativo para a direita na curva concentração-resposta à dopamina, indicando a existência de receptores D4 da dopamina no VDEIR.

Porém, na mesma concentração, a curva concentração-resposta ao 6-ND não foi afetada, sugerindo que o 6-ND não está atuando neste receptor. Além disso, a falta de efeito de todos os antagonistas da dopamina mencionados acima nas contrações induzidas por EFS sugere que a dopamina não modula esse fenômeno, o que sustentada pela ausência de detecção de dopamina basal no ducto deferente de rato.

Como é de conhecimento geral, antidepressivos tricíclicos possuem a capacidade de bloquear os receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos (66,67). A amitriptilina (68) (Sánchez et al., 1999) e a clomipramina (69) bloqueiam o receptor $\alpha 1$ -adrenérgico no córtex de ratos a 61 e 15,5 nM, respectivamente, enquanto a desipramina (70) bloqueia o receptor $\alpha 1$ -adrenérgico humano receptor a 100 nM.

Ao verificar que os compostos tricíclicos estudados causaram desvios para a direita apenas nas curvas de concentração-resposta para 6-ND indica a que eles não estão agindo como antagonistas do receptor $\alpha 1$. De fato, o composto tetracíclico maprotilina inibe o receptor alfa1 adrenérgico do cérebro humano a 90 nM (71), mas não teve efeito nas curvas concentração-resposta às contrações VDEIR induzidas por 6-ND ou EFS. Os resultados mostram que o mecanismo que os antidepressivos tricíclicos que antagonizam o 6-ND não é feito através dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos.

É sabido que o mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos é o bloqueio dos receptores H1 histaminérgicos (72). É improvável que o 6-ND esteja atuando nesses receptores no VDEIR, uma vez que a histamina tem um efeito depressor nas contrações dos vasos deferentes induzidas por EFS(73).

Os antidepressivos tricíclicos também possuem o mecanismo da inibição dos transportadores de serotonina (SERT) e noradrenalina (NET), favorecendo a recaptação de serotonina e noradrenalina(72). Por exemplo, a amitriptilina inibe SERT e NET clonados humanos a 67 nM e 63 nM, respectivamente(74), a desipramina inibe SERT cerebral de rato (75) e NET (76) a 106 e 0,15 nM , respectivamente, e a clomipramina inibe SERT de córtex de rato(77) e NET humano(78) a 5 e 38 nM , respectivamente.

A ciclobenzaprina, um relaxante muscular de ação central, também possui a capacidade de inibir a SERT e NET (79). A paroxetina também inibe o SERT do córtex de rato (0,5 nM) (80) e o NET de rato (81 nM) (68), porem não modificou as curvas de concentração-resposta para 6-ND ou EFS, o que indica que as drogas citada acima não participam do bloqueio da SERT e NET.

A serotonina causou contrações através da ativação dos receptores 5-HT pós-sinápticos localizados no epidídimo (81,82). A cetanserina bloqueia receptores 5-HT_{2A} (0,88 nM ; (83), 5-HT_{1A} (0,5 nM ; (84) e 5-HT_{1B} (1,9 μ M; (85).

Amitriptilina, clomipramina e desipramina possuem a capacidade de bloquear os receptores 5-HT_{2A} (72). Devido ao achado que a cetanserina não modificou a curva concentração-resposta ao 6-ND exclui o envolvimento dos receptores de serotonina, devido ao antagonismo observado com os antidepressivos tricíclicos.

A acetilcolina é liberada por VDEIR (86) porém a atropina não afetou as contrações induzidas por estimulação nervosa (87) ou por 6-ND, indicando a falta de envolvimento de receptores colinérgicos.

Neste contexto, sugerimos que os antidepressivos tricíclicos, como a ciclobenzaprina e a carbamazepina, possam estar exercendo sua ação como antagonistas do receptor 6-ND. Esta hipótese é respaldada pela ausência de efeito desses medicamentos nas contrações induzidas por EFS em tiras de VDEIR provenientes de animais tratados cronicamente com L-NAME.

O que temos aprendido sobre esse novo receptor 6-ND no ducto deferente? Os achados indicam que o receptor 6-ND é inibido por compostos tricíclicos, como as dibenzoazepinas (desipramina, clomipramina e carbamazepina), assim como por dibenzocicloheptenos (amitriptilina e ciclobenzaprina), porém não por agentes tetracíclicos, como a maprotilina, ou por dibenzoazepinas modificadas, como a oxcarbazepina.

A inibição foi observada em concentrações na faixa mais baixa em comparação com o antidepressivo tricíclico $C_{máx}$ (88,89) ou cem vezes menor quando comparada aos níveis terapêuticos plasmáticos de carbamazepina e oxcarbazepina (90).

Qual é a função fisiológica do 6-ND no ducto deferente? A farmacologia desvenda os papéis fisiológicos dos mediadores através das ações dos antagonistas e inibidores. Como mencionado anteriormente, os antidepressivos tricíclicos, ciclobenzaprina e carbamazepina, atuam como antagonistas do 6-ND no ducto deferente.

Estudos clínicos montaram que os antidepressivos tricíclicos podem causar ejaculação retardada(91) Outros medicamentos também podem causar este efeito adverso como a ciclobenzaprina e carbamazepina. (92,93). Outra medicação utilizada no tratamento de ejaculação precoce é a clomipramina (93). Em ensaio clínico, foi possível avaliar a capacidade de retardo da ejaculação esta droga.

Neste estudo foi verificado que a 6-ND é liberada no ducto deferente em quantidades significativamente maiores do que a noradrenalina, aproximadamente 20 vezes mais. O sugere a interessante possibilidade de seu papel no processo ejaculatório.

Através das informações adquiridas nos ensaios com os fármacos anteriores a necessidade de avaliar os receptores adrenérgico se fez necessário. Nossos resultados demonstram claramente que os antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos causam antagonismo dependente da concentração das contrações induzidas por 6-ND no canal deferente epididimal isolado de rato.

A população de receptores α_1 -adrenérgicos no vaso deferente de rato foi extensivamente caracterizada através de estudos funcionais, moleculares e de ligação de radioligantes. Os subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}) estão relacionados com três genes: ADRA1A, ADRA1B e ADRA1D (94).

Nos vasos deferentes, epidídimos e outros tecidos geniturinários são identificados principalmente mRNAs Adra1a e Adra1d. O Adra1b possui menos números de transcrição (95). É presumido que a 6-ND esteja agindo como um agonista do receptor α_1 -adrenérgico. Porém, uma série de evidências, sejam elas farmacológicas e/ou clínicas discutidas abaixo não suportam essa hipótese.

A comparação da 6-ND com dopamina, noradrenalina e adrenalina em outros tecidos. Ao contrário das últimas catecolaminas, o 6-ND não causa contrações nos vasos do cordão umbilical humano (HUCV)(96).

No cordão umbilical humano, o seus vasos expressam receptores α_1 -adrenérgicos funcionais, uma vez que as contrações induzidas pela noradrenalina na artéria umbilical humana (58) e pela adrenalina na veia umbilical humana podem ser abolidas pelo Antagonista α_1 -adrenérgico prazosina. (59)

Através dos resultados coletados com os antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos nas contrações de VDEIR induzidas por EFS. A contração induzida por EFS apresenta característica bifásica, onde a primeira fase não é mediada por adrenoceptores e predomina na porção prostática, enquanto a segunda fase ocorre (até o momento) principalmente da liberação de noradrenalina, e predomina nas porções epididimárias (97).

Nossos resultados demonstram claramente que os antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos inibem apenas as contrações VDEIR induzidas por EFS quando empregados em concentrações que provocam desvios para a direita da curva de resposta à concentração para 6-ND, indicando que 6-ND, mas não a noradrenalina, é o principal mediador deste fenômeno.

A constatação de que a silodosina a 10 nM aboliu as contrações induzidas por noradrenalina, mas não teve efeito nas contrações VDEIR induzidas por 6-ND ou EFS estabelece claramente que a noradrenalina não está envolvida neste fenômeno. Sustentado pela descoberta de que a doxasozina a 10 nM não tem capacidade de atuar nas contrações induzidas pela noradrenalina. Nessa concentração, esse antagonista possui a capacidade de inibir as contrações induzidas por 6-ND e EFS.

Os resultados observados com a prazosina podem ser considerados inicialmente como "inconclusivos", pois a uma concentração de 10 nM, a prazosina inibiu as contrações induzidas por 6-ND, mas não afetou as contrações VDEIR induzidas pela noradrenalina e EFS.

Entretanto, é importante observar que a prazosina possui uma afinidade elevada por receptores α_2 -adrenérgicos em roedores, porém uma afinidade reduzida por receptores em não roedores (Bylund, 1985). Além disso, ela demonstra atividade pré-sináptica de bloqueio de α_2 -adrenoceptores no canal deferente de ratos (Sylvester et al., 1983). Dessa forma, a falta de efeito da prazosina a 10 nM nas contrações induzidas por EFS pode ser explicada pela combinação de seus efeitos inibitórios sobre o receptor 6-ND e o receptor α_2 -adrenérgico pré-sináptico.(98)

O Idazoxan (antagonista do receptor α_2 -adrenérgico pré-sináptico) (99) que possui a capacidade de potencializar as contrações eletricamente induzidas do ducto deferente de rato (100). A prazosina a 10 nM possui um efeito inibitório quando utilizada em preparações pré-tratadas com idazoxan nas contrações induzidas por EFS, devido à ação antagonista no receptor 6-ND.

A perda do efeito inibitório de todos os antagonistas α_1 -adrenérgicos nas contrações induzidas por EFS em VDEIR obtidos de animais tratados cronicamente com L-NAME. A síntese de 6-ND está acoplada à síntese de e esse tratamento crônico com L-NAME está associado à redução em cerca de 50% das quantidades de 6-noradrenalina extraídas de suínos e ratos cérebros (27) e, mais importante, com uma redução de 60% das quantidades de 6-ND liberadas dos vasos deferentes isolados de ratos. Assim, ausência do efeito inibitório dos antagonistas α_1 -adrenérgicos nas respostas do SLE poderia ser explicada devido a redução da síntese de 6-ND.

As Observações clínicas na utilização tanto dos antidepressivos tricíclicos (101) quanto dos antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos (102–104) tem como ponto importante o característica de causar distúrbios da ejaculação e, desta maneira também são usados para o tratamento da ejaculação precoce.

Embora a característica multifatorial da ejaculação precoce, o mecanismo farmacológico dos antidepressivos tricíclicos e dos antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos

está razoavelmente estabelecido. Os antidepressivos tricíclicos inibem os transportadores de serotonina (SERT) e noradrenalina (NET), responsáveis pela recaptação de serotonina e noradrenalina, respectivamente causando aumento da serotonina e da noradrenalina na fenda sináptica. (66,105).

Como os antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos também causam retardo na ejaculação e oposto efeito farmacodinâmico causam um paradoxo que sinaliza a possibilidade destas drogas devem estar atuando em sítios diferentes para explicar sua eficiência no tratamento da ejaculação precoce. Os antagonistas α_1 -adrenérgicos podem estar agindo como antagonistas do receptor 6-ND no ducto deferente. Uma vez que os antidepressivos tricíclicos bloqueiam o receptor 6-ND no canal deferente do rato isso estabeleceria um mecanismo periférico comum pelo qual essa classe de compostos causa anormalidades na ejaculação.

Os resultados obtidos após os ensaios funcionais com antidepressivos tricíclicos e antagonistas α_1 -adrenérgicos montaram que eles antagonizam seletivamente as contrações induzidas por 6-ND do vaso deferente isolado de rato o que permite gerar a hipótese de que o 6-ND pode ser o principal mediador periférico do processo de emissão.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados fortalecem o conceito da ação da 6-ND como um modulador endógeno do ducto deferente do rato. O antagonismo do receptor 6-ND por compostos tricíclicos revela um novo mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos. A observação de que os antagonistas α_1 -adrenérgicos atuam como antagonistas dos receptores 6-ND abre a possibilidade de que muitas ações anteriormente atribuídas à noradrenalina possam ser na verdade devidas à presença desse novo mediador 6-ND.

6 REFERÊNCIAS

1. Alexopoulos GS. Mechanisms and treatment of late-life depression. *Transl Psychiatry*. 5 de agosto de 2019;9(1):1–16.
2. Lakatta EG. Catecholamines and cardiovascular function in aging. *Endocrinol Metab Clin North Am*. dezembro de 1987;16(4):877–91.
3. Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem*. 1971;40:465–500.
4. Brooks DJ. Functional imaging studies on dopamine and motor control. *J Neural Transm*. 1º de novembro de 2001;108(11):1283–98.
5. Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*. 1º de maio de 2000;43(5):533–49.
6. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol Rev*. setembro de 2004;56(3):331–49.
7. Nagatsu T. Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neurosci Res*. outubro de 1991;12(2):315–45.
8. Smeets WJ, González A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev*. setembro de 2000;33(2–3):308–79.
9. Gainetdinov RR, Caron MG. Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:261–84.
10. Richter D. CCXLIX. ADRENALINE AND AMINE OXIDASE.
11. Gilsbach R, Hein L. Are the pharmacology and physiology of α_2 adrenoceptors determined by α_2 -heteroreceptors and autoreceptors respectively? *Br J Pharmacol*. janeiro de 2012;165(1):90–102.
12. Kopin IJ, Rundqvist B, Friberg P, Lenders J, Goldstein DS, Eisenhofer G. Different relationships of spillover to release of norepinephrine in human heart, kidneys, and forearm. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1º de julho de 1998;275(1):R165–73.
13. Black JW. Ahlquist and the development of beta-adrenoceptor antagonists. *Postgrad Med J*. 1976;52 Suppl 4:11–3.
14. Ahlquist RP. A STUDY OF THE ADRENOTROPIC RECEPTORS. *Am J Physiol-Leg Content*. 1º de junho de 1948;153(3):586–600.
15. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1º de junho de 1994;46(2):121–36.
16. Hieble JP, Bondinell WE, Ruffolo RR. Alpha- and beta-adrenoceptors: from the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. *J Med Chem*. 1º de setembro de 1995;38(18):3415–44.
17. Carlsson A. Detection and assay of dopamine. *Pharmacol Rev*. junho de 1959;11(2, Part 2):300–4.

18. Costa KM, Schoenbaum G. Dopamine. *Curr Biol*. 8 de agosto de 2022;32(15):R817–24.
19. Hornykiewicz O. The Action of Dopamine on the Arterial Blood Pressure of the Guinea-Pig. *Br J Pharmacol Chemother*. 1958;13(1):91–4.
20. Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci Lond Engl* 1979. junho de 2007;112(12):583–97.
21. Holtz P, Credner K, Strübing C. Dopahyperglykämie. 1º de janeiro de 1944;280(1–2):9–15.
22. Hornykiewicz O. [Dopamine (3-hydroxytyramine) in the central nervous system and its relation to the Parkinson syndrome in man]. *Dtsch Med Wochenschr* 1946. 7 de setembro de 1962;87:1807–10.
23. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. Sibley DR, organizador. *Pharmacol Rev*. março de 2011;63(1):182–217.
24. Sibley DR, Monsma FJ. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci*. janeiro de 1992;13:61–9.
25. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent | SpringerLink [Internet]. [citado 21 de agosto de 2023]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-001-0111-9>
26. Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. Em: Riederer P, Reichmann H, Youdim MBH, Gerlach M, organizadores. *Parkinson's Disease and Related Disorders*. Vienna: Springer; 2006. p. 9–15. (Journal of Neural Transmission. Supplementa).
27. Tsunoda M, Uchino E, Imai K, Hayakawa K, Funatsu T. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. *J Chromatogr A*. 14 de setembro de 2007;1164(1–2):162–6.
28. Chiari A, Li XH, Xu Z, Pan HL, Eisenach JC. Formation of 6-nitro-norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. *Neuroscience*. 2000;101(1):189–96.
29. Shintani F, Kinoshita T, Kanba S, Ishikawa T, Suzuki E, Sasakawa N, et al. Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain. *J Biol Chem*. 7 de junho de 1996;271(23):13561–5.
30. Britto-Júnior J, Jacintho FF, Figueiredo Murari GM, Campos R, Moreno RA, Antunes E, et al. Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels. *Life Sci*. fevereiro de 2020;243:117257.
31. Campos R, Pinheiro DHA, Britto-Júnior J, de Castro HA, Mendes GD, Moraes MO, et al. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from *Chelonoidis carbonaria* aortae in vitro. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 22 de março de 2021;1173:122668.
32. Britto-Júnior J, Pinheiro DHA, Justo AFO, Figueiredo Murari GM, Campos R, Mariano FV, et al. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacol Res Perspect*. agosto de 2020;8(4):e00612.

33. Britto-Júnior J, Fernandes Jacintho F, Campos R, Pinheiro DHA, Figueiredo Murari GM, de Souza VB, et al. The basal release of endothelium-derived catecholamines regulates the contractions of *Chelonoidis carbonaria* aorta caused by electrical-field stimulation. *Biol Open*. 20 de janeiro de 2021;10(1):bio057042.
34. Lima AT, Dos Santos EX, Britto-Júnior J, De Souza VB, Schenka AA, Campos R, et al. Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of *Pantherophis guttatus* aortic rings. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. dezembro de 2022;262:109471.
35. Britto-Júnior J, De Oliveira MG, Dos Reis Gati C, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, et al. 6-NitroDopamine is an endogenous modulator of rat heart chronotropism. *Life Sci*. outubro de 2022;307:120879.
36. Britto-Júnior J, Pereira Do Prado GL, Chiavegatto S, Cunha F, Moraes MO, Elisabete A. Moraes M, et al. The importance of the endothelial nitric oxide synthase on the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated atria and ventricles and their role on chronotropism. *Nitric Oxide*. setembro de 2023;138–139:26–33.
37. De Oliveira LFG, Britto-Júnior J, Lima AT, Moraes MO, Moraes MEA, De Souza VB, et al. Release of 6-nitrodopamine from human popliteal artery and vein. *Life Sci*. agosto de 2023;326:121801.
38. Hamilton DW, Olson GE, Cooper TG. Regional variation in the surface morphology of the epithelium of the rat ductuli efferentes, ductus epididymidis and vas deferens. *Anat Rec*. maio de 1977;188(1):13–27.
39. Hamilton DW, Cooper TG. Gross and histological variations along the length of the rat vas deferens. *Anat Rec*. abril de 1978;190(4):795–809.
40. Kennedy SW, Heidger PM. Fine structural studies of the rat vas deferens. *Anat Rec*. maio de 1979;194(1):159–79.
41. Buvat J. Pathophysiology of Premature Ejaculation. *J Sex Med*. 1º de outubro de 2011;8(Supplement_4):316–27.
42. Waldinger MD, Berendsen HHG, Blok BFM, Olivier B, Holstege G. Premature ejaculation and serotonergic antidepressants-induced delayed ejaculation: the involvement of the serotonergic system. *Behav Brain Res*. maio de 1998;92(2):111–8.
43. Waldinger MD, Zwinderman AH, Olivier B. On-demand treatment of premature ejaculation with clomipramine and paroxetine: a randomized, double-blind fixed-dose study with stopwatch assessment. *Eur Urol*. outubro de 2004;46(4):510–5; discussion 516.
44. Mason MM, Schuppe K, Weber A, Gurayah A, Muthigi A, Ramasamy R. Ejaculation: the Process and Characteristics From Start to Finish. *Curr Sex Health Rep*. 14 de setembro de 2022;15(1):1–9.
45. Alwaal A, Breyer BN, Lue TF. Normal male sexual function: emphasis on orgasm and ejaculation. *Fertil Steril*. novembro de 2015;104(5):1051–60.
46. Giuliano F, Clément P. Physiology of Ejaculation: Emphasis on Serotonergic Control. *Eur Urol*. setembro de 2005;48(3):408–17.
47. Waldinger MD. THE NEUROBIOLOGICAL APPROACH TO PREMATURE EJACULATION.

48. Wu EH, De Cicco FL. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Male Genitourinary Tract. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 17 de agosto de 2023]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562291/>
49. Pereira-Lourenço M, Vieira e Brito D, Pereira BJ. Premature Ejaculation – From Physiology to Treatment. J Fam Reprod Health [Internet]. 25 de dezembro de 2019 [citado 21 de junho de 2023]; Disponível em: <https://publish.kne-publishing.com/index.php/JFRH/article/view/2125>
50. Ver Voort SM. Ejaculatory stimulation in spinal-cord injured men. Urology. 1º de março de 1987;29(3):282–9.
51. Brindley GS, Sauerwein D, Hendry WF. Hypogastric Plexus Stimulators for Obtaining Semen from Paraplegic Men. Br J Urol. julho de 1989;64(1):72–7.
52. Comarr AE. Sexual Function Among Patients with Spinal Cord Injury. Urol Int. 1970;25(2):134–68.
53. Ventura S, Burnstock G. Evidence against nitrergic neuromodulation in the rat vas deferens. Eur J Pharmacol. 3 de setembro de 1997;334(1):87–93.
54. Warner TD, de Nucci G, Vane JR. Comparison of the survival of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. Br J Pharmacol. julho de 1989;97(3):777–82.
55. Bell C, Gillespie J s., Macrae I m. Release of noradrenaline and dopamine by nerve stimulation in the guinea-pig and rat vas deferens. Br J Pharmacol. 1984;81(3):563–9.
56. Celuch SM, Sloley BD. Regional distribution of dopamine, 5-hydroxytryptamine, and noradrenaline in the rat vas deferens. Neurochem Res. outubro de 1988;13(10):967–72.
57. Leedham JA, Pennefather JN. Dopamine acts at the same receptors as noradrenaline in the rat isolated vas deferens. Br J Pharmacol. outubro de 1982;77(2):293–9.
58. Bodelsson G, Stjernquist M. Characterization of contractile adrenoceptors in the human umbilical artery. Eur J Pharmacol. agosto de 1995;282(1–3):95–101.
59. Errasti AE, Velo MPR, Torres RM, Sardi SP, Rothlin RP. Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in human umbilical vein: Human umbilical vein α_1 -adrenoceptor subtypes. Br J Pharmacol. janeiro de 1999;126(2):437–42.
60. Furukawa T, Morishita H. Existence of dopamine D1 receptor on the sympathetic nerve endings in the guinea-pig vas deferens. Eur J Pharmacol. 1º de setembro de 1997;328(2):229–34.
61. Zeng C, Wang D, Yang Z, Wang Z, Asico LD, Wilcox CS, et al. Dopamine D1 receptor augmentation of D3 receptor action in rat aortic or mesenteric vascular smooth muscles. Hypertens Dallas Tex 1979. março de 2004;43(3):673–9.
62. Britto-Júnior J, Coelho-Silva WC, Murari GF, Serpellone Nash CE, Mónica FZ, Antunes E, et al. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. Life Sci. 1º de julho de 2021;276:119425.
63. Arnt J, Skarsfeldt T. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol. fevereiro de 1998;18(2):63–101.

64. Martin PL, Kelly M, Cusack NJ. (-)-2-(N-propyl-N-2-thienylethylamino)-5-hydroxytetralin (N-0923), a selective D2 dopamine receptor agonist demonstrates the presence of D2 dopamine receptors in the mouse vas deferens but not in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther.* dezembro de 1993;267(3):1342–8.
65. Morishita H, Katsuragi T. Existence and pharmacological properties of dopamine D4 receptors in guinea pig vas deferens. *Eur J Pharmacol.* 18 de junho de 1999;374(2):255–61.
66. Feighner JP. Mechanism of Action of Antidepressant Medications. *J Clin Psychiatry.*
67. Nojimoto FD, Mueller A, Hebel-Barbosa F, Akinaga J, Lima V, Kiguti LR de A, et al. The tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline and imipramine are weak antagonists of human and rat α_1B -adrenoceptors. *Neuropharmacology.* 2010;59(1–2):49–57.
68. Sánchez C, Hyttel J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol.* agosto de 1999;19(4):467–89.
69. Millan MJ, Dekeyne A, Papp M, La Rochelle CD, MacSweeney C, Peglioni JL, et al. S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: II. Behavioral profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *J Pharmacol Exp Ther.* agosto de 2001;298(2):581–91.
70. Cusack B, Nelson A, Richelson E. Binding of antidepressants to human brain receptors: Focus on newer generation compounds. *Psychopharmacology (Berl).* 1994;114(4):559–65.
71. Richelson E, Pfenning M. Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. *Eur J Pharmacol.* 17 de setembro de 1984;104(3–4):277–86.
72. Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol.* julho de 2007;151(6):737–48.
73. Vohra MM. A postsynaptic inhibitory histamine H2-receptor in the mouse isolated vas deferens. *Agents Actions.* outubro de 1979;9(4):319–26.
74. Vaishnavi SN, Nemeroff CB, Plott SJ, Rao SG, Kranzler J, Owens MJ. Milnacipran: a comparative analysis of human monoamine uptake and transporter binding affinity. *Biol Psychiatry.* 1º de fevereiro de 2004;55(3):320–2.
75. Dutta AK, Santra S, Harutyunyan A, Das B, Lisieski MJ, Xu L, et al. D-578, an orally active triple monoamine reuptake inhibitor, displays antidepressant and anti-PTSD like effects in rats. *Eur J Pharmacol.* 5 de novembro de 2019;862:172632.
76. Muth EA, Haskins JT, Moyer JA, Husbands GE, Nielsen ST, Sigg EB. Antidepressant biochemical profile of the novel bicyclic compound Wy-45,030, an ethyl cyclohexanol derivative. *Biochem Pharmacol.* 15 de dezembro de 1986;35(24):4493–7.
77. Cheetham SC, Viggers JA, Slater NA, Heal DJ, Buckett WR. [3H]paroxetine binding in rat frontal cortex strongly correlates with [3H]5-HT uptake: effect of administration of various antidepressant treatments. *Neuropharmacology.* agosto de 1993;32(8):737–43.
78. Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol.* 11 de dezembro de 1997;340(2–3):249–58.

79. Mestres J, Seifert SA, Oprea TI. Linking pharmacology to clinical reports: cyclobenzaprine and its possible association with serotonin syndrome. *Clin Pharmacol Ther.* novembro de 2011;90(5):662–5.
80. Kung MP, Essman WD, Frederick D, Meegalla S, Goodman M, Mu M, et al. IPT: A novel iodinated ligand for the CNS dopamine transporter. *Synapse.* agosto de 1995;20(4):316–24.
81. Hay DW, Wadsworth RM. The contractile effects of 5-hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens. *Br J Pharmacol.* dezembro de 1982;77(4):605–13.
82. Karasawa A, Kubo K, Shuto K, Nakamizo N. Interaction of 5-Hydroxytryptamine and Ketanserin in Rat Vas Deferens Subjected to Low Frequency Field Stimulation. *Jpn J Pharmacol.* 1985;37(3):285–91.
83. Wouters W, van Hertrooy JJ, Krekels MD, Laduron PM. Reconstitution of solubilized serotonin-S2 receptors into phospholipid vesicles. *J Recept Res.* 1986;6(3–4):271–82.
84. Janowsky A, Eshleman AJ, Johnson RA, Wolfrum KM, Hinrichs DJ, Yang J, et al. Mefloquine and psychotomimetics share neurotransmitter receptor and transporter interactions in vitro. *Psychopharmacology (Berl).* julho de 2014;231(14):2771–83.
85. Markstein R, Hoyer D, Engel G. 5-HT_{1A}-receptors mediate stimulation of adenylate cyclase in rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* agosto de 1986;333(4):335–41.
86. Knoll J, Somogyi GT, Illés P, Vizi ES. Acetylcholine release from isolated vas deferens of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1972;274(2):198–202.
87. Burnstock G, Holman ME. AN ELECTROPHYSIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE ACTIONS OF SOME AUTONOMIC BLOCKING DRUGS ON TRANSMISSION IN THE GUINEA-PIG VAS DEFERENS. *Br J Pharmacol Chemother.* dezembro de 1964;23(3):600–12.
88. Filser JG, Kaumeier S, Brand T, Schanz H, Terlinden R, Müller WE. Pharmacokinetics of amitriptyline and amitriptylinoxide after intravenous or oral administration in humans. *Pharmacopsychiatry.* 1º de novembro de 1988;21(6):381–3.
89. Kuss HJ, Jungkunz G. Nonlinear pharmacokinetics of chlorimipramine after infusion and oral administration in patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* janeiro de 1986;10(6):739–48.
90. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, et al. Antiepileptic drugs--best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia.* julho de 2008;49(7):1239–76.
91. Rothmore J. Antidepressant-induced sexual dysfunction. *Med J Aust.* 2020;212(7):329–34.
92. Leris A c. a., Stephens J, Hines J e. w., McNicholas T a. Carbamazepine-related ejaculatory failure. *Br J Urol.* 1997;79(3):485–485.
93. Waldinger MD. Drug treatment options for premature ejaculation. *Expert Opin Pharmacother.* julho de 2018;19(10):1077–85.

94. Avellar MCW, Lázari MFM, Porto CS. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. *An Acad Bras Ciênc.* setembro de 2009;81:321–44.
95. Piascik MT, Hrometz SL, Edelmann SE, Guarino RD, Hadley RW, Brown RD. Immunocytochemical localization of the α -1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther.* novembro de 1997;283(2):854–68.
96. Britto-Júnior J, Antunes NJ, Campos R, Sucupira M, Mendes GD, Fernandes F, et al. Determination of dopamine, noradrenaline, and adrenaline in Krebs–Henseleit solution by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and measurement of their basal release from *Chelonoidis carbonaria* aortae in vitro. *Biomed Chromatogr.* 2021;35(2):e4978.
97. Brown DA, Docherty JR, French AM, MacDonald A, McGrath JC, Scott NC. Separation of adrenergic and non-adrenergic contractions to field stimulation in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol.* junho de 1983;79(2):379–93.
98. Bylund DB. Heterogeneity of α -2 adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* maio de 1985;22(5):835–43.
99. Doxey JC, Roach AG, Smith CFC. Studies on RX 781094: a selective, potent and specific antagonist of α -2-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* março de 1983;78(3):489–505.
100. Doxey JC, Roach AG, Samuel J. Effects of desipramine on stimulation-induced contractions of the vas deferens of rats pretreated either chronically with desipramine or acutely with idazoxan. *Clin Sci.* 1º de janeiro de 1985;68(s10):155s–9s.
101. Beaumont G. Sexual Side-Effects of Clomipramine (Anafranil). *J Int Med Res.* julho de 1973;1(5):469–72.
102. Cavallini G. Alpha-1 Blockade Pharmacotherapy in Primitive Psychogenic Premature Ejaculation Resistant to Psychotherapy. *Eur Urol.* 1995;28(2):126–30.
103. Hsieh JT, Liu SP, Hsieh CH, Cheng JT. An in vivo evaluation of the therapeutic potential of sympatholytic agents on premature ejaculation. *BJU Int.* setembro de 1999;84(4):503–6.
104. Debruyne FMJ. Alpha blockers: are all created equal? *Urology.* novembro de 2000;56(5):20–2.
105. López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des.* 2009;15(14):1563–86.

7 APÊNDICES

7.1 CEUA 5557-1/2020

INTRANET IB

https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/_exibe_meu_formu...

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Comissão de Ética no Uso de Animais



Cadastro de Protocolo de Pesquisa para uso de animais em pesquisa	
- Após 01/08/2017 não será mais feito protocolamento inicial de formulários na versão impressa. Os protocolos que forem recebidos no banco de dados da CEUA/UNICAMP serão automaticamente numerados e analisados e somente após aprovação final pela CEUA/UNICAMP deverão ser entregues na versão impressa e assinada pelo docente responsável e pelo executor. Importante: antes do preenchimento do formulário leia atentamente as recomendações da CEUA/UNICAMP disponíveis em http://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_formularios	
Nº protocolo	5557-1/2020
Data de envio à CEUA	21/05/2020
Dados do remetente	
Nome	Gilberto De Nucci
E-mail	gdeoliveira.mariana@gmail.com
1 Prazo	
	Início 01/07/2020 Término 01/07/2022
2 Título do projeto	
Título do projeto	Avaliação farmacológica in vivo e in vitro de dopamina e 6-nitro-dopamina a em ratos Wistar
Área de conhecimento	2.10.00.00-0
3 RESPONSÁVEL	
Matrícula	190446
Nome completo	Gilberto De Nucci
Instituição	Universidade Estadual de Campinas
Unidade	FCM - Faculdade de Ciências Médicas
Departamento / Disciplina	Farmacologia
Experiência prévia	Sim Quanto tempo? 31 anos
Treinamento	Sim Quanto tempo? 31 anos
Vínculo com a instituição	Docente / Pesquisador
Telefone	3521-9555
Localização	Rua Alexandre Flemming 105F, FCM10
E-mail	denucci@gilbertodenucci.com
3.1 Executores	
Nome completo	Mariana Goncalves de Oliveira Taranto
Instituição	Universidade Estadual de Campinas
Nível acadêmico	Doutorado
Experiência prévia (anos)	8 anos
Treinamento (especificar)	Mestrado e Doutorado pela Unicamp. Pós-doutoranda há 3 anos no departamento de Farmacologia
Telefone	3521-9555
E-mail	gdeoliveira.mariana@gmail.com
Nome completo	Felipe Fernandes Jacintho

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil
Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceua>

Instituição	Universidade Estadual de Campinas
Nível acadêmico	Doutorado
Experiência prévia (anos)	3 anos
Treinamento (especificar)	Iniciação científica no Depto de Farmacologia (18 meses) e Doutorado em andamento
Telefone	3521-9555
E-mail	felipe_fernandes@me.com
Nome completo	José Britto Júnior
Instituição	Universidade Estadual de Campinas
Nível acadêmico	Doutorado
Experiência prévia (anos)	3 anos
Treinamento (especificar)	Mestrado trabalhando na área de farmacologia vascular
Telefone	3521-9555
E-mail	josebrittoj@gmail.com
4 Colaboradores	
5 RESUMO DO PROJETO/AULA (Não usar siglas e abreviaturas)	A dopamina possui um perfil farmacodinâmico distinto dependendo da dosagem empregada. Em doses baixas (até 5 µg/kg) possui atividade em receptores dopaminérgicos, exercendo uma atividade de vasodilatadora. Em doses médias (entre 5 e 10 µg/kg/min) possui atividade em receptores β-1 adrenérgicos, exercendo um aumento na contratilidade cardíaca. Em doses acima de 10 µg/kg/min a sua atividade passa a ser predominantemente em receptores α-1 adrenérgicos, aumentando a resistência vascular periférica. Dados ainda não publicados do nosso grupo detectaram a presença de derivados de dopamina no plasma de ratos, incluindo a 6-nitrodopamina. Estudos preliminares em ratos demonstraram que tanto a dopamina quanto a 6-nitro-dopamina apresentam características vasopressoras interessantes, embora, até o momento não se saiba como a 6-nitro-dopamina é formada ou mesmo seu papel fisiopatológico. Ainda, a administração de 6-nitrodopamina in vitro em artérias de ratos e humanos isolados demonstram que a 6-nitro-dopamina pode atuar em receptores diferentes da dopamina, ou até ter uma via de sinalização específica, já que seus efeitos em átrio e artéria isolados são diferentes. In vivo, a infusão de 6-nitrodopamina aumenta substancialmente a frequência cardíaca de ratos anestesiados. Além disso, os efeitos da 6-nitrodopamina são prolongados, em relação a dopamina, o que sugere afinidade e/ou tempo de meia-vida distintos, o que não se sabe até o momento. Estudo feito por um colaborador do ICB-USP/SP mostrou a presença de 6-nitrodopamina no plasma de animais após 2 horas da indução de sepse por injeção de LPS, sugerindo também que este mediador pode ter grande importância cardiovascular em situações patológicas. Nosso grupo de pesquisa busca entender se a 6-nitrodopamina pode ser um importante (e ainda não descrito) mediador cardiovascular que atua de forma diferente da dopamina.
6 Objetivos (na íntegra) (Não usar siglas e abreviaturas)	Teremos quatro objetivos: 1) avaliação das alterações pressóricas e na frequência cardíaca induzidas pela dopamina e 6-nitrodopamina, bem como os mecanismos de ação envolvidos, os quais serão avaliados através do pré-tratamento dos animais com antagonistas/inibidores diversos (L-NAME, haloperidol, SCH23390, metoprolol, reserpina, desipramina); 2) avaliação do perfil hemodinâmico e função cardíaca, incluindo pressão arterial na carótida, pulmonar e aorta; e função cardíaca (volume sistólico, volume diastólico, frequência e contratilidade cardíaca) em ratos tratados com infusão de dopamina ou 6-nitro-dopamina; 3) avaliação do perfil farmacocinético de dopamina e 6-nitrodopamina em ratos; 4) caracterização dos efeitos da dopamina e 6-nitro-dopamina in vitro, utilizando banho de órgão isolados, na presença e ausência de uma série de antagonistas/inibidores (L-NAME, haloperidol, SCH23390, metoprolol, reserpina, desipramina, tiramina, ODQ, risperidona e quetiapina) para caracterização do mecanismo de ação das mesmas.
7 Justificativa	A despeito de haver alguns estudos que avaliaram os efeitos vasopressores e cardíacos da dopamina, muito analisam variáveis distintas e não se aprofundaram no mecanismo de ação de derivados ou metabólitos, dificultando a comparação e a extração de conclusões definitivas. O nosso grupo vem investigando o papel fisiológico e farmacológico das catecolaminas de origem endotelial e, em recente estudo publicado (ANEXO 1), demonstramos, pela primeira vez, que o endotélio modula a contração induzida por estímulo de campo elétrico em aorta de <i>Chelonoidis</i> sp. (jabuti) e essa modulação pode ser mediada por dopamina oriunda do endotélio, destacando este mediador como essencial para o sistema cardiovascular nesta espécie. Dessa forma, queremos continuar a investigar o papel da dopamina e do derivado 6-nitrodopamina, ambos já identificados no plasma de ratos, na fisiologia cardiovascular.

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil
Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea>

8 Relevância	Compreender o papel da dopamina e derivados enquanto mediadores do sistema cardiovascular nos permitirá maior compreensão da fisiologia cardiovascular e, potencialmente, seu envolvimento em condições patológicas.							
9 MODELO ANIMAL								
Espécie ou grupo taxonômico (nome vulgar, se existir)	Rattus norvegicus Exemplo: Roedor, Mus musculus, camundongos. A linhagem é opcional, mas uma vez descrita deve estar em acordo com o item 9.2							
Justificar o uso da espécie animal escolhida	Consideramos a possibilidade de adotar métodos alternativos aos modelos animais e concluímos não estão disponíveis ou são inadequados por razões científicas. Além disso, a referida espécie é amplamente utilizada como modelo para avaliação da função vesical em diferentes condições patológicas e aceita na comunidade científica.							
9.1 PROCEDÊNCIA								
Biotério, fazenda, aviário etc.	Centro Multidisciplinar para Investigação biológica em animais de laboratório							
Localização	R. Cinco de Junho, 230 - Barão Geraldo, Campinas - SP, 13083-877 - CEMIB-UNICAMP							
Animal silvestre	Não							
Outra procedência?	Não							
O animal é geneticamente modificado?	Não							
9.2. Tipo e Característica (É obrigatório o preenchimento de cada grupo separadamente) DEVE SER INFORMADO NOME E LINHAGEM COMPLETA DO ANIMAL: http://www.cemib.unicamp.br/servicos/cadastro_linhagens.php .								
Grupo	Animal	Linhagem	Quantidade			Idade	Peso aprox.	Grau de invasividade
			M	F	Subtotal			
1	Rato heterogênico	HanUnib: WH (Wistar)	48		48	10.00 Semanas	300.00 Gramas	3
	Descrição	Grupo 1: Os animais serão anestesiados para a implantação de cateteres para avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca durante a infusão de DOPAMINA (0,01 a 10 ug/kg) em intervalos de 30 minutos após pré-tratamento com salina ou antagonistas/inibidores (desipramina, haloperidol, L-Name, metoprolol e do antagonista dopaminérgico SCH23390). Será realizada a monitoração durante as infusões e os animais serão eutanaziados ao fim do protocolo. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
2	Rato heterogênico	HanUnib: WH (Wistar)	48		48	10.00 Semanas	300.00 Gramas	3
	Descrição	Grupo 2: Os animais serão anestesiados para a implantação de cateteres para avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca durante a infusão de 6-NITRODOPAMINA (0,01 a 10 ug/kg) em intervalos de 30 minutos após pré-tratamento com salina ou antagonistas/inibidores (desipramina, haloperidol, L-Name, metoprolol e do antagonista dopaminérgico SCH23390). Será realizada a monitoração durante as infusões e os animais serão eutanaziados ao fim do protocolo. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
3	Rato heterogênico	HanUnib: WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	3
	Descrição	Grupo 3: Os animais serão pré-tratados com reserpina intraperitoneal (1x ao dia, por dois dias, 5mg/kg) e em seguida serão anestesiados para a implantação de cateteres para avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca durante a infusão de DOPAMINA (0,01 a 10 ug/kg) em intervalos de 30 minutos. Será realizada a monitoração durante as infusões e os animais serão eutanaziados ao fim do protocolo. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
4	Rato heterogênico	HanUnib: WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	3
	Descrição	Grupo 4: Os animais serão pré-tratados com reserpina intraperitoneal (1x ao dia, por dois dias, 5mg/kg) e em seguida serão anestesiados para a implantação de cateteres para avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca durante a infusão de 6-NITRODOPAMINA (0,01 a 10 ug/kg) em intervalos de 30 minutos. Será realizada a monitoração durante as infusões e os animais serão eutanaziados ao fim do protocolo. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
5	Rato heterogênico	HanUnib: WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	3

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil
Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceua>

	Descrição	Grupo 5: Os animais serão anestesiados, será realizada a toracotomia para a implantação de cateteres para avaliação hemodinâmica e função cardíaca, durante a infusão de DOPAMINA (0,01 a 10 ug/kg) em intervalos de 30 minutos. Será realizada a monitoração hemodinâmica durante as infusões e os animais serão eutanaziados ao fim do protocolo. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
6	Rato heterogêneo	HanUnib:WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	3
	Descrição	Grupo 6: Os animais serão anestesiados, será realizada a toracotomia para a implantação de cateteres para avaliação hemodinâmica e função cardíaca, durante a infusão de 6-NITRODOPAMINA (0,01 a 10 ug/kg) em intervalos de 30 minutos. Será realizada a monitoração hemodinâmica durante as infusões e os animais serão eutanaziados ao fim do protocolo. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
7	Rato heterogêneo	HanUnib:WH (Wistar)	80		80	10.00 Semanas	300.00 Gramas	1
	Descrição	Grupo 7: Os animais serão eutanasiados. O átrio direito, canais deferentes, corpo cavernoso, uretra e aorta torácica serão isolados e montados em banho para órgãos para realização de curvas dose-resposta à DOPAMINA na presença ou ausência de L-NAME, haloperidol, SCH 23390, metoprolol, desipramina, tiramina, ODQ, risperidona e quetiapina. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
8	Rato heterogêneo	HanUnib:WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	1
	Descrição	Grupo 8: Os animais serão pré-tratados com reserpina intraperitoneal (1x ao dia, por dois dias, 5mg/kg) e em seguida serão eutanasiados para isolamento de tecidos. O átrio direito, canais deferentes, corpo cavernoso, uretra e aorta torácica serão isolados e montados em banho para órgãos para realização de curvas dose-resposta à DOPAMINA. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
9	Rato heterogêneo	HanUnib:WH (Wistar)	80		80	10.00 Semanas	300.00 Gramas	1
	Descrição	Grupo 9: Os animais serão eutanasiados. O átrio direito, canais deferentes, corpo cavernoso, uretra e aorta torácica serão isolados e montados em banho para órgãos para realização de curvas dose-resposta à 6-NITRODOPAMINA na presença ou ausência de L-NAME, haloperidol, SCH 23390, metoprolol, desipramina, tiramina, ODQ, risperidona e quetiapina. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
10	Rato heterogêneo	HanUnib:WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	1
	Descrição	Grupo 10: Os animais serão pré-tratados com reserpina intraperitoneal (1x ao dia, por dois dias, 5mg/kg) e em seguida serão eutanasiados para isolamento de tecidos. O átrio direito, canais deferentes, corpo cavernoso, uretra e aorta torácica serão isolados e montados em banho para órgãos para realização de curvas dose-resposta à 6-NITRODOPAMINA. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
11	Rato heterogêneo	HanUnib:WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	1
	Descrição	Grupo 11: Os animais serão eutanasiados. Canais deferentes, corpo cavernoso e uretra serão isolados e montados em banho para órgãos para realização de curvas frequência-resposta por estimulação elétrica (EFS) na presença ou ausência de DOPAMINA. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
12	Rato heterogêneo	HanUnib:WH (Wistar)	8		8	10.00 Semanas	300.00 Gramas	1
	Descrição	Grupo 12: Os animais serão eutanasiados. Canais deferentes, corpo cavernoso e uretra serão isolados e montados em banho para órgãos para realização de curvas frequência-resposta por estimulação elétrica (EFS) na presença ou ausência de 6-NITRODOPAMINA. DESCRIÇÃO COMPLETA DO PROCEDIMENTO NO ITEM 13-RESUMO.						
			Total Machos		Total Fêmeas		Total Geral	
			320		0		320	
9.3 MÉTODOS DE CAPTURA (somente em caso de uso de animais silvestres)		—						
9.4 Planejamento estatístico/delineamento experimental		Os dados serão apresentados como média ± erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n) de 8 animais por grupo para cada experimento. Para o cálculo do número de animais foi utilizada a seguinte fórmula: $n = 1 + [2C^*(s/d)^2]$, onde consideramos um desvio padrão aceitável de 15% e uma diferença aceitável entre os grupos de 20% (por experiência prévia e resultados preliminares do grupo de pesquisa) um poder de teste de 90% e nível de significância 0,05 (indicado para experimentos na área biológica), portanto: $n = 1 + [2$						

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil
Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceua>

	x 10,51 x (0,15/0,2)2] resultando em n = 8,8, que aproximamos para 8. A análise estatística será realizada através do teste de análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de Tukey, para as comparações múltiplas entre 3 grupos ou mais. Para a comparação entre dois grupos, será usado o teste "t" de STUDENT não pareado. O programa Instat (GraphPad Software) será usado para estas análises.	
9.5 GRAU DE INVASIVIDADE*	3	
Os materiais biológicos destes exemplares serão usados em outros projetos? Quais? Se já aprovados pela CEUA, mencionar o número do protocolo.	Não	
9.6 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS	Serão mantidos três animais por gaiola para ratos, feita de polipropileno, dimensões 41x34x18cm. As gaiolas serão forradas com maravalha. Água filtrada será fornecida à vontade em bebedouro específico para roedores. Ração padrão Nuvilab será fornecida à vontade. Os animais serão mantidos em biotério específico para ratos. As gaiolas serão alocadas em estantes ventiladas com temperatura controlada a 23°C, umidade controlada a 55%, e ciclos de claro/escuro com duração de 12 horas cada.	
Local onde será mantido o animal Biotério, fazenda, aviário, etc. Localização	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP	
Ambiente de alojamento	Gaiola	
Número de Animais por gaiola/galpão	3	
Tipo de cama (maravalha, estrado ou outro)	Maravalha	
10 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO PROJETO		
10.1. ESTRESSE/DOR INTENCIONAL NOS ANIMAIS	Não	
10.2 Uso de Fármacos Anestésicos	Sim	
Fármaco	Dose (UI ou mg/kg) (DEVE SER INDICADA A DOSE E NÃO O INTERVALO)	Via de administração
Lidocaina	7 mg/kg	intraperitoneal
Tiopental sódico	40 mg/kg	intraperitoneal
10.3 Uso de Relaxante Muscular	Não	
10.4 Uso de Fármacos Analgésicos	Não	
Justifique em caso negativo	O animal permanecerá anestesiado adequadamente durante todo o procedimento, sem haver necessidade de analgésicos.	
10.5 Imobilização do Animal	Não	
10.6 Condições Alimentares		
Jejum	Não	
Restrição hídrica	Não	
10.7 Cirurgia	Única - Única - implantação de catéteres para avaliação de pressão arterial (carótida, aorta, pulmonar) e função cardíaca (atrio, ventrículo), infusão intravenosa de drogas e coleta de sangue	
10.8. Pós-OPERATÓRIO		
10.8.1 OBSERVAÇÃO DA RECUPERAÇÃO	Não	

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil
Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceua>

INTRANET IB

https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/_exibe_meu_formu...

10.8.2 USO DE ANALGESIA	Não
Justificar o NÃO-uso de analgesia pós-operatório	O animal permanecerá anestesiado adequadamente durante todo o procedimento, sem haver necessidade de analgésicos. Será realizada a eutanásia no fim do procedimento.
10.8.3 OUTROS CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	Não
10.9. EXPOSIÇÃO / INOCULAÇÃO / ADMINISTRAÇÃO	Sim

Fármaco/Outros	Via de administração	Dose (indicar unidades)	Frequência
dopamina	intravenosa	0.01, 0,03, 0.1, 0.3, 1, 3 e 10 ug/kg	doses crescente, uma dose em intervalos de 30 minutos
6-nitrodopamina	intravenosa	0.01, 0,03, 0.1, 0.3, 1, 3 e 10 ug/kg	doses crescente, uma dose em intervalos de 30 minutos
L-NAME	intravenosa	100 mg/kg	dose unica
reserpina	intraperitoneal	5 mg/kg	duas doses em intervalos de 24 horas
desipramina	intravenosa	1 mg/kg	dose unica
haloperidol	intravenosa	5 mg/kg	dose unica
SCH23390	intravenosa	1 mg/kg	dose unica
metoprolol	intravenosa	3 mg/kg	dose unica

11 EXTRAÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS	Sim
--	-----

Material biológico	Quantidade da amostra	Frequência	Método de coleta
atrio direito	todo o atrio	unica vez	isolamento de tecido
canal deferente	todo o canal, direito e esquerdo	unica vez	isolamento de tecido
corpo cavernoso	todo o tecido, direito e esquerdo	unica vez	isolamento de tecido
uretra	todo o tecido	unica vez	isolamento de tecido
aorta torácica	10 mm	unica vez	isolamento de tecido
sangue	2-10 ml	unica vez	cateter intravenoso (veia jugular)

12 FINALIZAÇÃO	
12.1 MÉTODO DE EUTANÁSIA	Descrição Métodos de eutanásia diferentes serão adotados de acordo com o procedimento. Após in vivo: sobredosagem de anestésico por via intravenosa. Para in vitro: camara com isoflurano 100% (overdose), via inalatória Substância, dose, via (A dose do agente injetável deve ser no mínimo três vezes maior que a dose indutora utilizada no plano anestésico.) Após in vivo: injeção intravenosa de tiopental sódico >100 mg/kg (dose 4x superior a de anestesia). Para o isolamento de tecidos: Isoflurano 100% (overdose), via inalatória Caso método restrito (uso exclusivo de decapitação, deslocamento cervical ou CO2), justifique (referência bibliográfica para o não uso de anestésicos) não se aplica
12.2 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS O EXPERIMENTO	Conicionados em saco branco de risco biológico e congelados a -20 °C seguindo as determinações da Anvisa
12.3. Forma de descarte da carcaça	O descarte é coletado por empresa terceirizada e a desativação dos agentes biológicos feita por microondas.
13 RESUMO DO PROCEDIMENTO (relatar todos os procedimentos com os animais)	Os animais serão recebidos do CEMIB e mantidos no biotério da Farmacologia, nas condições adequadas, até atingirem 10 semanas de idade. SOBRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS: Os animais serão então divididos em grupos de acordo com os procedimentos que serão realizados:

CEUA/UNICAMP
 Caixa Postal 6109
 13083-970 Campinas, SP - Brasil
 Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
 Telefax: (19) 3289-3124
 E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceua>

GRUPOS 1, 2, 3, 4: Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca in vivo em animais tratados com DOPAMINA e 6-NITRODOPAMINA, pré-tratados ou não com reserpina.

GRUPOS 5 e 6: Avaliação hemodinâmica e da função cardíaca in vivo em animais tratados com DOPAMINA e 6-NITRODOPAMINA.

GRUPOS 7, 8, 9, 10, 11 e 12: Avaliação funcional in vitro dos efeitos da DOPAMINA e 6-NITRODOPAMINA, utilizando curvas concentração- ou frequência-resposta em tecidos isolados (átrio, canal deferente, uretra, aorta torácica, corpo cavernoso), construídas na presença ou ausência de uma série de antagonistas e inibidores a fim de esclarecer o mecanismo de ação de ambas, DOPAMINA e 6-NITRODOPAMINA.

SOBRE O DELINEAMENTO ESTATÍSTICO:

Serão realizados protocolos experimentais distintos onde serão necessários 8 animais por grupo. Para o cálculo do número de animais foi utilizada a seguinte fórmula: $n = 1 + [2C \cdot (s/d)^2]$, onde consideramos um desvio padrão aceitável de 15% e uma diferença aceitável entre os grupos de 20% (por experiência prévia e resultados preliminares do grupo de pesquisa) um poder de teste de 90% e nível de significância 0,05 (indicado para experimentos na área biológica), portanto: $n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,15/0,2)^2]$ resultando em $n = 8,8$, que aproximamos para 8. A análise estatística será realizada através do teste de análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de Tukey, para as comparações múltiplas entre 3 grupos. Para a comparação entre dois grupos, será usado o teste "t" de STUDENT não pareado. O programa Instat (GraphPad Software) será usado para estas análises. Os dados serão apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n) de 6 animais por grupo para cada experimento.

SOBRE O GRAU DE INVASIVIDADE: Os procedimentos in vivo com animais anestesiados são classificados como G.I 3. Os procedimentos in vitro que envolvem a eutanásia dos animais e isolamento dos tecidos são classificados como G.I. 1.

SOBRE O PROCEDIMENTO ANESTÉSICO PARA OS EXPERIMENTOS IN VIVO: Será realizada administração intraperitoneal de lidocaína 7 mg/kg para indução de anestesia e redução de dor 10 minutos antes da aplicação intraperitoneal de tiopental 40 mg/kg (solução a 1.25% em salina). Apenas após constatação de plano anestésico adequado os procedimentos poderão ser realizados. Apenas após constatação de plano anestésico adequado os procedimentos poderão ser realizados. O animal será submetido a intubação traqueal e mantido em respiração controlada através de respirador mecânico. Uma manta aquecedora será utilizada para manutenção da temperatura do animal.

Os procedimentos experimentais completos estão descritos abaixo:

PARA AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA IN VIVO

Após verificação de plano anestésico adequado, o animal será colocado em mesa cirúrgica, posicionado em decúbito lateral, e será realizada assepsia com iodo povidine. Será realizada uma incisão cervical mediana a artéria carótida será exposta e caracterizada utilizando um cateter específico para avaliação de pressão preenchido com solução salina. O cateter será fixado através de sutura com fio de algodão 3.0. Após período de estabilização de 1 hora, os animais serão pré-tratados por via intravenosa (cateter na veia jugular) com salina (2 ml/kg), L-NAME (100mg/kg), desipramina (1mg/kg), haloperidol (5mg/kg), SCH23390 (1mg/kg) e metoprolol (3mg/kg).

Adicionalmente, utilizaremos animais que serão pré-tratados com reserpina inibidor do transportador de monoaminas, VMAT). A reserpina (5mg/kg) será administrada por via intraperitoneal, 1 vez ao dia, durante dois dias, no mesmo horário.

Após o pré-tratamento e estabilização por 30 minutos, os animais serão tratados de acordo com os seguintes grupos:

GRUPO DOPAMINA (n = 8): receberá infusão intravenosa de DOPAMINA, em doses crescentes (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 e 10 ug/kg)

GRUPO NITRODOPAMINA (n = 8): receberá infusão intravenosa de NITRODOPAMINA, em doses crescentes (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 e 10 ug/kg)

As doses serão administradas durante 20 minutos, utilizando bomba de infusão e um cateter acoplado a veia jugular direita, e com intervalos de 10 minutos entre as doses. Ao fim do procedimento será realizada a coleta de sangue (2 ml) para obtenção de plasma para avaliação do perfil farmacocinético de cada droga utilizando HPLC.

Ao fim do protocolo os animais serão eutanasiados através de injeção intravenosa de tiopental sódico > 100 mg/kg (dose 4x superior a de anestesia) e, após, injeção intravenosa de cloreto de potássio 19,1%. Observação

	e avaliação até ausência de sinais vitais. PARA AVALIAÇÃO DA HEMODINÂMICA E FUNÇÃO CARDÍACA IN VIVO A monitorização hemodinâmica constitui no registro da pressão arterial sistólica, diastólica e média, pressões hemodinâmicas centrais, através da inserção de um cateter nos átrios direito e esquerdo, na artéria pulmonar e na aorta. Com o animal adequadamente anestesiado, o animal será colocado em mesa cirúrgica, posicionado em decubito lateral, e será realizada assepsia com iodo povidine. Utilizando técnica cirúrgica e materiais estéreis, será realizada uma toracotomia lateral esquerda no quinto espaço intercostal esquerdo. Será inserida uma cânula de drenagem no átrio direito e esquerdo através de sutura em bolsa e outra cânula de infusão na aorta descendente e artéria pulmonar através de sutura término-lateral. Os cateteres serão inseridos, será realizada a completa retirada de ar e o início de seu funcionamento. Serão então realizadas as seguintes medidas hemodinâmicas: frequência cardíaca, pressão arterial sistêmica, pressão de átrio esquerdo, pressão de artéria pulmonar, pressão de átrio direito, débito cardíaco e fluxo do dispositivo. Após período de estabilização de 30 minutos, os animais serão tratados de acordo com os seguintes grupos: GRUPO DOPAMINA (n = 8): receberá infusão intravenosa de DOPAMINA, em doses crescentes (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 e 10 ug/kg) GRUPO NITRODOPAMINA (n = 8): receberá infusão intravenosa de NITRODOPAMINA, em doses crescentes (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 e 10 ug/kg) As doses serão administradas durante 20 minutos, utilizando bomba de infusão e um cateter acoplado a veia jugular direita, e com intervalos de 10 minutos entre as doses. Ao fim do protocolo os animais serão eutanasiados através de injeção intravenosa de tiopental sódico > 100 mg/kg (dose 4x superior a de anestesia). Observação e avaliação até ausência de sinais vitais. PARA AVALIAÇÃO FUNCIONAL IN VITRO Os animais serão eutanasiados por aprofundamento de anestesia com isoflurano (dose 5x maior que a necessária para indução da anestesia). Após constatação da ausência de sinais vitais os tecidos serão isolados: Átrio direito, Aorta torácica, Canal deferente, Corpo cavernoso e Uretra prostática. Os tecidos serão montados em banho para órgãos isolados (5-10 mL), preenchido de solução de Krebs-Henseilet (117 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃ e 11 mM Glicose, pH 7,4), gasificadas continuamente com mistura carbogênica (5% CO₂ e 95% de O₂) e com temperatura controlada à 37 °C. Cada átrio/strip/anel de tecido será acoplada a um transdutor de força, sob tensão inicial de 2-10 mN (dependendo do tecido), e a um sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados. Após o período de estabilização de 1 hora, realizaremos curvas concentração-resposta à DOPAMINA ou 6-NITRODOPAMINA, na presença de L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico - NO), haloperidol (antagonistas não seletivo de receptor de dopamina pós-sinápticos), SCH 23390 (antagonista seletivo de receptor D1 de dopamina), metoprolol (antagonists seletivo de receptores beta-1), reserpina (inibidor do transportador vesicular de monoaminas - VMAT), desipramina (bloqueador seletivo para recaptação da noradrenalina nas sinapses neurais - MONET), tiramina (derivado do aminoácido tirosina, e participa da produção de catecolaminas), ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel), risperidona (antagonista de receptor de dopamina D2) e quetiapina (antagonista de receptor de dopamina D2). Para avaliação da contração induzida por estimulação elétrica de campo, os tecidos serão montados entre dois eletrodos de platina dispostos de forma paralela e conectados a um estimulador S88 (Grass Telefactor; Rodhe Island, EUA). Os tecidos serão incubados com DOPAMINA ou 6-NITRODOPAMINA e após 30 minutos estimulados eletricamente a uma voltagem de 60V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo (ms), intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, duração de estimulação de 10 segundos, nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz, com intervalo de 2 minutos entre os estímulos. DESCARTE: Os animais serão acondicionados em saco branco de risco biológico e congelados a -20 °C seguindo as determinações da Anvisa. O descarte é coletado por empresa terceirizada e a desativação dos agentes biológicos feita por microondas.
Arquivos	
Referência bibliográfica: Somente PDF	Endothelium modulates electrical field stimulation-induced contractions of.pdf
Referência bibliográfica 2: Somente PDF	22-04-03(1).pdf
Aprovação CIBio: Somente PDF	

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil
Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea>

Aprovação SISBIO: Somente PDF	
Certificado de curso básicos de legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório: Somente PDF	Certificado curso CEUA(1)-mesclado.pdf

14. TERMO DE RESPONSABILIDADE (LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)

☒ Li e cumprirei o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;

☒ Declaro que este protocolo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;

☒ Declaro que não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto;

☒ Assumo, sob pena de lei, total responsabilidade pela veracidade das informações prestadas neste protocolo;

☒ Assumo as responsabilidades civis e criminais se os procedimentos descritos neste protocolo não forem seguidos.

☒ Declaro estar ciente de que o ponto final humanitário é o momento no qual a dor, desconforto ou distresse de um animal utilizado é evitado, terminado, minimizado ou reduzido por ações como:

i) adoção de tratamento para aliviar a dor, o desconforto ou o distresse;

ii) interrupção de um procedimento doloroso;

iii) exclusão do animal do estudo; ou

iv) morte humanitária do animal (RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 30, DE 2 DE FEVEREIRO DE 2016 - CONCEA);

e me comprometo a agir imediatamente após receber instruções para aliviar a dor ou o distresse, conforme as determinações da legislação vigente.

Eu, Gilberto De Nucci (Gilberto De Nucci), certifico que:

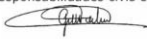
a) li o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;

b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;

c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto;

d) assumo, sob pena de lei, total responsabilidade pela veracidade das informações prestadas neste protocolo;

e) assumo as responsabilidades civis e criminais se os procedimentos descritos neste protocolo não forem seguidos.

Assinatura:  (responsável)

Data: 21 / 06 / 2020

Eu, Mariana Gonçalves de Oliveira Taranto (Mariana Gonçalves de Oliveira Taranto), certifico que:

a) li o disposto na Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;

b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;

c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto;

d) assumo, sob pena de lei, total responsabilidade pela veracidade das informações prestadas neste protocolo;

e) assumo as responsabilidades civis e criminais se os procedimentos descritos neste protocolo não forem seguidos.

Assinatura: Mariana Taranto (executor) Data: 21 / 06 / 2020

Eu, Felipe Fernandes Jacintho (Felipe Fernandes Jacintho), certifico que:

a) li o disposto na Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;

b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;

c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto;

INTRANET IB

https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/_exibe_meu_formu...

d) assumo, sob pena de lei, total responsabilidade pela veracidade das informações prestadas neste protocolo; e) assumo as responsabilidades civis e criminais se os procedimentos descritos neste protocolo não forem seguidos. Assinatura: <u>Felipe F. Jacintho</u> (executor) Data: <u>21</u> / <u>06</u> / <u>2020</u>
Eu, <u>José Britto Junior</u> (José Britto Júnior), certifico que: a) li o disposto na Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA; b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo; c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto; d) assumo, sob pena de lei, total responsabilidade pela veracidade das informações prestadas neste protocolo; e) assumo as responsabilidades civis e criminais se os procedimentos descritos neste protocolo não forem seguidos. Assinatura: <u>José Britto Junior</u> (executor) Data: <u>21</u> / <u>06</u> / <u>2020</u>
O projeto de pesquisa e/ou ensino poderá ser solicitado, a critério da CEUA, respeitando-se os quesitos de confidencialidade e conflito de interesses. Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

CEUA/UNICAMP
 Caixa Postal 6109
 13083-970 Campinas, SP - Brasil
 Protocolo: 5557-1/2020

Telefone: (19) 3521-6359
 Telefax: (19) 3289-3124
 E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea>

7.2 Autorização da Revista

Terms and Conditions of Sale and Purchase

These Terms and Conditions of Sale and Purchase ("Terms") set forth the terms and conditions governing the purchase of products and services from Elsevier B.V. and/or its affiliated Elsevier company Elsevier Ltd ("Elsevier") through its web site at <https://authors.elsevier.com> ("Site"). By submitting an order for such products or services, you agree to be bound by these Purchase Terms.

Address

Elsevier B.V. Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, registered at the Chamber of Commerce Amsterdam, nr. 33158992

Contract Formation

If you wish to purchase any of the products or services offered on this Site, you must submit a completed order form. You will be required to select your products, services or digital content for purchase and complete your delivery and payment details. Once these have been completed, you will have a further chance to check (and correct if necessary) these details prior to submission of your order, and you should print out this page and a copy of these Terms for your future reference.

If we accept your order, you will be sent a confirmation email giving you an order reference number ("Email Confirmation"). Once we have sent this E-mail Confirmation, you will not be able to amend or cancel your order (subject to any right to cancel as described below).

We may correct any error in any unconfirmed order, marketing literature or other document or information issued by us or placed on this Site without any liability.

Right to Cancel

Save as set out below, consumers in the European Union have the right to cancel the purchase until fourteen (14) days after date of delivery of the product or date the service was purchased by sending written notice of cancellation by email to the Site's customer service department. A model cancellation form is available below for your use but you are not obliged to use this method of cancellation.

This right of cancellation applies to all products and services offered on the Site except:

(a) audio, video, and software products that have been unsealed from their packaging;

(b) digital content not on a tangible medium (e.g. eBooks) once the item has been downloaded;

(c) newspapers, periodicals and magazines which are not supplied under subscription contracts;

(d) services for which performance has completed; and

(e) offprints, colour figures, print on demand services and other products made or services provided to your specification or clearly bespoke to you.

If you cancel the purchase on this basis, we will reimburse to you all payments received from you, including the costs of delivery (except for the additional costs arising if you choose a type of delivery other than the least expensive type of standard delivery offered by us). We may make a deduction from the reimbursement for loss in value of any goods supplied, if the loss is the result of unnecessary handling by you.

Returns

You must return the goods without undue delay and in any event no later than 14 days from the date of notification of cancellation. We will then make the reimbursement without undue delay, and no later than-

- (a) 14 days after the day we receive back from you any goods supplied, or
- (b) (if earlier) 14 days after the day you provide evidence that you have returned the goods, or
- (c) If there were no (physical) goods supplied, 14 days after the day on which we are informed about your decision to cancel the purchase.

We will make the reimbursement using the same means of payment as you used for the initial transaction, unless you have expressly agreed otherwise; in any event, you will not incur any fees as a result of the reimbursement.

Whether these rights of cancellation apply or not, you will be responsible for and will pay the cost of returning the items to us by the same method as it was delivered. The items will be returned at your risk.

Prices (including taxes and delivery) and Payment

The currency and price of products and services offered on this Site shall be that quoted on the Site on the date you place your order. While we make every effort to ensure that prices quoted on the Site are accurate, if there has been an inadvertent error, the correct price will be stated in the E-mail Confirmation and you will have the opportunity to withdraw from the order at that stage if the correct price is higher than that quoted and you are not happy with that higher price.

All prices are exclusive of the cost of postage, packaging and delivery and any applicable Value Added Tax or other sales tax, which will be separately stated on the Site and/or the Email Confirmation.

Delivery/Performance

Where applicable, products ordered will be delivered to the shipping address stated in your order, subject to any geographical restrictions stated on the Site. However, the time and method of delivery of products or performance of services will be at our discretion, unless otherwise specified and accepted as part of the order. Time for delivery or performance shall not be of the essence.

If the items delivered to you do not include all of the items that you ordered in any particular order or include incorrect items, you must inform us in writing as soon as possible. In any event, our liability is limited to the price of the items not delivered or the cost of replacing such items.

Consumer Protection

If you are a consumer, your statutory rights as a consumer are not affected by these Purchase Terms, and nothing in these Purchase Terms shall exclude or limit our liability arising by virtue of consumer protection legislation, or our liability for fraud or for death or personal injury caused by our negligence, or any other liability to the extent that we cannot so exclude or limit such liability as a matter of law.

Complaints

If you have any questions, comments or complaints regarding these Purchase Terms or your order, please contact our Customer Services Department which is located at:

Author Support

Elsevier Ltd
The Boulevard
Langford Lane
Kidlington
Oxford
OX5 1GB
United Kingdom

[Contact us](#) via our Support Center

<https://service.elsevier.com>

Phone: +44 1865 84 3577

Model Cancellation Form

To: [Author Support](#)

Subject: Cancellation of order for [article_reference].

Or, when sending this by post:

Author Support

Elsevier Ltd
The Boulevard, Langford Lane
Kidlington
Oxford
OX5 1GB
United Kingdom

Dear Sir, Madam,

I hereby give notice that I cancel my contract [DELETE AS APPLICABLE: [of sale of the following goods/for the supply of the following service].

Goods/Service:

Ordered on:

Received on:

Name of consumer:

Address of consumer:

Signature of consumer:

Date:

General

In the event of any inconsistency between these Terms and the Terms and Conditions of the Site, these Terms shall prevail.

Last revised: 19th January 2022

Copyright © 2022 Elsevier B.V. All rights reserved. [Privacy Policy](#) [Terms & Conditions](#)
[Help](#)

Terms and Conditions of Sale and Purchase

These Terms and Conditions of Sale and Purchase ("Terms") set forth the terms and conditions governing the purchase of products and services from Elsevier B.V. and/or its affiliated Elsevier company Elsevier Ltd ("Elsevier") through its web site at <https://authors.elsevier.com> ("Site"). By submitting an order for such products or services, you agree to be bound by these Purchase Terms.

Address

Elsevier B.V. Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, registered at the Chamber of Commerce Amsterdam, nr. 33158992

Contract Formation

If you wish to purchase any of the products or services offered on this Site, you must submit a completed order form. You will be required to select your products, services or digital content for purchase and complete your delivery and payment details. Once these have been completed, you will have a further chance to check (and correct if necessary) these details prior to submission of your order, and you should print out this page and a copy of these Terms for your future reference.

If we accept your order, you will be sent a confirmation email giving you an order reference number ("Email Confirmation"). Once we have sent this E-mail Confirmation, you will not be able to amend or cancel your order (subject to any right to cancel as described below).

We may correct any error in any unconfirmed order, marketing literature or other document or information issued by us or placed on this Site without any liability.

Right to Cancel

Save as set out below, consumers in the European Union have the right to cancel the purchase until fourteen (14) days after date of delivery of the product or date the service was purchased by sending written notice of cancellation by email to the Site's customer service department. A model cancellation form is available below for your use but you are not obliged to use this method of cancellation.

This right of cancellation applies to all products and services offered on the Site except:

- (a) audio, video, and software products that have been unsealed from their packaging;
- (b) digital content not on a tangible medium (e.g. eBooks) once the item has been downloaded;
- (c) newspapers, periodicals and magazines which are not supplied under subscription contracts;
- (d) services for which performance has completed; and
- (e) offprints, colour figures, print on demand services and other products made or services provided to your specification or clearly bespoke to you.

If you cancel the purchase on this basis, we will reimburse to you all payments received from you, including the costs of delivery (except for the additional costs arising if you choose a type of delivery other than the least expensive type of standard delivery offered by us). We may make a deduction from the reimbursement for loss in value of any goods supplied, if the loss is the result of unnecessary handling by you.

Returns

You must return the goods without undue delay and in any event no later than 14 days from the date of notification of cancellation. We will then make the reimbursement without undue delay, and no later than-

- (a) 14 days after the day we receive back from you any goods supplied, or
- (b) (if earlier) 14 days after the day you provide evidence that you have returned the goods, or
- (c) If there were no (physical) goods supplied, 14 days after the day on which we are informed about your decision to cancel the purchase.

We will make the reimbursement using the same means of payment as you used for the initial transaction, unless you have expressly agreed otherwise; in any event, you will not incur any fees as a result of the reimbursement.

Whether these rights of cancellation apply or not, you will be responsible for and will pay the cost of returning the items to us by the same method as it was delivered. The items will be returned at your risk.

Prices (including taxes and delivery) and Payment

The currency and price of products and services offered on this Site shall be that quoted on the Site on the date you place your order. While we make every effort to ensure that prices quoted on the Site are accurate, if there has been an inadvertent error, the correct price will be stated in the E-mail Confirmation and you will have the opportunity to withdraw from the order at that stage if the correct price is higher than that quoted and you are not happy with that higher price.

All prices are exclusive of the cost of postage, packaging and delivery and any applicable Value Added Tax or other sales tax, which will be separately stated on the Site and/or the Email Confirmation.

Delivery/Performance

Where applicable, products ordered will be delivered to the shipping address stated in your order, subject to any geographical restrictions stated on the Site. However, the time and method of delivery of products or performance of services will be at our discretion, unless otherwise specified and accepted as part of the order. Time for delivery or performance shall not be of the essence.

If the items delivered to you do not include all of the items that you ordered in any particular order or include incorrect items, you must inform us in writing as soon as possible. In any event, our liability is limited to the price of the items not delivered or the cost of replacing such items.

Consumer Protection

If you are a consumer, your statutory rights as a consumer are not affected by these Purchase Terms, and nothing in these Purchase Terms shall exclude or limit our liability arising by virtue of consumer protection legislation, or our liability for fraud or for death or personal injury caused by our negligence, or any other liability to the extent that we cannot so exclude or limit such liability as a matter of law.

Complaints

If you have any questions, comments or complaints regarding these Purchase Terms or your order, please contact our Customer Services Department which is located at:

Author Support
Elsevier Ltd
The Boulevard
Langford Lane
Kidlington
Oxford
OX5 1GB
United Kingdom

[Contact us](#) via our Support Center

<https://service.elsevier.com>

Phone: +44 1865 84 3577

Model Cancellation Form

To: [Author Support](#)

Subject: Cancellation of order for [article_reference].

Or, when sending this by post:

Author Support
Elsevier Ltd
The Boulevard, Langford Lane
Kidlington
Oxford
OX5 1GB
United Kingdom

Dear Sir, Madam,

I hereby give notice that I cancel my contract [DELETE AS APPLICABLE: [of sale of the following goods/for the supply of the following service]].

Goods/Service:

Ordered on:

Received on:

Name of consumer:

Address of consumer:

Signature of consumer:

Date:

General

In the event of any inconsistency between these Terms and the Terms and Conditions of the Site, these Terms shall prevail.

Last revised: 19th January 2022

Copyright © 2022 Elsevier B.V. All rights reserved. [Privacy Policy](#) [Terms & Conditions](#)
[Help](#)



Wolters Kluwer

**PD62-12 6-NITRODOPAMINE IS RELEASED BY RAT ISOLATED
VAS DEFERENS AND MODULATES ITS CONTRACTILITY**

Author: Luiz Eduardo Ximenes, José Britto-Júnior, Walter Silva-Filho, et al

Publication: Journal of Urology

Publisher: Wolters Kluwer Health, Inc.

Date: Sep 1, 2021

Copyright © 2021, © 2021 by American Urological Association Education and Research, Inc.

License Not Required

Wolters Kluwer policy permits only the final peer-reviewed manuscript of the article to be reused in a thesis. You are free to use the final peer-reviewed manuscript in your print thesis at this time, and in your electronic thesis 12 months after the article's publication date. The manuscript may only appear in your electronic thesis if it will be password protected. Please see our Author Guidelines here: https://cdn-tp2.mozu.com/16833-m1/cms/files/Author-Document.pdf?_mzts=636410951730000000.

BACK

CLOSE WINDOW