



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

SAMUEL GOULART NACÁCIO E SILVA

**O PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL NA SÍNTESE DA 6 –
NITRODOPAMINA EM DUCTOS DEFERENTES ISOLADOS DE CAMUNDONGOS**

CAMPINAS

2024

SAMUEL GOULART NACÁCIO E SILVA

**O PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL NA SÍNTESE DA 6 –
NITRODOPAMINA EM DUCTOS DEFERENTES DE CAMUNDONGOS**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI
COORIENTADOR: JOSÉ BRITTO JÚNIOR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO SAMUEL GOULART NACÁCIO E SILVA,
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

Si38p Silva, Samuel Goulart Nacácio e, 1991-
O papel da óxido nítrico sintase neuronal na síntese da 6-nitrodopamina em ductos deferentes de camundongos / Samuel Goulart Nacácio e Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Gilberto de Nucci.
Coorientador: José Britto Júnior.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Dopamina. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Britto Júnior, José, 1991-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: The role of neuronal nitric oxide synthase in the synthesis of 6-nitrodopamine in vas deferens of mice

Palavras-chave em inglês:

Dopamine

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]

Marcelo Nicolás Muscará

Fabíola Taufic Mônica Iglesias

Data de defesa: 29-04-2024

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9780-0535>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/3151094895346514>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

SAMUEL GOULART NACÁCIO E SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

COORIENTADOR: JOSÉ BRITTO JÚNIOR

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

2. PROFA. DRA. FABIOLA TAUFIC MÔNICA IGLESIAS

3. PROF. DR. MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ

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: 29/04/2024

Dedico este trabalho a minha família: Vânia,
Paulo Marcos, Raphaela e Jéssica.

AGRADECIMENTOS

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

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

Agradeço ao Prof. Dr. José Britto Júnior por acreditar me ajudar durante toda a realização do mestrado.

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

Agradeço ao CNPq por ter fornecido a bolsa que propiciou a realização desse trabalho.

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

Winston Churchill

RESUMO

As catecolaminas são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura um grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno) ligado por uma ponte de etil a um grupo de amina. As catecolaminas são presentes no sistema nervoso simpático periférico, na medula adrenal, e são distribuídas em várias regiões do sistema nervoso central. Dopamina, norepinefrina e epinefrina são as principais catecolaminas, formando uma classe de neurotransmissores químicos e hormonais.

A primeira indicação de produção endógena de nitrocatecolamina surgiu ao observar que os níveis de noradrenalina detectados por microdiálise do núcleo paraventricular hipotalâmico de ratos diminuía após a perfusão do tecido com uma solução contendo óxido nítrico (NO). A liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), medida por espectroscopia de massa em tandem por eletropulverização positiva para HPLC (HPLC-MS/MS), foi identificada em diversos tecidos vasculares *in vitro*: artéria e veia umbilical humanas, artéria e veia poplíteas humanas, aorta de *Chelonoidis carbonaria*, aorta de *Pantherophis guttatus* e artéria e aorta pulmonar obtidas do sagui *Callitrix* spp. Além dos tecidos vasculares, a liberação basal de 6-ND foi observada em átrio direito isolado de rato, átrios e ventrículos direitos isolados de camundongo, átrios e ventrículos isolados de coelho, ducto deferente isolado de rato e ducto deferente isolado humano.

A 6-ND liberada pelos canais deferentes de ratos e humanos é considerada um importante mediador da contratilidade de ambos os tecidos. Antidepressivos tricíclicos e antagonistas de receptores α_1 -adrenérgicos bloqueiam as contrações provocadas pela 6ND de maneira seletiva.

A molécula de óxido nítrico (NO) apresenta um dos menores pesos moleculares entre os produtos de secreção celular de mamíferos. O NO apresenta uma meia-vida curta e pouca especificidade em suas reações. A presença do NO é importante para a síntese das nitrocatecolaminas, inclusive a 6-ND. A síntese do óxido nítrico é atribuída principalmente à enzima óxido nítrico-sintase (NOS).

Existem três isoformas conhecidas de NOS, incluindo uma isoforma induzida (iNOS) e duas isoformas constitutivas (cNOS). Essa enzima se encontra no citosol e precisa de cofatores como o tetrahydrobiopterina (BH₄), o heme, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e o NADPH. A cNOS basal é estimulada pelo aumento na concentração celular de cálcio em decorrência da ativação de receptores na superfície celular e dos mecanismos de transdução de sinal. A administração de glicocorticoides não afeta sua síntese. Por outro lado, a iNOS requer uma concentração de cálcio muito baixa para ativação, mas a síntese de mRNA da iNOS é indispensável para sua atividade.

A existência dessas diferentes isoformas de NOS levanta a dúvida de qual delas é a mais envolvida na síntese de NO e, por consequência, da 6ND no ducto deferente dos camundongos. Na investigação das câmaras cardíacas de camundongos, observou-se que a liberação basal de 6-ND é notavelmente reduzida em camundongos eNOS^{-/-}, enquanto não apresenta essa redução em camundongos nNOS^{-/-} ou iNOS^{-/-}. Isso sugere a importância da eNOS na síntese de 6-ND nessas câmaras cardíacas. Para elucidar essa questão, examinamos a liberação basal de 6-ND em camundongos

controle, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-} e iNOS^{-/-}, a fim de determinar qual isoforma da NOS desempenha um papel crucial na biossíntese de 6-ND no ducto deferente de camundongos.

Ductos isolados de dois animais de cada grupo foram suspensos em um banho de órgão com 3 mL de KHS e ácido ascórbico (3 mM) gaseificado continuamente com uma mistura (95% O₂ / 5% CO₂) a 37 °C por 30 min. Os ductos deferentes foram incubados na ausência e presença da tetrodotoxina (TTX, 1 µM) e 2 mL do sobrenadante foram enviados para análise. O procedimento utilizado para a quantificação da 6-nitrodopamina foi adaptado para possibilitar a mensuração das quatro catecolaminas (6-nitrodopamina, dopamina, noradrenalina e adrenalina) em uma única análise cromatográfica. Em uma abordagem adicional, os níveis de 6-nitrodopa, 6-cianodopamina e 6-nitroadrenalina foram igualmente quantificados em uma única execução cromatográfica.

Uma segunda etapa da pesquisa, envolveu o estudo da contratilidade in vitro dos canais deferentes após estimulação por campo elétrico (EFS) antes e após incubação com L-NAME. Para tanto, os ductos eram preparados separadamente em um banho de órgão específico e, após um período de estabilização, os estímulos elétricos eram aplicados e a tensão isométrica exercida pelos ductos deferentes era registrada pelo o sistema PowerLab.

A liberação basal de 6-ND mostrou-se significativamente reduzida em camundongos nNOS^{-/-} em comparação com os camundongos controle, porém não houve diminuição quando os canais deferentes foram obtidos de camundongos eNOS^{-/-} ou iNOS^{-/-}. A pré-incubação dos canais deferentes com tetrodotoxina (1 µM) resultou em uma redução significativa da liberação basal de 6-ND em camundongos controle, eNOS^{-/-} e iNOS^{-/-}, mas não apresentou efeito na liberação basal de 6-ND em camundongos nNOS^{-/-}. O estímulo elétrico induziu contrações dependentes da frequência aplicada. Interessantemente os animais nNOS^{-/-} mostraram uma redução significativa da força de contração a partir de 4Hz de energia aplicada, enquanto os animais controle, iNOS^{-/-} e eNOS^{-/-} mostraram a mesma capacidade contrátil em todas as frequências aplicadas. A pré incubação com L-NAME gerou redução na capacidade contrátil dos camundongos controle, iNOS^{-/-} e eNOS^{-/-}, mas não alterou a força gerada pelos camundongos nNOS^{-/-}, a qual já estava reduzida.

Os resultados deixam claro de maneira clara que a isoforma nNOS desempenha o papel principal na liberação de óxido nítrico (NO) no ducto deferente de camundongos, reafirmando assim a importância do 6-ND como um modulador significativo da contratilidade desse ducto.

Palavras-Chave: Adrenalina; Catecolamina; Dopamina; Cromatografia líquida; Noradrenalina; Espectrometria de massa em tandem.

ABSTRACT

Catecholamines are organic compounds that have in their structure a catechol group (3,4-dihydroxybenzene) linked by an ethyl bridge to an amine group. Catecholamines are found in the peripheral sympathetic nervous system, adrenal medulla, and distributed throughout various regions of the central nervous system. The main catecholamines are dopamine, norepinephrine, and epinephrine, constituting a class of chemical and hormonal neurotransmitters.

The initial indication of endogenous nitrocatecholamine production emerged from observations that levels of noradrenaline, detected through microdialysis of the hypothalamic paraventricular nucleus in rats, reduced after perfusing the tissue to a solution containing nitric oxide (NO). Basal release of 6-nitrodopamine (6-ND), assessed by HPLC-positive electrospray tandem mass spectroscopy (HPLC-MS/MS), was identified in various tissues in vitro: human umbilical artery and vein, artery and human popliteal vein, aorta from *Chelonoidis carbonaria*, pulmonary artery and aorta obtained from the marmoset *Callitrix spp*, and aorta from *Pantherophis guttatus*. Apart from blood vessel tissues, basal secretion of 6-ND was measured in isolated rat right atrium, isolated mouse right ventricles and atria, isolated rabbit ventricles and atria, isolated rat vas deferens and isolated human vas deferens.

6-ND released by the vas deferens of rats and humans is considered an important mediator of the contractility of both tissues. Tricyclic antidepressants and $\alpha 1$ -adrenergic receptor antagonists selectively block contractions induced by 6-ND.

The nitric oxide (NO) molecule has one of the lowest molecular weights among mammalian cellular compression products. NO has a short half-life and little specificity in its reactions. The presence of NO is important for the synthesis of nitrocatecholamines, including 6-ND. The synthesis of nitric oxide is mainly attributed to the enzyme nitric oxide synthase (NOS).

Three NOS isoforms are described, one induced (iNOS) and two constitutive (cNOS). This enzyme is present in the cytosol and requires NADPH, tetrahydrobiopterin (BH₄), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN) and heme as cofactors. Basal cNOS is activated by an increase in intracellular calcium concentration in response to the activation of cell surface receptors and signal transduction mechanisms. Its synthesis is not affected by the administration of glucocorticoids. In contrast, iNOS requires a very low calcium concentration for activation, but iNOS mRNA synthesis is indispensable for its activity.

The existence of these different NOS isoforms raises the question of which one is most involved in the synthesis of NO and, consequently, 6ND in the vas deferens of mice. In the investigation of mouse cardiac chambers, it was observed that the spontaneous release of 6-ND is significantly reduced in eNOS^{-/-} mice, while it is not evident this reduction in iNOS^{-/-} or nNOS^{-/-} mice. This implies the significance of eNOS in the generation of 6-ND within the heart of these animals. To elucidate this matter, we examined the spontaneous release of 6-ND in control mice, iNOS^{-/-}, eNOS^{-/-}, and nNOS^{-/-} mice to ascertain which NOS isoform is integral in the biosynthesis of 6-ND in mice vas

deferens. Isolated ducts from two animals from each group were suspended in an organ bath with 3 mL of KHS and ascorbic acid (3 mM) continuously gassed with a mixture (95% O₂ / 5% CO₂) at 37 °C for 30 min. The vas deferens were incubated in the absence and presence of tetrodotoxin (TTX, 1 μM) and 2 mL of the supernatant was sent for analysis. The procedure employed for the quantification of 6-nitrodopamine was modified to allow the measurement of the four catecholamines (6-nitrodopamine, dopamine, norepinephrine, and epinephrine) in a single chromatographic analysis. In an additional approach, the levels of 6-cyanodopamine, 6-nitroadrenaline, and 6-nitrodopa were also quantified in one chromatographic analysis.

A second stage of the research involved the study of in vitro contractility of the vas deferens after electric field stimulation (EFS) before and after incubation with L-NAME. To this end, the ducts were prepared separately in a specific organ bath and, after a period of stabilization, electrical stimuli were applied and the isometric tension exerted by the vas deferens was recorded by the PowerLab system.

The release of 6-ND exhibited a significant decrease in nNOS^{-/-} mice compared to control mice. However, no reduction was observed when vas deferens were acquired from iNOS^{-/-} or eNOS^{-/-} mice. Pre-incubation of vas deferens with TTX resulted in a notable reduction in the release of 6-ND in control mice, iNOS^{-/-}, and eNOS^{-/-} mice, but had no impact on the release of 6-ND in nNOS^{-/-} mice. EFS induced frequency-dependent contractions of the tissue. Interestingly, nNOS^{-/-} animals showed a significant reduction in contraction force from 4Hz of applied energy, while control, iNOS^{-/-} and eNOS^{-/-} animals showed the same contractile capacity at all applied frequencies. Pre-incubation with L-NAME generated a reduction in the contractile capacity of control, iNOS^{-/-} and eNOS^{-/-} mice, but did not alter the force generated by nNOS^{-/-} mice, which was already reduced.

The findings unequivocally indicate that nNOS is the primary NO isoform accountable for the release of 6-ND in the mouse vas deferens. These results further underscore the significance of 6-ND as a crucial regulator of vas deferens contractility.

Keywords: Adrenaline; Catecholamine; Dopamine; Liquid chromatography; Noradrenaline; Tandem mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Basal release of 6-nitrodopamine (6-ND) and dopamine (DA) from vas deferens obtained from control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice. Release of 6-ND (Panels A, C and E) and DA (Panels B, D and F) was detected in Krebs-Henseleit's solution (KHS) by LC-MS/MS. The limit of quantification (LOQ) was 0.1 ng/mL. The number of vas deferens (n) is expressed as x/y, where x represents the number of animals and y the number of samples analyzed by LC-MS/MS. Data are shown as mean $\pm$ SEM and represent the value obtained from two pairs of vas deferens obtained from two mice.....30

Figura 2. Effect of tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) on the basal release of 6-nitrodopamine (6-ND) and dopamine (DA) from control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice isolated vas deferens. 6-ND (Panels A, C, E and G) and dopamine (Panels B, D, F and H) were detected in Krebs-Henseleit's solution (KHS) by LC-MS/MS. The limit of quantification (LOQ) was 0.1 ng/mL. The number of vas deferens (n) is expressed as x/y, where x represents the number of animals and y the number of samples analyzed by LC-MS/MS. Data are shown as mean $\pm$ SEM and represent the value obtained from two pairs of vas deferens obtained from two mice.....32

Figura 3. Effect of L-NAME on the electric-field stimulation (EFS, 2–32 Hz) induced contraction in control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-} and iNOS^{-/-} mice. EFS-induced frequency-dependent contractions of the mouse isolated vas deferens. Pre-incubation (30 min) with L-NAME (100 μ M) caused significant reductions in the contractions induced by EFS in control (Panel A), eNOS^{-/-} (Panel C), and iNOS^{-/-} (Panel D) mouse isolated vas deferens. Pre-incubation (30 min) with L-NAME (100 μ M) caused no changes the contractions induced by EFS in isolated vas deferens obtained from nNOS^{-/-} mice (Panel B). *P < 0.05 compared with respective control group. Data are shown as mean $\pm$ SEM and each value was obtained from one vas deferens from one mouse.....33

Figura 4. Isolated vas deferens contractions induced by electric field stimulation (EFS, 2–32 Hz) in control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-} and iNOS^{-/-} mice. EFS-induced vas deferens contractions in nNOS^{-/-} mice were significantly smaller compared with control mice (panel A). In isolated vas deferens from eNOS^{-/-} (panel B) and iNOS^{-/-} (panel C) mice, the amplitude of EFS-induced contractions did not significantly differ from control animals. *P < 0.05 compared with respective control group. Data are shown as mean $\pm$ SEM and each value was obtained from one vas deferens from one mouse.....34

Figura 5. Schematic representation of the role of nNOS on the release of 6-ND from mouse isolated vas deferens. Basal release of dopamine (DA) can be originated from adrenergic nerve terminals and from the epithelium. Nitregic nerve terminals express neuronal nitric oxide (NO) synthase (nNOS). Release of NO allows the “nitration” of dopamine, resulting in the formation of 6-nitrodopamine (6-ND).....34

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Basal release of noradrenaline and adrenaline from vas deferens obtained from control, eNOS ^{-/-} , nNOS ^{-/-} , and iNOS ^{-/-} mice.....	30
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

(6-ND)	6-nitrodopamina
(AADC)	L-aminoácido aromático descarboxilase
(ADH)	Álcool Desidrogenase
(AR)	Aldeído-redutase
(BH4)	Tetrahidrobiopterina
(cNOS)	Enzima óxido nítrico-sintase constitutivas
(COMT)	Catecol-o-metiltransfrase
(DA)	Dopamina
(DA-β-hidroxilase)	Enzima dopamina-beta-hidroxilase
(EMT)	Transportador extraneuronal de monoaminas
(FAD)	Flavina adenina dinucleotídeo
(GPCR)	Receptores acoplados a proteína G
(iNOS)	Enzima óxido nítrico-sintase induzida
(LC-MS-MS)	Cromatografia líquida acoplada a massa
(L-DOPA)	L-3,4-diidroxifenilalanina
(MAO)	Monoaminoxidase
(MHPG)	Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicólico
(MS)	Espectrometria de massa
(nNOS)	Óxido nítrico-sintase neuronal
(NE)	Norepinefrina
(NET)	Transportador de norepinefrina
(NO)	Óxido nítrico
(NOS)	Enzima óxido nítrico-sintase
(SNC)	Sistema nervoso central
(SN)	Sistema nervoso
(VMAT)	transportador vesicular de monoaminas
(VMA)	Ácido vanililmandélico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Catecolaminas	16
1.2. Dopamina	18
1.3. 6-Nitrodopamina	19
1.4. Óxido Nítrico	21
1.5. Óxido Nítrico Sintase	22
1.6. Canal Deferente	23
2. JUSTIFICATIVA/ HIPÓTESE	26
3. OBJETIVO	27
4. MATERIAL E MÉTODO	28
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
9. ANEXO	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 CATECOLAMINAS

As catecolaminas são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura um grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno) ligado por uma ponte de etil a um grupo de amina. As catecolaminas são presentes no sistema nervoso simpático periférico, na medula adrenal e são distribuídas por diversas regiões do sistema nervoso central. (ALEXOPOULOS, 2021).

As principais catecolaminas são a dopamina, norepinefrina e epinefrina, constituindo uma classe de neurotransmissores químicos e hormonais (LAKATTA, 1987; MOLINOFF; AXELROD, 1971). Elas desempenham um papel na regulação de processos fisiológicos e contribuem para o desenvolvimento de condições neurológicas, psiquiátricas, endócrinas e cardiovasculares (BROOKS, 2001; NONOGAKI, 2000)

As catecolaminas são produzidas a partir da tirosina. A primeira etapa envolve a hidroxilação da tirosina para formar L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), uma reação catalisada pela enzima tirosina hidroxilase. Após a sua formação, o L-DOPA é descarboxilado para dopamina (DA) pela L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Uma vez sintetizada, a DA pode ser convertida em norepinefrina (NE) por ação da enzima dopamina-beta-hidroxilase (DA- β -hidroxilase). A NE, por sua vez, pode ser transformada em epinefrina em neurônios que contenham a enzima feniletanolamina-N-metiltransferase (EISENHOFER; KOPIN; GOLDSTEIN, 2004; MOLINOFF; AXELROD, 1971; NAGATS, 1991).

A maior parte da epinefrina presente nas terminações nervosas ou células cromafins está armazenada em vesículas e, em situações normais, apenas uma pequena porção está na forma livre no citoplasma. O transportador vesicular de monoaminas (VMAT) é responsável por manter a concentração nas vesículas. O VMAT, diferentemente do transportador de aminas encarregado pela captação de NE nas terminações nervosas, faz uso do gradiente transvesicular de prótons como força motriz (GAINETDINOV; CARON, 2003; SMEETS; GONZÁLEZ, 2000).

Uma vez liberada na fenda sináptica, o efeito da NE acaba, principalmente, pela sua captura nas terminações nervosas noradrenérgicas. A epinefrina e a NE circulantes são degradadas enzimaticamente. As principais enzimas que metabolizam as catecolaminas se localizam no espaço intracelular; por esse motivo, elas precisam ser captadas pelas células para que ocorra sua degradação metabólica (GILSBACH; HEIN, 2012; MOLINOFF; AXELROD, 1971; RICHTER, 1937).

A recaptura neuronal da NE é mediada pelo transportador de norepinefrina (NET) localizado na membrana celular. Esse transportador funciona como co-transportador de Cl⁻, Na⁺ e a amina correspondente, aproveitando o gradiente de sódio como a força motora. Uma vez no compartimento celular, uma parte da NE é armazenado dentro de vesículas por meio da ação do VMAT. A aquisição pós-sináptica de noradrenalina é conduzida pelo transportador extraneuronal de monoaminas (EMT),

que compõem um grupo de transportadores de cátions orgânicos extensa e amplamente distribuídos (EISENHOFER; KOPIN; GOLDSTEIN, 2004; KOPIN et al., 1998).

O NET apresenta alta seletividade para noradrenalina, demonstrando elevada afinidade com uma velocidade de captação relativamente baixa. Este transportador desempenha um papel crucial na preservação dos estoques de NE. O EMT tem afinidade mais baixa, transportando epinefrina e isoprenalina, bem como NE. Entretanto, o EMT tem uma capacidade de transporte superior em comparação com o NET. (RICHTER, 1937).

As catecolaminas exógenas e endógenas são predominantemente degradadas por duas enzimas celulares: monoaminoxidase (MAO) e catecol-o-metiltransferase (COMT). A MAO, que abrange as isoformas MAO-A e MAO-B, encontra-se nas mitocôndrias, mais precisamente em suas membranas externas. Ela está amplamente presente nas terminações nervosas noradrenérgicas, porém se encontra, também, em outros tecidos, como fígado e epitélio intestinal (KOPIN et al., 1998; RICHTER, 1937).

A MAO transforma catecolaminas em seus aldeídos correspondentes, os quais são prontamente degradados pela aldeído-desidrogenase em seus ácidos carboxílicos correspondentes (a norepinefrina produz o 3,4-di-hidroxifenilglicol) na periferia. Além disso, a MAO oxida outras monoaminas, incluindo a serotonina e a dopamina. Dentro dos neurônios simpáticos, a MAO desempenha uma importante função na regulação da quantidade de DA e NE (EISENHOFER; KOPIN; GOLDSTEIN, 2004; KOPIN et al., 1998). Uma das vias responsáveis pelo metabolismo da NA é a via redutora. Essa via é mediada pela aldeído-redutase (AR) e gera um metabólito menos prevalente, o ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicólico (MHPG), o qual é conjugado com o sulfato de MHPG antes de ser excretado (KOPIN et al., 1998).

A segunda via mais importante do metabolismo das catecolaminas envolve a sua metilação, realizada pela catecol-O-metiltransferase (COMT). A COMT adiciona um grupo metila a um dos grupos hidroxila do catecol, resultando na formação de um derivado metoxi. Apesar de não ser encontrada nos neurônios noradrenérgicos, esta enzima está presente na medula da suprarrenal, assim como em muitos outros tecidos do organismo (KOPIN et al., 1998). O resultado da ação sequencial da MAO e da COMT é a formação do ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG). O MHPG é, em parte, ligado a derivados sulfato ou glicuronídeo e, em seguida, eliminados na urina. Entretanto, em sua maior parte, o MHPG é convertido em VMA (EISENHOFER; KOPIN; GOLDSTEIN, 2004; KOPIN et al., 1998).

A MAO e a COMT não são as principais responsáveis pelo fim dos efeitos dos neurotransmissores nos tecidos periféricos. A combinação das ações do NET, EMT e COMT que capturam e inativam as catecolaminas circulantes, sendo que a importância relativa de cada etapa varia conforme o composto em questão. A NE liberada é prontamente recapturada pelo NET, ao passo que a epinefrina depende mais do EMT (EISENHOFER; KOPIN; GOLDSTEIN, 2004; KOPIN et al., 1998; SMEETS; GONZÁLEZ, 2000).

As catecolaminas possuem uma ação endógena nos receptores adrenérgicos (α 1 e 2, e β 1, 2 e 3), tendo respostas diferentes para cada receptor e tecido. As funções fisiológicas das catecolaminas são intermediados por receptores acoplados a proteína G (GPCR), que controlam a sinalização do efector, ou seja, o segundo mensageiro (AHLQUIST, 1948; BLACK, 1976; BYLUND et al., 1994; HIEBLE; BONDINELL; RUFFOLO, 1995; SMEETS; GONZÁLEZ, 2000).

1.2 DOPAMINA

A DA foi sintetizada pela primeira vez em 1910. Por volta de 1930, ela foi identificada como um composto intermediário na produção de epinefrina e NE. No entanto, acreditava-se que a DA era mais do que apenas esse intermediário na biossíntese dessas catecolaminas. Apenas no começo da década de 50 que a DA foi encontrada armazenada em tecidos, indicando a possibilidade de possuir uma função de sinalização própria. Ao fim da década, Carlsson e Montagu encontraram estoques de DA no cérebro. Posteriormente, Hornykiewicz constatou uma falta de DA no cérebro comprometida pela doença de Parkinson, estimulando o interesse na função da dopamina em distúrbios e doenças neurológicas. (CARLSSON, 1959; COSTA; SCHOENBAUM, 2022; HORNYKIEWICZ, 1958).

A dopamina (DA) está estreitamente associada à melanina, um pigmento sintetizado a partir de uma reação oxidativa da DA, L-DOPA ou tirosina. A melanina está presente na pele e na cutícula, atribuindo à substância negra o seu nome característico devido à sua coloração escura. Ambas a L-DOPA e a DA são rapidamente oxidadas por processos não enzimáticos, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio citotóxicas e quinonas. Essas quinonas da L-DOPA e da DA estabelecem adutos com a alfa-sinucleína, o componente principal dos corpos de Lewy no Parkinson. A DA é um composto polar, apresentando dificuldade para atravessar a barreira hematoencefálica (COSTA; SCHOENBAUM, 2022; HORNYKIEWICZ, 1962; ZENG et al., 2007).

A DA é sintetizada por uma via biossintética semelhante à da 5-HT. A tirosina e a fenilalanina são os aminoácidos precursores da DA. Na maioria dos mamíferos, a enzima fenilalanina hidroxilase converte a fenilalanina em tirosina. A diminuição nos níveis desta enzima resulta em um aumento na concentração de fenilalanina, gerando a fenilcetonúria. Para evitar comprometimento intelectual, a fenilcetonúria deve ser controlada por meio de restrições na dieta (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; CARLSSON, 1959; COSTA; SCHOENBAUM, 2022).

O cérebro consegue captar a tirosina com facilidade. Entretanto, diferentemente do triptofano, a quantidade da tirosina no cérebro costuma estar saturada. A transformação da tirosina em L-DOPA (3,4 dihidroxifenilalanina) pela tirosina hidroxilase representa a etapa limitante na produção da dopamina. A tirosina hidroxilase é uma enzima multifuncional que depende de ferro e de um cofator biopterina; sua ação é controlada por fosforilação e pela inibição pelo produto final. (COSTA; SCHOENBAUM, 2022; SIBLEY; MONSMA, 1992; ZENG et al., 2007).

Quatro isoformas da tirosina hidroxilase são descritas em humanos, o que difere de muitos primatas não humanos (duas) e dos ratos (apenas uma). Ainda não se sabe se as diferentes isoformas apresentam funções diferentes. Assim que formado, o L-DOPA é convertido em dopamina por intermédio da enzima AADC, também responsável pela conversão de L-5-hidroxitriptofano em 5-HT (CARLSSON, 1959; COSTA; SCHOENBAUM, 2022; HORNYKIEWICZ, 2002; ZENG et al., 2007).

No sistema nervoso central (SNC) e na periferia, a AADC apresenta uma atividade elevada, dificultando a medição fácil dos níveis basais de L-DOPA. A L-DOPA, diferentemente da DA, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, sendo então transformada em DA, justificando a eficácia da L-DOPA no tratamento do Parkinson. As vias cerebrais onde a DA está mais presente incluem a projeção conecta a substância negra e o neostriado e a projeção que comunica a região tegmental ventral com as estruturas límbicas, especialmente o córtex límbico (COSTA; SCHOENBAUM, 2022). A eficácia terapêutica da levodopa, um medicamento antiparkinsoniano, está vinculada à primeira área, enquanto se acredita que a eficácia terapêutica dos medicamentos antipsicóticos esteja ligada à segunda. Além disso, os neurônios dopaminérgicos no hipotálamo ventral exercem uma função crucial na regulação da hipófise (HORNYKIEWICZ, 1962, 2006).

Cinco subtipos de receptores de DA são descritos, sendo que todos são metabotrópicos, ou seja, exercem suas ações por meio de segundos mensageiros e não diretamente na abertura de canais iônicos. Esses receptores de DA se dividem em duas subfamílias: os subtipos de receptores tipo D1 (D1R e D5R), acoplados a Gs, ativando a adenilil ciclase e a subfamília tipo D2 (D2R, D3R e D4R) acoplada a Gi, inibindo a adenilil ciclase (MISSALE et al., 1998). Em geral, a DA exerce uma ação moduladora e pode ter efeitos tanto inibitórios quanto excitatórios sobre os neurônios do SNC, dependendo do receptor específico ativado e do contexto neural. Essa ação foi mais detalhadamente descrita nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, nos quais a ativação do receptor D2 induz a abertura dos canais de potássio por meio da proteína de acoplamento Gi (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

1.3 6-NITRODOPAMINA

A primeira indicação de produção endógena de nitrocatecolamina surgiu ao observar que os níveis de noradrenalina detectados por microdiálise do núcleo paraventricular hipotalâmico de ratos diminuíam após a perfusão do tecido com uma solução contendo óxido nítrico (NO) (SHINTANI et al., 1996). Empregando 6-nitronoradrenalina sintetizada por meio da insuflação de NO em uma solução contendo cloridrato de noradrenalina como referência, extratos de cérebro suíno foram submetidos à análise por cromatografia de alta pressão acoplada à detecção eletroquímica. Foi identificado um pico com tempo de retenção idêntico ao padrão, sendo caracterizado como 6-nitronoradrenalina por meio de espectrometria UV, espectrometria de massa (MS) e espectroscopia de RMN (SHINTANI et al., 1996). Usando a mesma metodologia, a presença de 6-nitronoradrenalina foi identificada em extratos de cérebro de ratos. As quantidades de 6-nitronoradrenalina foram significativamente reduzidas

(aproximadamente 60-70%), mas não totalmente eliminadas, em extratos de cérebro de ratos previamente tratados com o inibidor da síntese de NO, L-NAME (SHINTANI et al., 1996). Utilizando a reação de catecolaminas com nitrito de sódio para gerar 6-nitronoradrenalina, 6-nitroadrenalina e 6-nitrodopamina (PALUMBO et al., 1999a), a presença de 6-nitronoradrenalina e 6-nitroadrenalina em extratos de cérebro de rato foi quantificada por HPLC (TSUNODA et al., 2007). O transporte de noradrenalina em sinaptossomas de ratos é inibido por 6-nitronoradrenalina (6-NN) (SHINTANI et al., 1996). e a administração intratecal de 6-NN induz analgesia devido à liberação de noradrenalina (CHIARI et al., 2000). Essas observações indicam que as nitrocatecolaminas podem atuar como mediadores neuronais no sistema nervoso central.

A liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), medida por espectroscopia de massa em tandem por eletropulverização positiva para HPLC (HPLC-MS/MS), foi identificada em diversos tecidos vasculares in vitro: artéria e veia umbilical humanas (BRITTO-JÚNIOR et al., 2021a), artéria e veia poplítea humanas (DE OLIVEIRA et al., 2023), aorta de *Chelonoidis carbonaria* (CAMPOS et al., 2021), aorta de *Pantherophis guttatus* (LIMA et al., 2022b) e artéria e aorta pulmonar obtidas do sagui *Callitrix spp* (BRITTO-JÚNIOR et al., 2023a). Além dos tecidos vasculares, a liberação basal de 6-ND foi observada em átrio direito isolado de rato (BRITTO-JÚNIOR et al., 2022b), átrios e ventrículos direitos isolados de camundongo (BRITTO-JÚNIOR et al., 2023c), átrios e ventrículos isolados de coelho (JÚNIOR et al., 2023), ducto deferente isolado de rato (BRITTO-JÚNIOR et al., 2021b) e ducto deferente isolado humano (BRITTO-JÚNIOR et al., 2022c).

Recentemente, Britto-Júnior et al estudaram o papel da 6ND em canais deferentes de ratos e as suas interações com diversos compostos que atuam no sistema nervoso autônomo (BRITTO-JÚNIOR et al., 2021b). Utilizando cromatografia líquida de massa (LC-MS-MS) liberações basais de 6-ND e noradrenalina foram detectadas nos canais deferentes isolados dos ratos. Interessantemente, a liberação de 6-ND foi reduzida pela incubação de tecido com L-NAME e dos canais deferentes obtidos de ratos tratados com L-NAME. SCH-23390, um antagonista de receptor D1 de dopamina, causou desvios para a esquerda nas curvas concentração-resposta para 6ND sem afetar as contrações dos canais isolados dos ratos induzidas por dopamina ou estímulo elétrico. Haloperidol, PG-01037 e sonopiprazol, antagonistas de receptores de dopamina, causaram desvios significativos para a direita nas curvas concentração-resposta à dopamina, mas não tiveram efeito nas contrações induzidas por 6ND ou estímulo elétrico. Os compostos tricíclicos desipramina, clomipramina, amitriptilina, ciclobenzaprina e carbamazepina induziram desvios para a direita na curva concentração-resposta da 6ND, mas não reduziram as respostas contráteis de noradrenalina, dopamina e adrenalina. Eles também reduziram as contrações dos ductos isolados induzidas por corrente elétrica no controle, mas não em tecidos obtidos de animais tratados com L-NAME. Maprotilina, oxcarbazepina, paroxetina e cetanserina não tiveram efeito nas contrações induzidas por 6ND ou estímulo elétrico. Assim, eles foram capazes de demonstrar que a 6ND modula a contratilidade dos ductos deferentes isolados de ratos, e a desipramina, a clomipramina, a amitriptilina, a ciclobenzaprina e a carbamazepina atuam como antagonistas seletivos do receptor 6ND nos ductos

deferentes de ratos (BRITTO-JÚNIOR et al., 2021b). Em outro estudo, eles demonstraram que os antagonistas dos receptores α_1 , β_1 e $\beta_{1/2}$ adrenérgicos atuam como antagonistas dos receptores de 6ND no ducto deferente isolado de rato, abrindo a possibilidade de que muitas ações anteriormente atribuídas à noradrenalina possam ser devidas ao antagonismo 6-ND (BRITTO-JÚNIOR et al., 2022a; LIMA et al., 2022a).

Após a demonstração da presença e importância da 6ND nos canais deferentes de ratos, o grupo acima conduziu estudos *in vitro* em canais deferentes de humanos (BRITTO-JÚNIOR et al., 2022c). A liberação *in vitro* de 6-ND, dopamina, noradrenalina e adrenalina dos canais deferentes humanos foi avaliada por LC-MS-MS. O efeito contrátil das catecolaminas nos canais deferentes também foi investigado. A influência dos antidepressivos tricíclicos foi examinada na atividade espasmogênica induzida por catecolaminas e estimulação elétrica. Após o tecido ser incubado com L-NAME, a liberação de catecolaminas e a resposta contrátil ao estímulo elétrico foram avaliadas. Os resultados indicaram que a 6ND é a principal catecolamina liberada pelos canais deferentes humanos, e sua síntese/liberação é inibida pela supressão do NO. A atividade espasmogênica provocada por corrente elétrica no ducto deferente humano foi bloqueada por antidepressivos tricíclicos apenas em concentrações que antagonizavam seletivamente as contrações induzidas pela 6ND, sem afetar a atividade espasmogênica induzida por dopamina, noradrenalina e adrenalina neste tecido. A incubação dos canais deferentes com L-NAME reduziu tanto a liberação de 6ND quanto as contrações induzidas pelo estímulo elétrico (BRITTO-JÚNIOR et al., 2022c). Por meio desse estudo, eles foram capazes de demonstrar que a 6ND deve ser considerado um importante modulador endógeno da contratilidade do ducto deferente humano e possivelmente desempenha um papel fundamental no processo de emissão da ejaculação. A fim de complementar o estudo acima, Britto-Júnior *et al.* demonstraram efeitos que os bloqueadores alfa-1 atuam como antagonistas das contrações induzidas pela 6ND nos canais deferentes isolados de humanos (BRITTO-JÚNIOR et al., 2023b).

1.4 ÓXIDO NÍTRICO

Em 1980, Furchgott e Zawadzki evidenciaram que o relaxamento vascular provocado pela acetilcolina dependia da existência do endotélio. Eles destacaram que esse fenômeno era mediado por um fator humoral instável, futuramente identificado como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF) (CERQUEIRA; YOSHIDA, [s.d.]; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Ao longo dos anos 80, demonstrou-se que esse EDRF era muito semelhante ao óxido nítrico (NO). Mas, apenas em 1992 que o NO foi plenamente reconhecido como essa molécula (KOSHLAND, 1992).

O NO pode atuar como oxidante ou como redutor a depender do meio no qual se encontra e pode reagir facilmente com oxigênio, produzindo nitrito e nitrato (ARCHER, 1993; KIECHLE; MALINSKI, 1993). A molécula de óxido nítrico (NO) apresenta um dos menores pesos moleculares entre os produtos de secreção celular de mamíferos. Ela apresenta uma meia-vida curta e pouca

especificidade em suas reações (NATHAN, 1992). Trata-se de um composto com potencial citotóxico e vasodilatador que participa na modulação de reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, conforme o tipo celular e o estímulo apresentado (ADAMS, 1996; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A estrutura molecular do NO possui um elétron não pareado capaz de reagir facilmente com radicais superóxido, oxigênio ou metais de transição, como cobalto, ferro e manganês ou cobre (KIECHLE; MALINSKI, 1993). O NO apresenta uma elevada afinidade com o grupo heme, encontrado em diversas proteínas intracelulares (cicloxigenase, guanilato ciclase e NOS) e também consegue se ligar a grupos -SH, produzindo tiol (WENNMALM, 1994); é um gás estável e incolor, moderadamente solúvel em água e apresenta uma meia-vida que varia de 3 a 60 segundos, podendo durar por mais tempo a depender da concentração de O_2 e O_2 do ambiente (DAVIES; FULTON; HAGEN, 2005; FARRELL; BLAKE, 1996b; KIECHLE; MALINSKI, 1993; KUO; SCHROEDER, 1995; LOWENSTEIN; SNYDER, 1992; LYONS, 1995; STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992).

O NO é sintetizado principalmente a partir da arginina. Dentro das células endoteliais dos vasos, a L-arginina, quando há oxigênio molecular, produz NO e L-citrulina por meio de uma reação catalisada pela óxido nítrico-sintase (NOS) (KUO; SCHROEDER, 1995). O óxido nítrico transpassa o endotélio em direção à musculatura lisa vascular, ativando de maneira direta a enzima guanilato ciclase solúvel, promovendo o aumento intracelular de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina). Esse processo leva ao relaxamento do músculo liso ao redor dos vasos, gerando vasodilatação (CONGER, 1994). Essa interação da guanilil ciclase solúvel com o NO provoca muitos efeitos fisiológicos e patofisiológicos (CERQUEIRA; YOSHIDA, [s.d.]).

O NO participa de vários processos biológicos, como relaxamento vascular, citotoxicidade mediada por macrófagos, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, adesão e agregação plaquetária, depressão sináptica a longo prazo, potencialização da transmissão sináptica a longo prazo, regulação da pressão sanguínea basal, prevenção de piloro espasmo em estenose pilórica hipertrófica infantil e microcirculação medular e glomerular. A atuação do NO foi descrita no cerebelo, endotélio, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), neutrófilos, macrófagos, células epiteliais pulmonares, rins, miocárdio e mucosa gastrointestinal (GIBALDI, 1993; KIECHLE; MALINSKI, 1993; LOSCALZO, 2001; M.D. BARRACHINA; J. PANES; J.V. ESPLUGUES, 2001; SHAPIRA; KADAR; WEISSMAN, 1994). O NO também pode desempenhar um papel na vasodilatação associada à angiogênese, tanto fisiológica quanto patológica, como observado em casos de tumores (ZICHE; MORBIDELLI, 2000).

1.5 ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

O NO é formado pela ação da enzima óxido nítrico-sintase (NOS). Na literatura, são descritas três isoformas dessa enzima, sendo duas constitutivas (cNOS) e uma induzida (iNOS) (KIECHLE;

MALINSKI, 1993; WONG; MARSDEN, 1996). Essa enzima se encontra no citosol e precisa de cofatores como o tetrahidrobiopterina (BH4), o heme, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e o NADPH (FARRELL; BLAKE, 1996a). A cNOS basal é estimulada pelo aumento na concentração celular de cálcio em decorrência da ativação de receptores presentes na superfície da célula e dos mecanismos de transdução do sinal (ADAMS, 1996). A administração de glicocorticoides não afeta sua síntese (DAVIES; FULTON; HAGEN, 1995). Por outro lado, a iNOS requer uma concentração de cálcio muito baixa para ativação, mas a síntese de mRNA é indispensável para sua atividade (CERQUEIRA; YOSHIDA, [s.d.]).

A isoforma I ou óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) representa uma NOS constitutiva e está localizada em células epiteliais, neurônios, SN periférico, SNC, sistema NANC, medula adrenal, mácula densa do rim, músculo esquelético, células b pancreática, órgão sexual masculino e outros (CERQUEIRA; YOSHIDA, [s.d.]). A nNOS apresenta grande importância fisiológica, uma vez que ela participa de diversas sinapses no SNC; contribui para a regulação central da pressão arterial, o relaxamento do músculo liso e a vasodilatação através dos nervos periféricos. (CERQUEIRA; YOSHIDA, [s.d.]).

A isoforma II, ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), é uma NOS que é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos e está presente tanto no endotélio quanto na musculatura lisa vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, [s.d.]). Uma vez ativada, ela gera uma quantidade significativa de NO, que exerce uma função citostática, além de causar fragmentação de DNA.

A isoforma III, também conhecida como óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS), constitui uma forma constitutiva de NOS que gera NO dentro do endotélio vascular em condições basais. No entanto, a força de cisalhamento gerada pelo fluxo sanguíneo pode aumentar sua produção (CERQUEIRA; YOSHIDA, [s.d.]). O NO liberado na luz dos vasos sanguíneos promove inibição da adesão e agregação plaquetária além de inibir a adesão leucocitária no endotélio vascular. Ele inibe a mitogênese, a síntese de DNA e a proliferação de células musculares lisas vasculares e, também ajuda no controle da contratilidade cardíaca e pressão arterial (FÖRSTERMANN et al., 1994; MURRELL et al., 1996).

A síntese de NO também pode ocorrer de forma independente da NOS. Os íons nitrito e nitrato podem atuar como um reservatório de NO, além de serem produtos do metabolismo do NO (CHEN; PITTMAN; POPEL, 2008). Enzimas como hemoglobina, mioglobina, xantina oxidoreductase, citocromo P450 reductase, podem catalisar a redução de nitrito ou nitrato para gerar NO (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). As peroxidases são enzimas contendo ferro que podem catalisar reações de oxidação de um e dois elétrons de pequenas moléculas aniônicas como doadoras de elétrons, como haletos, tiocianato e nitrito, com o peróxido de hidrogênio (ARNHOLD et al., 2006). O nitrito (NO₂⁻) é um ânion simétrico e, portanto, pode sofrer oxidação ou redução, gerando dióxido de nitrogênio (•NO₂) ou óxido nítrico, respectivamente.

1.6 CANAL DEFERENTE

O canal (ou ducto) deferente é um tubo muscular de parede espessa cuja função é transportar os espermatozoides do epidídimo para a uretra. O canal deferente se origina na cauda do epidídimo, sobe ao longo da borda pósteromedial do testículo, passa pelo canal inguinal para entrar no abdômen e se estende em direção à próstata. A porção final do canal deferente recebe um ducto curto da vesícula seminal e continua como ducto ejacutório através da próstata para terminar na uretra prostática (DIXON; JEN; GOSLING, 1998).

A parede do canal deferente é composta por um epitélio colunar pseudoestratificado, que se assemelha muito ao do epidídimo, uma camada muscular e uma adventícia. As células epiteliais colunares altas possuem microvilosidades longas (estereocílios) que se estendem para o lúmen, enquanto uma camada descontínua de células basais arredondadas repousa sobre uma lâmina basal (DIXON; JEN; GOSLING, 1998). Pelo menos três tipos diferentes de células colunares foram identificados no microscópio eletrônico: células principais, células lápis e células ricas em mitocôndrias (HOFFER, 1976). Os linfócitos ocorrem frequentemente entre as células epiteliais. A morfologia das células principais predominantes sugere que elas estão ativamente envolvidas na síntese de proteínas e glicoproteínas e não formam apenas um conduto passivo (DIXON; JEN; GOSLING, 1998).

No adulto, o ducto deferente possui uma camada muscular de 1 a 1,5 mm de espessura, formada por células musculares lisas dispostas em uma camada circular delimitada por camadas longitudinais interna e externa (DIXON; JEN; GOSLING, 1998). Durante a ejaculação, fortes contrações musculares impulsionam os espermatozoides ao longo do canal deferente em direção à uretra. Uma camada de tecido conjuntivo frouxo (a adventícia) envolve a camada muscular do canal deferente e contém numerosos feixes nervosos e grandes vasos sanguíneos (DIXON; JEN; GOSLING, 1998).

Acredita-se que o sistema nervoso adrenérgico desempenhe um papel modulador importante na contratilidade do ducto deferente (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2010). As fibras pré-ganglionares simpáticas originam-se dos segmentos da medula lombar (T10 - L2), descem para a pelve através dos nervos hipogástricos e fazem sinapses em numerosos gânglios pélvicos localizados no plexo pélvico. As fibras parassimpáticas pré-ganglionares, transportadas pelos nervos esplâncnicos pélvicos, se originam na medula sacral (S2, 3 e 4) e também fazem sinapses com os gânglios pélvicos. Os gânglios pélvicos contêm neurônios simpáticos e parassimpáticos que inervam os canais deferentes, a próstata, a vesícula seminal, a bexiga urinária, os ureteres, o pênis e o reto (DIXON; JEN; GOSLING, 1998; HUKOVIC, 1997).

A inervação noradrenérgica do ducto deferente humano é de grande importância no transporte e saída do sêmen. A rica inervação noradrenérgica não apenas para os canais deferentes, mas também para todos os outros órgãos genitais masculinos surge dos chamados “neurônios adrenérgicos curtos” situados nos gânglios pélvicos (OWMAN; SJOSTRAND, 1965). Usando um método de tiocolina para demonstrar acetilcolinesterase (AChE), fibras nervosas positivas para a AChE foram relatadas dentro

da camada muscular do canal deferente humano (ALM, 1982; MCCONNELL; BENSON; WOOD, 1982; SHIRAI; SASAKI; RIKIMARU, 1973).

Nos últimos anos, o NO foi identificado como um neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico (BREDT; SNYDER, 1992; RAND, 1992). Os nervos imunorreativos para a NOS foram relatados nos canais deferentes humanos neonatais, alguns dos quais contêm tirosina hidroxilase colocalizados (DIXON; JEN, 1995; JEN et al., 1996). A presença de nervos nitrérgicos nos canais deferentes de ratos é controversa, uma vez que foi detectada por imuno-histoquímica (CECCATELLI et al., 1994), mas os homogenatos de canais deferentes de ratos não apresentaram atividade de NO sintase (MITCHELL et al., 1991). De maneira intrigante, canais deferentes obtidos de ratos jovens não exibiram imunorreatividade para NOS, ao passo que em tecidos provenientes de animais mais velhos, as fibras nervosas imunorreativas para NOS eram abundantes (VENTURA; BURNSTOCK, 1996). Por meio de imuno-histoquímica, Brock e colaboradores demonstraram a presença de tirosina hidroxilase e óxido nítrico sintase nos canais deferentes de camundongos (BROCK; HANDELSMAN; KEAST, 2007).

2. JUSTIFICATIVA / HIPÓTESE

Conforme demonstrado por estudos anteriores, a presença de NO é essencial para a síntese de 6ND (BRITTO-JÚNIOR et al., 2022a, 2023a, 2023c; CAMPOS et al., 2021). A NOS é a enzima encarregada da síntese do óxido nítrico (NO). Três isoformas de NOS são identificadas, incluindo duas constitutivas (cNOS) e uma induzida (iNOS) (KIECHLE; MALINSKI, 1993; WONG; MARSDEN, 1996).

A existência dessas diferentes isoformas de NOS levanta a dúvida de qual delas é a mais envolvida na síntese de NO e, por consequência, da 6ND no ducto deferente dos camundongos. Na investigação das câmaras cardíacas de camundongos, observou-se que a liberação basal de 6-ND é notavelmente reduzida em camundongos eNOS^{-/-}, enquanto não apresenta essa redução em camundongos nNOS^{-/-} ou iNOS^{-/-}. Isso sugere a importância da eNOS na síntese de 6-ND nessas câmaras cardíacas. (BRITTO-JÚNIOR et al., 2023c). Para elucidar essa questão, examinamos a liberação basal de 6-ND em camundongos controle, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-} e iNOS^{-/-}, a fim de determinar qual isoforma da NOS desempenha um papel crucial na biossíntese de 6-ND no ducto deferente de camundongos.

3. OBJETIVO

O objetivo do estudo consiste em determinar qual isoforma da NOS é a mais envolvida na síntese da 6-ND nos canais deferentes de camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Vide Artigo: *The pivotal role of neuronal nitric oxide synthase in the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated vas deferens.*

Autores: José Britto-Júnior¹, Samuel Goulart Nacácio e Silva², Antonio Tiago Lima², Vivian Fuguhara², Larissa Bueno Andrade², Gustavo Duarte Mendes³, Larryn W. Peterson⁴, Silvana Chiavegatto⁵, Edson Antunes², Gilberto De Nucci⁶.

1. **Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.** Electronic address: josebrittojr@dac.unicamp.br.

2. **Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.**

3. **Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil; Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Metropolitan University of Santos, Santos, SP, Brazil.**

4. **Department of Chemistry, Rhodes College, Memphis, TN, USA.**

5. **Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of Sao Paulo (USP), São Paulo, Brazil; Department of Psychiatry, Institute of Psychiatry (IPq), University of Sao Paulo Medical School (FMUSP), São Paulo, Brazil.**

6. **Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil; Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Metropolitan University of Santos, Santos, SP, Brazil; Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of Sao Paulo (USP), São Paulo, Brazil.**

Revista: Nitric Oxide | **Fator de Impacto:** 4.898 (2021).

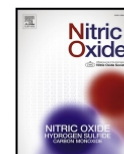
PMID: 38096948 | **DOI:** 10.1016/j.niox.2023.12.002

Situação: Aceito a publicação em 10 de dezembro de 2023. Publicado *online* em 12 de dezembro de 2023.



Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

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

The pivotal role of neuronal nitric oxide synthase in the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated vas deferens

José Britto-Júnior^{a,*}, Samuel Goulart Nacário Silva^{a,1}, Antonio Tiago Lima^a, Vivian Fuguhara^a, Larissa Bueno Andrade^a, Gustavo Duarte Mendes^{b,c}, Larynn W. Peterson^d, Silvana Chiavegatto^{e,f}, Edson Antunes^a, Gilberto De Nucci^{a,b,c,e}

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

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

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

^d Department of Chemistry, Rhodes College, Memphis, TN, USA

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

^f Department of Psychiatry, Institute of Psychiatry (IPq), University of São Paulo Medical School (FMUSP), São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Liquid chromatography
Tandem mass spectrometry
Dopamine
Noradrenaline
Adrenaline
Catecholamine

ABSTRACT

6-Nitrodopamine (6-ND) is released from rat and human vas deferens and is considered a major mediator of both tissues contractility. The contractions induced by 6-ND are selectively blocked by both tricyclic antidepressants and α_1 -adrenoceptor antagonists. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is the major isoform responsible for 6-ND release in mouse isolated heart, however the origin of 6-ND in the vas deferens is unknown. Here it was investigated by LC-MS/MS the basal release of 6-ND from isolated vas deferens obtained from control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice. In addition, it was evaluated *in vitro* vas deferens contractility following electric field stimulation (EFS).

Basal release of 6-ND was significantly reduced in nNOS^{-/-} mice compared to control mice, but not decreased when the vas deferens were obtained from either eNOS^{-/-} or iNOS^{-/-} mice. Pre-incubation of the vas deferens with tetrodotoxin (1 μ M) significantly reduced the basal release of 6-ND from control, eNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice but had no effect on the basal release of 6-ND from nNOS^{-/-} mice. EFS-induced frequency-dependent contractions of the vas deferens, which were significantly reduced when the tissues obtained from control, eNOS^{-/-} and iNOS^{-/-} mice, were pre-incubated with L-NAME, but unaltered when the vas deferens was obtained from nNOS^{-/-} mice. In addition, the EFS-induced contractions were significantly smaller when the vas deferens were obtained from nNOS^{-/-} mice.

The results clearly demonstrate that nNOS is the main NO isoform responsible for 6-ND release in mouse vas deferens and reinforces the concept of 6-ND as a major modulator of vas deferens contractility.

1. Introduction

The adrenergic nervous system is believed to play a major modulatory role in the vas deferens contractility [1]. A majority of the adrenergic fibers in the vas deferens originate from the hypogastric nerve trunk, with an association with some cholinergic fibers [2]. The presence of nitrergic nerves in the rat vas deferens is controversial, since it was detected by immunohistochemistry [3] but rat vas deferens

homogenates did not present NO synthase activity [4]. Interestingly, vas deferens obtained from immature rats present no immunoreactivity for NOS, whereas in tissue obtained from aged animals, the NOS-immunoreactive nerve fibers were abundant [5].

In various vessels and tissues, such as human umbilical cord vessels [6], isolated aortae from the tortoise *Chelonoidis carbonarius* [7] and from the snake *Pantherophis guttatus* [8], and isolated thoracic aorta and pulmonary artery from the marmoset *Callithrix spp* [9], there is a basal

* Corresponding author. University of Campinas (Unicamp), Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária, 13083-887, Campinas, São Paulo, Brazil.

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

¹ JBJ and SGNS contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.niox.2023.12.002>

Received 1 November 2023; Received in revised form 8 December 2023; Accepted 10 December 2023

Available online 12 December 2023

1089-8603/© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved.

release of 6-nitrodopamine (6-ND) which was virtually abolished by endothelium removal. In addition, mouse isolated atria and ventricles present basal release 6-ND, which is significantly reduced in $eNOS^{-/-}$, but not in $nNOS^{-/-}$ or $iNOS^{-/-}$ mice, indicating the relevance of $eNOS$ for the synthesis of 6-ND by heart chambers [10].

Both rat vas deferens [11] and human vas deferens [12] also present basal release 6-ND. This release was significantly reduced when the vas deferens was pre-incubated with the NOS inhibitor L-NAME, or in the case of the rat, when the vas deferens was obtained from rats chronically treated with L-NAME. 6-ND is considered a major mediator in both rat and human vas deferens contractility, and the contractions induced by 6-ND in these tissues are selectively blocked by tricyclic antidepressants [11,12], α_1 -adrenoceptor antagonists [13,14] and β_1 -adrenoceptor antagonists [15]. Since the origin of 6-ND is not clear in the vas deferens, here it was investigated the basal release of 6-ND from control, $eNOS^{-/-}$, $nNOS^{-/-}$ and $iNOS^{-/-}$ mice to ascertain which NOS isoform (s) play(s) an essential role in 6-ND biosynthesis in the mouse vas deferens.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experiments were conducted in adult (10-to-15-week age) male control mice (C57BL/6J), $iNOS^{-/-}$ (C57BL/6 129P2-Nos2^{tm1Lau}/J), $eNOS^{-/-}$ (C57BL/6 129P2-Nos3^{tm1Unc}/J) and $nNOS^{-/-}$ (C57BL/6) mice. The control, $iNOS^{-/-}$ and $eNOS^{-/-}$ mice were obtained from the Jackson Laboratory (Maine, EUA), and the breeding colony established in the UNICAMP animal house (CEMIB-UNICAMP; São Paulo, Brazil). The $nNOS^{-/-}$ mice founders were provided by Dawson's lab from Johns Hopkins University Medical School (MD, USA) and the breeding colony being established onto a C57BL/6J background by S. Chiavegatto at the Institute of Tropical Medicine from University of São Paulo Medical School, São Paulo (IMT-FMUSP, Brazil).

All experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the UNICAMP (CEUA; Protocol No. 5959-1/2022, 6087-1/2022 and 6067-1/2022) following the Brazilian Guidelines for the Production, Maintenance and Use of Animals for Teaching or Research from the National Council of Control in Animal Experimentation (CONCEA) [16] as well as by the ARRIVE guidelines [17]. Animals were maintained at a controlled room temperature (22–24 °C) and light cycle (12h) with food and water allowed *ad libitum*.

2.2. Isolation of vas deferens from mice

Euthanasia was conducted using an overdose of isoflurane. The animals were exposed to a concentration exceeding 5 % until breathing ceased, approximately 1 min later. Subsequently, exsanguination was performed. After euthanasia, both vasa deferentia from each mouse were extracted and immediately placed in Krebs-Henseleit's solution (KHS). For electric field stimulation (EFS) experiments, each vas deferens was surgically dissected. A strip of the tissue was vertically mounted in a glass chamber tissue bath containing 10 mL KHS. This was done using a fine sewing thread, with one end attached through a loop to a metal hook and the other end tied to an isometric force transducer. The KHS was continuously gassed (95 % O_2 : 5 % CO_2) and maintained at 37 °C using a Heated Circulator (PolyScience, Illinois, USA).

2.3. Basal release of 6-ND from mouse isolated vas deferens

Isolated vas deference from two animals (total of 4 vasa) were suspended separately in a 3-mL organ bath containing KHS and ascorbic acid (3 mM) continuously gassed with a mixture 95 % O_2 : 5 % CO_2 at 37 °C for 30 min. The vas deferens strips were incubated in the absence and presence of the voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX, 1 μ M). An aliquot of 2 mL of the supernatant was transferred to

black Eppendorf tubes and stored at –20 °C until analysis. The determination of 6-ND was done by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described [7]. The results are expressed as x/y , where x represents the number of animals employed and y the number of samples analyzed by LC-MS/MS.

2.4. Determination of catecholamines in KHS by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The method employed for 6-ND quantification [7] was modified to allow the measurement of the four catecholamines (6-nitrodopamine, dopamine, noradrenaline, and adrenaline) in a single chromatographic run. In another analysis, the levels of 6-nitrodopa, 6-cyanodopamine and 6-nitroadrenaline were quantified also in a single chromatographic run [18]. The mobile phase perfused a LC ADVp Liquid Chromatography Shimadzu System (Shimadzu Corp., Kyoto, JP) coupled to a Shimadzu 8060 Triple Quadrupole Mass Spectrometer operating in ESP + mode at 350 μ L/min. The dissolved residues were injected by a SIL-30 A C autoinjector, at 8 °C. The transitions monitored by electrospray multiple reaction monitoring (MRM), injection volume, run-time, limit of quantitation and method validation following USFDA guidelines for bio-analytical methods (FDA) [19] were described elsewhere.

2.5. Effect of electric-field stimulation (EFS) on the mouse isolated vas deferens

Briefly, strips of the mouse vas deferens were subjected to EFS using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical, Industrial Park, RI, USA). The parameters for the EFS were set at 60 V for 20 s, ranging from 2 to 16 Hz in square-wave pulses, with a pulse width of 0.3 ms and a delay of 0.1 ms. The tissues were equilibrated under a resting tension of 10 mN, and the isometric tension was recorded using a PowerLab system (ADInstruments, Sydney, Australia). After a 45-min stabilization period, the tissue's viability was assessed by contracting the strips with a single concentration of potassium chloride (KCl, 80 mM).

2.6. Chemical and reagents

Tetrodotoxin (TTX) was obtained from Cayman Chemicals (Michigan, USA). 6-nitrodopamine, 6-nitrodopamine- d_4 and 6-nitroadrenaline, were acquired from Toronto Research Chemicals (Ontario, CA). Dopamine- d_3 hydrochloride, D,L -noradrenaline- d_6 hydrochloride and adrenaline- d_6 hydrochloride were acquired from CDN Isotopes (Quebec, CA). 6-Nitrodopa and 6-cyanodopamine were synthesized at Rhodes College [20]. Strata™-X 33 mm Polymeric Reversed SPE cartridges were bought from Phenomenex (California, USA) and GIST-HP C_{18} columns were obtained from Shimadzu (Duisburg, Germany). Calcium chloride ($CaCl_2$), dextrose, magnesium sulfate ($MgSO_4$), potassium chloride (KCl), sodium bicarbonate ($NaHCO_3$), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) and sodium chloride (NaCl), were bought from Merck KGaA (Hesse, Germany). Acetonitrile and methanol were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and formic acid from Mallinckrodt (St Louis, Missouri, USA). The composition of the KHS was in mM: NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2 and dextrose 5.6.

2.7. Data analysis

The data are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean from n experiments. Values of EFS were expressed in mN. Student's two-tail unpaired t -test was employed to assess the differences between groups. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Basal release of catecholamines in vas deferens

Isolated vas deferens from control (Fig. 1A–F), $n\text{NOS}^{-/-}$ (Fig. 1A and B), $e\text{NOS}^{-/-}$ (Fig. 1C and D), and $i\text{NOS}^{-/-}$ (Fig. 1E and F) mice present basal release of both 6-ND and dopamine, as detected by LC-MS/MS. In $n\text{NOS}^{-/-}$ mice, the basal release of 6-ND from isolated vas deferens was significantly reduced (Fig. 1A), whereas the basal dopamine levels were significantly increased in $n\text{NOS}^{-/-}$ mice (Fig. 1B) when compared to control group. The basal release of both 6-ND (Fig. 1C) and dopamine (Fig. 1D) from $e\text{NOS}^{-/-}$ mice in vas deferens was not different compared to control group. The basal release of 6-ND was significantly increased in vas deferens of $i\text{NOS}^{-/-}$ compared to control mice (Fig. 1E), whereas that of dopamine was unaltered (Fig. 1F). The isolated vas deferens

obtained from control mice also presented basal release of noradrenaline and adrenaline, which were not significantly altered in preparations from $n\text{NOS}^{-/-}$, $e\text{NOS}^{-/-}$ or $i\text{NOS}^{-/-}$ mice (Table 1). Levels of 6-Nitrodopa, 6-cyanodopamine and 6-nitroadrenaline were below the limit of quantitation (0.1 ng/mL) in all samples. The values for dry and wet weight of the vas deferens are described in Supplementary Table S01.

3.2. Effect of tetrodotoxin (TTX) on the basal release of 6-ND and dopamine

Incubation (30 min) of isolated vas deferens from control mice with TTX (1 μM) caused a significant reduction in the basal release of 6-ND (Fig. 2A), and virtually abolished the basal release of dopamine (Fig. 2B). In contrast, in $n\text{NOS}^{-/-}$ mice, incubation (30 min) of vas deferens with TTX (1 μM) did not alter the basal release of 6-ND

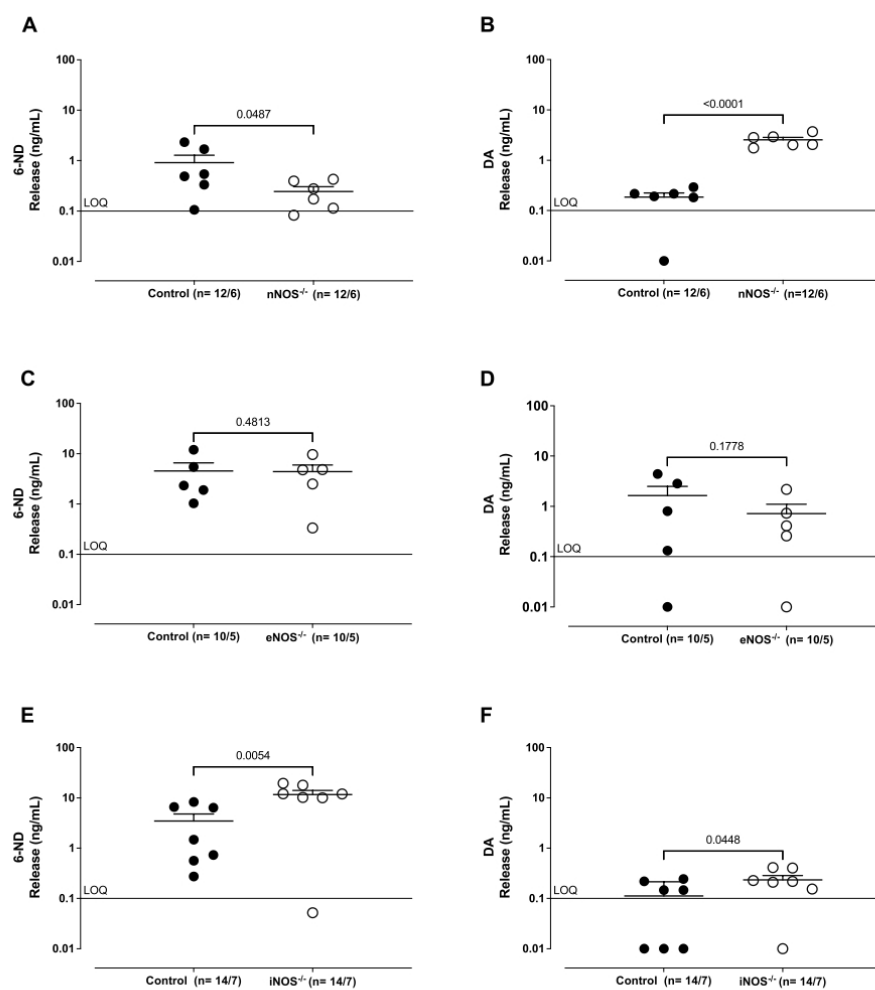


Fig. 1. Basal release of 6-nitrodopamine (6-ND) and dopamine (DA) from vas deferens obtained from control, $e\text{NOS}^{-/-}$, $n\text{NOS}^{-/-}$, and $i\text{NOS}^{-/-}$ mice. Release of 6-ND (Panels A, C and E) and DA (Panels B, D and F) was detected in Krebs-Henseleit's solution (KHS) by LC-MS/MS. The limit of quantification (LOQ) was 0.1 ng/mL. The number of vas deferens (n) is expressed as x/y, where x represents the number of animals and y the number of samples analyzed by LC-MS/MS. Data are shown as mean $\pm$ SEM and represent the value obtained from two pairs of vas deferens obtained from two mice.

Table 1

Basal release of noradrenaline and adrenaline from vas deferens obtained from control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice.

	Noradrenaline (ng/mL)	p-value	Adrenaline (ng/mL)	p-value	n
Control	0.41 ± 0.30		0.26 ± 0.12		12/6
nNOS ^{-/-}	0.61 ± 0.30	0.3214	0.33 ± 0.11	0.3359	12/6
Control	0.20 ± 0.08		0.59 ± 0.35		10/5
eNOS ^{-/-}	0.19 ± 0.10	0.4944	0.43 ± 0.35	0.1121	10/5
Control	0.35 ± 0.07		0.67 ± 0.19		14/7
iNOS ^{-/-}	0.32 ± 0.09	0.3951	0.42 ± 0.36	0.2064	14/7

LOQ – limit of quantitation (0.1 ng/mL). Data are shown as mean ± SEM and represent the value obtained from two pairs of vas deferens obtained from two mice.

(Fig. 2C), but significantly reduced the basal release of dopamine (Fig. 2D). In eNOS^{-/-} mice, incubation (30 min) of vas deferens with TTX (1 μM) virtually abolished the basal release of 6-ND (Fig. 2E) and significantly decreased the basal release of dopamine (Fig. 2F). Incubation (30 min) of vas deferens of iNOS^{-/-} mice with TTX (1 μM) provoked significant reductions in the basal release of 6-ND (Fig. 2G) and virtually abolished the release of dopamine (Fig. 2H).

3.3. Effect of L-NAME on the electric-field stimulation (EFS) induced contractions

Electric-field stimulation (EFS) induced frequency-dependent (2–32 Hz) contractions of the mouse isolated vas deferens (Fig. 3A–D). In vas deferens obtained from control mice, pre-incubation (30 min) of the L-NAME (100 μM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS (Fig. 3A). In contrast, in vas deferens obtained from nNOS^{-/-} mice, pre-incubation (30 min) with L-NAME (100 μM) did not alter the EFS-induced contractions of the vas deferens (Fig. 3B). In vas deferens obtained from eNOS^{-/-} mice, pre-incubation (30 min) with L-NAME (100 μM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS (Fig. 3C). In vas deferens obtained from iNOS^{-/-} mice, incubation (30 min) with L-NAME (100 μM) caused a significant reduction in the contractions induced by EFS (Fig. 3D).

3.4. Effect of electric-field stimulation (EFS) on the mouse isolated vas deferens

Electric-field stimulation (EFS) induced frequency-dependent (2–32 Hz) contractions of the mouse isolated vas deferens (Fig. 4A–C). The contractions induced by EFS were significantly decreased in vas deferens obtained from nNOS^{-/-} mice (Fig. 4A). However, the contractions remained unchanged in isolated vas deferens obtained from either eNOS^{-/-} (Fig. 4B) or iNOS^{-/-} (Fig. 4C) mice.

4. Discussion

The rat vas deferens preparation has been employed as a bioassay to study the physiology and pharmacology of the sympathetic neurotransmission [21], since from a practical view, the tissue contractility is believed to be due mainly to noradrenaline and ATP acting as the main sympathetic co-transmitters [1]. However, this concept should be reassessed.

Similar to that observed in rat [11] and human [12] isolated vas deferens, 6-ND is the major catecholamine released from mouse isolated vas deferens. In contrast to rat isolated atria and ventricles, where eNOS-derived 6-ND plays an essential role [10], the isoform responsible

for 6-ND release from mouse vas deferens is the nNOS since 6-ND release was only decreased in nNOS^{-/-} mice. Interestingly, the EFS-induced contractions were only reduced in the vas deferens obtained from nNOS^{-/-} mice. Another supporting evidence for the pivotal role of this NOS isoform is the finding that pre-incubation of vas deferens with the sodium channel blocker tetrodotoxin caused significant reductions in the basal release of 6-ND from control, eNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice, but failed to affect that of nNOS^{-/-} mice. However, in contrast to the classical catecholamines dopamine, noradrenaline, and adrenaline, it is unlikely that 6-ND is stored in nerve terminals. This concept is supported by the finding that an increase of dopamine release in vas deferens from nNOS^{-/-} mice parallels the decreased 6-ND levels. Indeed, in human isolated vas deferens, pre-treatment of the tissue with L-NAME decreases the 6-ND basal release with a concomitant similar increase in dopamine release [12]. A proposed biosynthetic pathway for 6-ND is depicted in Fig. 5.

6-Nitrodopamine has been proposed as a major modulator of both rat [11] and human vas deferens [12]. The results obtained with the contractions induced by EFS in the mouse vas deferens further support this novel concept, since the EFS-induced vas deferens contractions were only reduced in tissue obtained from nNOS^{-/-} mice. The reduced contractions in nNOS^{-/-} mice could be a consequence of the reduced 6-ND levels in vas deferens of these animals. It is not clear whether the reduced vas deferens contractility affects the ejaculatory process as the seminal vesicles [22]. nNOS^{-/-} mice are fertile [23] and the mating test in these animals are not significantly different from control mice [24]; however, this is believed to be due to higher eNOS expression in the endothelium of penile vasculature and sinusoidal endothelium within the corpora cavernosa of nNOS^{-/-} mice. Evaluation on whether seminal vesicles release 6-ND and its possible origin should provide further inside in the physiology of the ejaculatory process.

Although the neurotoxicity of 6-hydroxy-dopamine (6-OH dopamine) is reasonably established [25,26], that of 6-ND is unclear. For instance, the relative neurotoxicity of 6-ND versus that of 6-OH dopamine, when stereotaxic injected at low dose into the substantia nigra of laboratory rats, demonstrated that 6-ND was less toxic than 6-OH dopamine and other dopamine metabolites [27].

Another interesting observation was that although nNOS was pivotal for the 6-ND release, vas deferens from nNOS^{-/-} mice still presented some basal release of 6-ND and exhibited residual EFS-induced contractions. This apparent NOS independent biosynthetic pathway for 6-ND has been observed in vascular tissues treated with L-NAME and atria and ventricles obtained from eNOS^{-/-} mice [10] as well as in brain extracts from L-NAME-treated rats [28]. One possible pathway for nitrosation of dopamine, independent of NOS activity, would be reduction of endogenous nitrite/nitrate, since these ions are not only the products of metabolism of NO, but they can also act as reservoir [29]. Enzymes such as hemoglobin, myoglobin, xanthine oxidoreductase and cytochrome P450 reductase can catalyze the reduction of nitrite or nitrate to generate NO [30]. Peroxidases are iron-containing enzymes that can catalyze one- and two-electron oxidation reactions of small anionic molecules as electron donors, such as halides, thiocyanate and nitrite, with the hydrogen peroxide [31]. Nitrite (NO₂⁻) is a symmetrical anion and therefore can undergo either oxidation or reduction, generating nitrogen dioxide (*NO₂) or nitric oxide, respectively. Use of a triple knockout mice for NOS [32] should clarify whether this alternative pathway really exists.

5. Conclusion

The results clearly demonstrate that nNOS is the main NO isoform responsible for 6-ND release in mouse vas deferens and reinforces the concept of 6-ND as a major modulator of vas deferens contractility.

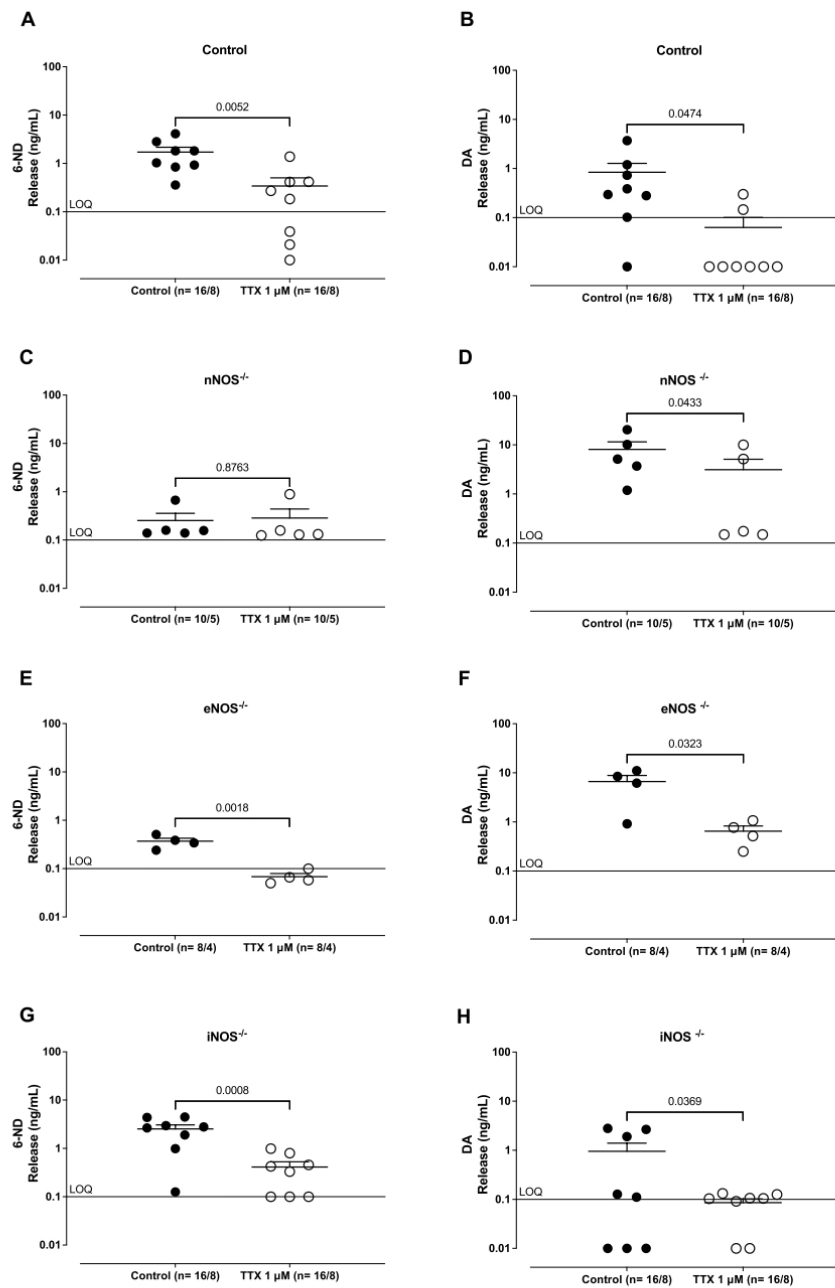


Fig. 2. Effect of tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) on the basal release of 6-nitrodopamine (6-ND) and dopamine (DA) from control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice isolated vas deferens. 6-ND (Panels A, C, E and G) and dopamine (Panels B, D, F and H) were detected in Krebs-Henseleit's solution (KHS) by LC-MS/MS. The limit of quantification (LOQ) was 0.1 ng/mL. The number of vas deferens (n) is expressed as x/y, where x represents the number of animals and y the number of samples analyzed by LC-MS/MS. Data are shown as mean $\pm$ SEM and represent the value obtained from two pairs of vas deferens obtained from two mice.

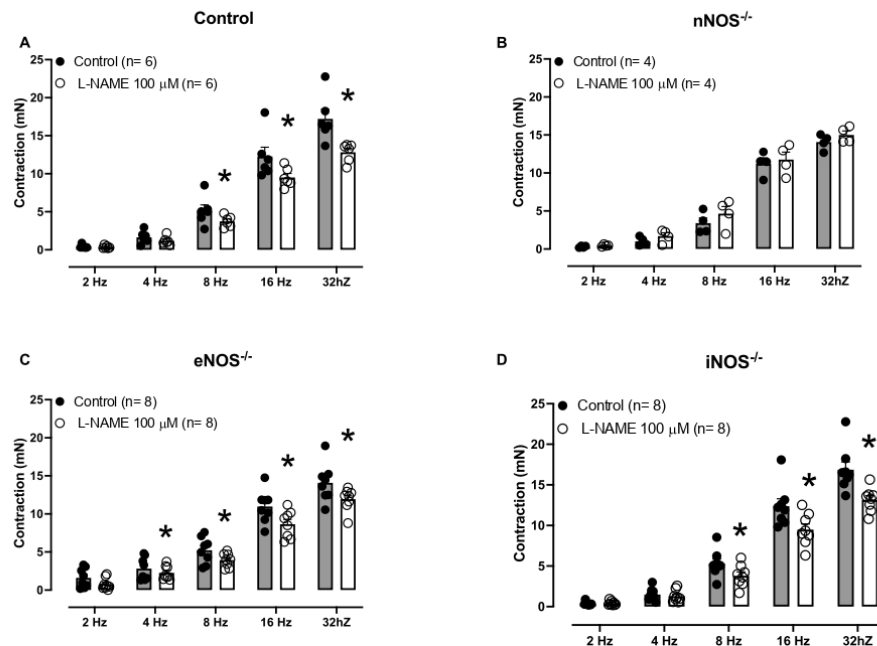


Fig. 3. Effect of L-NAME on the electric-field stimulation (EFS, 2–32 Hz) induced contraction in control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-} and iNOS^{-/-} mice. EFS-induced frequency-dependent contractions of the mouse isolated vas deferens. Pre-incubation (30 min) with L-NAME (100 μM) caused significant reductions in the contractions induced by EFS in control (Panel A), eNOS^{-/-} (Panel C), and iNOS^{-/-} (Panel D) mouse isolated vas deferens. Pre-incubation (30 min) with L-NAME (100 μM) caused no changes the contractions induced by EFS in isolated vas deferens obtained from nNOS^{-/-} mice (Panel B). *P < 0.05 compared with respective control group. Data are shown as mean ± SEM and each value was obtained from one vas deferens from one mouse.

Ethical approval

All experimental protocols were authorized by the Ethics Committee in Animal Use of UNICAMP (CEUA/UNICAMP, protocol numbers 5959–1/2022, 6087–1/2022 and 6067–1/2022).

5.1. Consent to participate

Not applicable.

6. Consent to publish

The authors authorize the submission and publication of this article in Nitric Oxide.

Funding

JBj thanks FAPESP for the post-doctoral fellowship (2021/14,414–8).
SGNS thanks CNPq for master's fellowship (131,161/2021–0).
ATL thanks FAPESP for PhD fellowship (2021/13,593–6).
VF thanks FAPESP for PhD fellowship (2022/07737–8).
LBA thanks FAPESP for scientific initiation fellowship (2023/03503–5).
SC thanks FAPESP (2017/06100–8).
EA thanks FAPESP (2017/15175–1).
GDN thanks FAPESP (2019/16,805–4) and CNPq (303,839/2019–8).

Availability of data and materials

The authors authorize the availability of any data used in this study.

CRediT authorship contribution statement

José Britto-Júnior: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Samuel Goulart Nacário Silva:** Methodology, Investigation. **Antonio Tiago Lima:** Methodology, Investigation. **Vivian Fuguera:** Methodology, Investigation. **Larissa Bueno Andrade:** Methodology, Investigation. **Gustavo Duarte Mendes:** Methodology, Investigation. **Larry W. Peterson:** Writing – original draft, Methodology. **Silvana Chiavegatto:** Writing – original draft, Investigation. **Edson Antunes:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization. **Gilberto De Nucci:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Formal analysis, Data curation.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing or financial interests.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author [JBj], upon reasonable request.

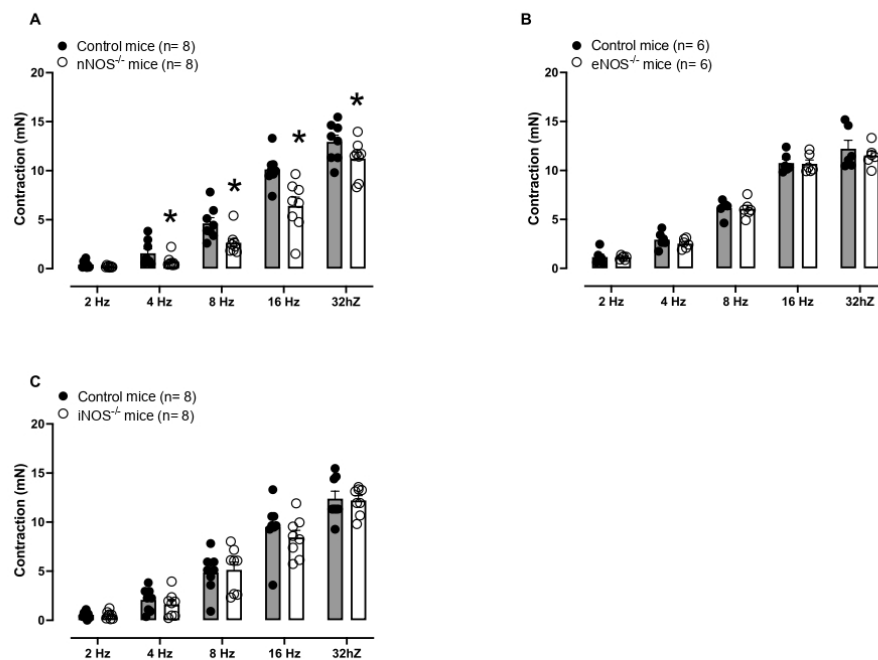


Fig. 4. Isolated vas deferens contractions induced by electric field stimulation (EFS, 2–32 Hz) in control, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-} and iNOS^{-/-} mice. EFS-induced vas deferens contractions in nNOS^{-/-} mice were significantly smaller compared with control mice (panel A). In isolated vas deferens from eNOS^{-/-} (panel B) and iNOS^{-/-} (panel C) mice, the amplitude of EFS-induced contractions did not significantly differ from control animals. *P < 0.05 compared with respective control group. Data are shown as mean ± SEM and each value was obtained from one vas deferens from one mouse.

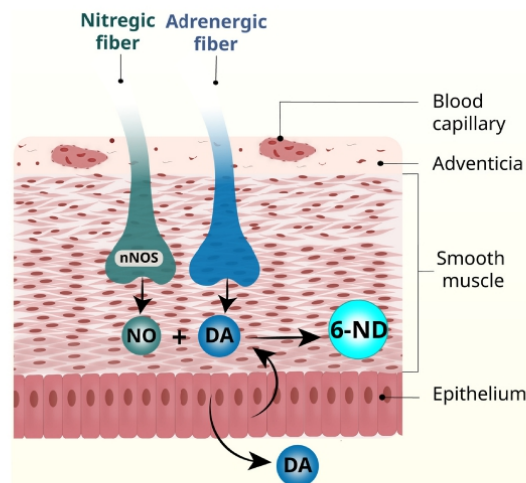


Fig. 5. Schematic representation of the role of nNOS on the release of 6-ND from mouse isolated vas deferens. Basal release of dopamine (DA) can be originated from adrenergic nerve terminals and from the epithelium. Nitrogenic nerve terminals express neuronal nitric oxide (NO) synthase (nNOS). Release of NO allows the “nitration” of dopamine, resulting in the formation of 6-nitrodopamine (6-ND).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.niox.2023.12.002>.

References

- [1] G. Burnstock, A. Verkhratsky, Vas deferens—a model used to establish sympathetic cotransmission, *Trends Pharmacol. Sci.* 3 (2010) 131–139, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.002>.
- [2] S. Huković, Responses of the isolated sympathetic nerve-ductus deferens preparation of the Guinea-pig, 1961, *Br. J. Pharmacol.* 120 (1997) 195–201, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1997.tb06799.x>.
- [3] S. Ceccatelli, J.M. Lundberg, X. Zhang, K. Aman, T. Hökfelt, Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system, *Brain Res.* 656 (12) (1994) 381–395, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91483-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91483-4).
- [4] J.A. Mitchell, H. Sheng, U. Förstermann, F. Murad, Characterization of nitric oxide synthases in non-adrenergic non-cholinergic nerve containing tissue from the rat anococcygeus muscle, *Br. J. Pharmacol.* 104 (1991) 289–291, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12422.x>.
- [5] S. Ventura, G. Burnstock, Variation in nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibres with age and along the length of the vas deferens in the rat, *Cell Tissue Res.* 285 (1996) 427–434, <https://doi.org/10.1007/s004410050659>.
- [6] J. Britto-Júnior, W.C. Coelho-Silva, G.F. Murari, C.E.S. Serpellone, F.Z. Mônica, E. Antunes, G. De Nucci, 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity, *Life Sci.* 276 (1) (2021), 119425, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119425>.
- [7] R. Campos, D.H.A. Pinheiro, J. Britto-Júnior, H.A. Castro, G.D. Mendes, M. O. Moraes, M.E.A. Moraes, R.A.B. Lopes-Martins, N.J. Antunes, G. De Nucci, 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.* 1173 (22) (2021), 122668, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122668>.
- [8] A.T. Lima, E.X. Santos, J. Britto-Júnior, V.B. Souza, A.A. Schenka, R. Campos, M. O. Moraes, M.E.A. Moraes, E. Antunes, G. De Nucci, Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of Pantherophis guttatus aortic rings, *Comp.*

- Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 262 (2022), 109471, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109471>.
- [9] J. Britto-Júnior, A.T. Lima, J.S. Santos-Xavier, P. Gonzalez, F.Z. Mônica, R. Campos, V.B. Souza, A.A. Schenka, E. Antunes, G. Nucci, Relaxation of thoracic aorta and pulmonary artery rings of marmosets (*Callithrix* spp.) by endothelium-derived 6-nitrodopamine, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 56 (7) (2023), e12622, <https://doi.org/10.1590/1414-431X2023e12622>.
- [10] J. Britto-Júnior, G.L. P. Prado, S. Chiavegatto, F. Cunha, M.O. Moraes, E. A. Moraes, F.Z. Monica, E. Antunes, G. De Nucci, 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, 138–139, *Nitric Oxide* 2 (2023) 26–33, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2023.06.001>.
- [11] J. Britto-Júnior, L. Ximenes, A. Ribeiro, A. Fregonesi, R. Campos, L.R.A. Kiguti, F. Z. Mônica, E. Antunes, G. De Nucci, 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation, *Eur. J. Pharmacol.* 911 (15) (2021), 174544, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174544>.
- [12] J. Britto-Júnior, W.P. Silva-Filho, A.C. Amorim, R. Campos, M. O Moraes, M.E. A. Moraes, A. Fregonesi, F.Z. Monica, E. Antunes, G. De Nucci, 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility, *Andrology* 10 (2022) 1540–1547, <https://doi.org/10.1111/andr.13263>.
- [13] J. Britto-Júnior, A. Ribeiro, L. Ximenes, A.T. Lima, F.F. Jacintho, A. Fregonesi, F. Z. Mônica, E. Antunes, G. De Nucci, Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens, *Eur. J. Pharmacol.* 915 (2022 Jan 15), 174716, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174716>. Epub 2021 Dec 22. PMID: 34951799.
- [14] J. Britto-Júnior, R.A.B. Guimarães, D.L. Oliveira, A.T. Lima, G.Q. Junior, G.A. O. Stocco, G. De Nucci, Alpha1-adrenergic antagonists act as 6-nitrodopamine receptor antagonists in the human vas deferens, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2023).
- [15] A.T. Lima, A.C. Amorim, J. Britto-Júnior, R.R. Campitelli, A. Fregonesi, F. Z. Mônica, E. Antunes, G. De Nucci, β_1 - and β_2 -adrenergic receptor antagonists block 6-nitrodopamine-induced contractions of the rat isolated epididymal vas deferens, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 395 (2022) 1257–1268, <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02268-6>.
- [16] M.L. Andersen, Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividade de ensino ou pesquisa científica, Conselho nacional de controle de experimentação animal, 794/2008, Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 11 (2016). art 22, inciso II.
- [17] N. Percie du Sert, V. Hurst, A. Ahluwalia, S. Alam, M.T. Avey, M. Baker, W. J. Browne, A. Clark, L.C. Cuthill, U. Dirnagl, M. Emerson, P. Garner, S.T. Holgate, D.W. Howells, N.A. Karp, S.E. Lazic, K. Lidster, C.J. MacCallum, M. Macleod, E. J. Pearl, O.H. Petersen, F. Rawle, P. Reynolds, K. Rooney, E.S. Sena, S. D. Silberberg, T. Steckler, H. Würbel, The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.* 14 (2020), e3000410, 7.
- [18] G.Q. Junior, J. Britto-Júnior, T.B. Magalhães, R. Campos, K.L. Nyamkondiwa, K. L. Klugh, L.W. Peterson, A. Corvino, R. Sparaco, F. Frentese, G. Caliendo, G. De Nucci, Measurement of 6-cyanodopamine, 6-nitrodopa, 6-nitrodopamine and 6-nitroadrenaline by LC-MS/MS in Krebs-Henseleit solution. Assessment of basal release from rabbit isolated right atrium and ventricles, *Biomed. Chromatogr.* 37 (2023), e5691, <https://doi.org/10.1002/bmc.5691>.
- [19] R. Meesters, S. Voswinkel, Bioanalytical method development and validation: from the USFDA 2001 to the USFDA 2018 guidance for industry, *J. Appl. Bioanal.* 4 (3) (2018) 67–73.
- [20] J.C. Rote, S.N. Malkowski, C.S. Cochrane, G.E. Bailey, N.S. Brown, M. Cafiero, L. W. Peterson, Catechol reactivity: Synthesis of dopamine derivatives substituted at the 6-position, *Syn. Commun.* 47 (2017) 435–441, <https://doi.org/10.1080/00397911.2016.1269350>.
- [21] L.C. Navarrete, N.P. Barrera, J.P. Huidobro-Toro, Vas deferens neuro-effector junction: from kymographic tracings to structural biology principles, *Auton. Neurosci.* 185 (2014) 8–28.
- [22] C.M. Forbes, R. Flannigan, D.A. Paduch, Perineal ultrasound: a review in the context of ejaculatory dysfunction, *Sex Med Rev* 6 (2018) 419–428, <https://doi.org/10.1016/j.jsxmr.2017.12.005>.
- [23] P.L. Huang Huang, T.M. Dawson, D.S. Bredt, S.H. Snyder, M.C. Fishman, Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene, *Cell* 31 (75) (1993) 1273–1286, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90615-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90615-w).
- [24] A.L. Burnett, R.J. Nelson, D.C. Calvin, J.X. Liu, G.E. Demas, S.L. Klein, L. J. Kriegsfeld, V.L. Dawson, T.M. Dawson, S.H. Snyder, Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase, *Mol. Med.* 2 (1996) 288–296.
- [25] C. Sachs, G. Jonsson, Effects of 6-hydroxydopamine on central noradrenergic neurons during ontogeny, *Brain Res.* 99 (5) (1975) 277–291, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90029-3). PMID: 1182547.
- [26] R.M. Kostrzewa, D.M. Jacobowitz, Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine, *Pharmacol. Rev.* 26 (3) (1974) 199–288.
- [27] A. Palumbo, A. Napolitano, P. Barone, M. d'Ischia, Nitrite- and peroxide-dependent oxidation pathways of dopamine: 6-nitrodopamine and 6-hydroxydopamine formation as potential contributory mechanisms of oxidative stress- and nitric oxide-induced neurotoxicity in neuronal degeneration, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 1213–1222, <https://doi.org/10.1021/tx990121g>.
- [28] F. Shintani, T. Kinoshita, S. Kanba, T. Ishikawa, E. Suzuki, N. Sasakawa, R. Kato, M. Asai, T. Nakaki, Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain, *J. Biol. Chem.* 271 (7) (1996) 13561–13565, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13561>.
- [29] K. Chen, R.N. Pittman, A.S. Popel, Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective, *Antioxidants Redox Signal.* 10 (2008) 1185–1198, <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1959>.
- [30] Y. Zhao, P.M. Vanhoutte, S. W. Leung, Vascular nitric oxide: beyond eNOS, *J. Pharmacol. Sci.* 129 (2015) 83–94, <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.
- [31] J. Arnold, E. Monzani, P.G. Furtmüller, M. Zederbauer, L. Casella, C. Obinger, Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian heme peroxidases, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2006) 3801–3811.
- [32] M. Tsutsui, A. Tanimoto, A. Tamura, H. Mukae, N. Yanagihara, H. Shimokawa, Y. Otsuji, Significance of nitric oxide synthases: lessons from triple nitric oxide synthases null mice, *J. Pharmacol. Sci.* 127 (2015) 42–52, <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.10.002>.

5. RESULTADOS

Vide Artigo: *The pivotal role of neuronal nitric oxide synthase in the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated vas deferens.*

Autores: José Britto-Júnior¹, Samuel Goulart Nacácio e Silva², Antonio Tiago Lima², Vivian Fuguhara², Larissa Bueno Andrade², Gustavo Duarte Mendes³, Larryn W. Peterson⁴, Silvana Chiavegatto⁵, Edson Antunes², Gilberto De Nucci⁶.

1. **Faculty of Medical Sciences**, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. Electronic address: josebrittojr@dac.unicamp.br.

2. **Faculty of Medical Sciences**, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

3. **Department of Pharmacology**, Faculty of Medicine, São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil; Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Metropolitan University of Santos, Santos, SP, Brazil.

4. **Department of Chemistry**, Rhodes College, Memphis, TN, USA.

5. **Department of Pharmacology**, Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of Sao Paulo (USP), São Paulo, Brazil; Department of Psychiatry, Institute of Psychiatry (IPq), University of Sao Paulo Medical School (FMUSP), São Paulo, Brazil.

6. **Faculty of Medical Sciences**, Department of Pharmacology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil; Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Metropolitan University of Santos, Santos, SP, Brazil; Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of Sao Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

Revista: Nitric Oxide | **Fator de Impacto:** 4.898 (2021).

PMID: 38096948 | **DOI:** 10.1016/j.niox.2023.12.002

Situação: Aceito a publicação em 10 de dezembro de 2023. Publicado *online* em 12 de dezembro de 2023.

6. DISCUSSÃO

Assim como observado em ratos e em humanos, este estudo demonstrou que a principal catecolamina liberada pelos ductos deferentes isolados de camundongos é a 6ND (BRITTO-JÚNIOR et al., 2021b, 2022c). Tal achado nos leva a questionar qual o verdadeiro papel da transmissão adrenérgica nesse processo.

Os resultados deste estudo mostraram que a liberação basal de 6ND reduziu apenas nos camundongos nNOS-. Tal achado sugere que a nNOS é a isoforma da NOS responsável pela síntese da 6ND nos canais deferentes isolados de camundongos, diferentemente do encontrado nos átrio e ventrículo de ratos, onde a eNOS se mostrou a isoforma mais importante para essa síntese (BRITTO-JÚNIOR et al., 2023c). Avaliando-se a contratilidade induzida por estímulo elétrico (EFS), percebe-se que apenas os ductos deferentes isolados de camundongos nNOS- apresentaram redução na sua força contrátil, o que reforça a importância dessa isoforma neste órgão. Tendo em vista esses dados, podemos pressupor que a 6ND é essencial para a contração dos ductos deferentes de camundongos pois a sua liberação foi reduzida nos animais nNOS- e, esses mesmos animais apresentaram redução na contratilidade induzida por estímulo elétrico. Tal fato está em concordância com o que já foi demonstrado para os canais deferentes de ratos e humanos (BRITTO-JÚNIOR et al., 2021b, 2022c). A pré incubação dos canais deferentes com tetrodotoxina, um bloqueador neuronal, provocou redução na liberação de 6ND nos animais eNOS- e iNOS-, mas não interferiu no quantificado nos animais nNOS-. Esse fato reforça o papel da nNOS na liberação de 6ND nos canais deferentes de camundongos pois nos animais nNOS- não havia como reduzir a liberação de 6ND uma vez que a ausência da nNOS por si só já provocava essa redução, ao contrário do que aconteceu com os demais camundongos que apresentavam a nNOS ativa.

Um achado interessante foi a detecção de um aumento na quantidade basal de dopamina liberada dos canais deferentes isolados dos camundongos nNOS-, em contraste com a queda da 6ND nesses animais. Este fato nos permite pressupor que a 6ND não é estocada nos terminais nervosos como acontece com as catecolaminas clássicas. Provavelmente, a 6ND é formada na fenda sináptica a partir de uma reação entre a dopamina liberada por fibras adrenérgicas e o NO liberado de terminais nitrérgicos.

Apesar da contratilidade dos canais deferentes isolados de camundongos nNOS- ter reduzido, não está claro se a contratilidade reduzida desse órgão afeta o processo ejacutório (FORBES; FLANNIGAN; PADUCH, 2018). Camundongos nNOS- são férteis e o acasalamento nesses animais é muito semelhante ao de animais controle (BURNETT et al., 1996; HUANG et al., 1993). Acredita-se que a ausência da nNOS é compensada por um aumento da expressão da eNOS no endotélio sinusoidal dentro do corpo cavernoso e no endotélio da vasculatura peniana. A fim de se compreender melhor o

processo ejaculatório seria interessante estudar se a 6ND é liberada pelas vesículas seminais e qual a sua origem neste órgão.

Ao contrario do que já se sabe a respeito da neurotoxicidade da 6-hidroxi-dopamina (6-OH dopamina), a neurotoxicidade da 6ND não está bem estabelecida (KOSTRZEWA; JACOBOWITZ, 1974; SACHS; JONSSON, 1975). Palumbo e colegas demonstraram, por meio da injeção de 6ND e 6-OH dopamina na substância nigra de ratos de laboratório, que a 6ND era menos tóxica que 6-OH dopamina e outros metabólitos da dopamina (PALUMBO et al., 1999b).

Interessantemente, apesar do papel essencial da nNOS para a liberação de 6ND, os canais deferentes de camundongos nNOS- ainda apresentavam alguma liberação basal de 6-ND e exibiam contrações residuais induzidas pelo estímulo elétrico. Tal fato nos leva a crer que haja uma via alternativa para a síntese de 6ND independente da NOS. Tecidos vasculares tratados com L-NAME, assim como átrios e ventrículos de camundongos eNOS-/-, e extratos cerebrais de ratos tratados com L-NAME, também demonstraram liberação basal de 6ND (BRITTO-JÚNIOR et al., 2023c; SHINTANI et al., 1996). Uma possibilidade para a nitrosação da dopamina de forma independente da NOS seria por meio do NO advindo da redução no nitrito/nitrato endógeno. Esses íons não são apenas produtos do metabolismo do NO, mas também podem funcionar como reservatório de NO (CHEN; PITTMAN; POPEL, 2008). A redução de nitrito ou nitrato para a geração de NO pode ser catalisada por diversas enzimas como a hemoglobina, mioglobina, xantina oxidoreductase e citocromo P450 (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). As peroxidases são enzimas que contêm ferro e têm a capacidade de catalisar reações de oxidação de uma e duas unidades elétricas em pequenas moléculas aniônicas, como doadoras de elétrons, como haletos, tiocianato e nitrito, utilizando peróxido de hidrogênio (ARNHOLD et al., 2006). O nitrito (NO_2^-) é um ânion simétrico, e, por conseguinte, pode ser oxidado ou reduzido, resultando em dióxido de nitrogênio (NO_2) ou óxido nítrico, respectivamente. A utilização de camundongos knockout triplo para NOS deve fornecer esclarecimentos quanto à existência real dessa via alternativa (TSUTSUI et al., 2015).

7. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo demonstram o papel fundamental da 6ND como moduladora da contratilidade dos canais deferentes isolados de camundongos e que a principal isoforma da NOS responsável pela síntese dessa nitrocatecolamina é a nNOS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 7, p. 1297–302, 1 out. 1996.
- AHLQUIST, R. P. A STUDY OF THE ADRENOTROPIC RECEPTORS. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 153, n. 3, p. 586–600, 1 jun. 1948.
- ALEXOPOULOS, G. S. Mechanisms and Treatment of Late-Life Depression. **FOCUS**, v. 19, n. 3, p. 340–354, jul. 2021.
- ALM, P. On the autonomic innervation of the human vas deferens. **Brain Research Bulletin**, v. 9, n. 1–6, p. 673–677, jul. 1982.
- ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 2, p. 349–360, fev. 1993.
- ARNHOLD, J. et al. Kinetics and Thermodynamics of Halide and Nitrite Oxidation by Mammalian Heme Peroxidases. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2006, n. 19, p. 3801–3811, 20 out. 2006.
- BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, mar. 2011.
- BLACK, J. W. Ahlquist and the development of beta-adrenoceptor antagonists. **Postgraduate medical journal**, v. 52 Suppl 4, p. 11–13, 1976.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 3–11, jan. 1992.
- BRITTO-JÚNIOR, J. et al. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. **Life Sciences**, v. 276, 1 jul. 2021a.
- BRITTO-JÚNIOR, J. et al. 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. **European Journal of Pharmacology**, v. 911, 15 nov. 2021b.
- BRITTO-JÚNIOR, J. et al. Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens. **European Journal of Pharmacology**, v. 915, 15 jan. 2022a.
- BRITTO-JÚNIOR, J. et al. 6-Nitrodopamine is an endogenous modulator of rat heart chronotropism. **Life Sciences**, v. 307, p. 120879, out. 2022b.
- BRITTO-JÚNIOR, J. et al. 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility. **Andrology**, v. 10, n. 8, p. 1540–1547, 1 nov. 2022c.
- BRITTO-JÚNIOR, J. et al. Relaxation of thoracic aorta and pulmonary artery rings of marmosets (*Callithrix* spp.) by endothelium-derived 6-nitrodopamine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 56, 2023a.
- BRITTO-JÚNIOR, J. et al. Alpha1-adrenergic blockers selectively antagonize the contractions induced by 6-nitrodopamine in the human vas deferens. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2023b.
- BRITTO-JÚNIOR, J. 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 - Biology and Chemistry**, v. 138–139, p. 26–33, 1 set. 2023c.
- BROCK, J. A.; HANDELSMAN, D. J.; KEAST, J. R. Postnatal androgen deprivation dissociates the development of smooth muscle innervation from functional neurotransmission in mouse vas deferens. **Journal of Physiology**, v. 581, n. 2, p. 665–678, 1 jun. 2007.
- BROOKS, D. J. Functional imaging studies on dopamine and motor control. **Journal of Neural Transmission**, v. 108, n. 11, p. 1283–1298, 1 nov. 2001.

- BURNETT, A. L. et al. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 2, n. 3, p. 288–96, maio 1996.
- BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Vas deferens - A model used to establish sympathetic cotransmission. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 131–139, mar. 2010.
- BYLUND, D. B. et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 2, p. 121–36, jun. 1994.
- CAMPOS, R. 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. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1173, 30 maio 2021.
- CARLSSON, A. Detection and assay of dopamine. **Pharmacological reviews**, v. 11, n. 2, Part 2, p. 300–4, jun. 1959.
- CECCATELLI, S. et al. Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system. **Brain Research**, v. 656, n. 2, p. 381–395, 1994.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. ÓXIDO NÍTRICO. **REVISÃO Acta Cirúrgica Brasileira**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>.
- CHEN, K.; PITTMAN, R. N.; POPEL, A. S. Nitric Oxide in the Vasculature: Where Does It Come From and Where Does It Go? A Quantitative Perspective. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 7, p. 1185–1198, jul. 2008.
- CHIARI, A. et al. Formation of 6-nitro-norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. **Neuroscience**, v. 101, n. 1, p. 189–196, out. 2000.
- CONGER, J. D. Endothelial Regulation of Vascular Tone. **Hospital Practice**, v. 29, n. 10, p. 117–126, 15 out. 1994.
- COSTA, K. M.; SCHOENBAUM, G. Dopamine. **Current biology : CB**, v. 32, n. 15, p. R817–R824, 8 ago. 2022.
- DAVIES, M. G.; FULTON, G. J.; HAGEN, P. O. Clinical biology of nitric oxide. **The British journal of surgery**, v. 82, n. 12, p. 1598–610, dez. 1995.
- DAVIES, M. G.; FULTON, G. J.; HAGEN, P.-O. Clinical biology of nitric oxide. **British Journal of Surgery**, v. 82, n. 12, p. 1598–1610, 8 dez. 2005.
- DE OLIVEIRA, L. F. G. et al. Release of 6-nitrodopamine from human popliteal artery and vein. **Life Sciences**, v. 326, p. 121801, ago. 2023.
- DIXON, J. S.; JEN, P. Y. P. Development of nerves containing nitric oxide synthase in the human male urogenital organs. **British Journal of Urology**, v. 76, n. 6, p. 719–725, 17 dez. 1995.
- DIXON, J. S.; JEN, P. Y. P.; GOSLING, J. A. Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: A review. **Microscopy Research and Technique**, v. 42, n. 6, p. 423–432, 15 set. 1998.
- EISENHOFER, G.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 331–349, set. 2004.
- FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 55, n. 1, p. 7–20, jan. 1996a.
- FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 55, n. 1, p. 7–20, 1 jan. 1996b.
- FORBES, C. M.; FLANNIGAN, R.; PADUCH, D. A. Perineal Ultrasound: a Review in the Context of Ejaculatory Dysfunction. **Sexual Medicine Reviews**, v. 6, n. 3, p. 419–428, jul. 2018.

- FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1121–31, jun. 1994.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, nov. 1980.
- GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Monoamine Transporters: From Genes to Behavior. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 261–284, abr. 2003.
- GIBALDI, M. What is Nitric Oxide and Why Are So Many People Studying It? **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 6, p. 488–496, 8 jun. 1993.
- GILSBACH, R.; HEIN, L. Are the pharmacology and physiology of α_2 adrenoceptors determined by α_2 -heteroreceptors and autoreceptors respectively? **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 90–102, 6 jan. 2012.
- HIEBLE, J. P.; BONDINELL, W.; RUFFOLO, R. R. .alpha.- and .beta.-Adrenoceptors: From the Gene to the Clinic. Part 1. Molecular Biology and Adrenoceptor Subclassification. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 18, p. 3415–3444, 1 set. 1995.
- HOFFER, A. P. The Ultrastructure of the Ductus Deferens in Man'. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 14, p. 425–443, 1976.
- HORNYKIEWICZ, O. THE ACTION OF DOPAMINE ON THE ARTERIAL BLOOD PRESSURE OF THE GUINEA-PIG. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 13, n. 1, p. 91–94, 19 mar. 1958.
- HORNYKIEWICZ, O. Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Zentralnervensystem und seine Beziehung zum Parkinson-Syndrom des Menschen. **DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 87, n. 36, p. 1807–1810, 16 set. 1962.
- HORNYKIEWICZ, O. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. **Amino Acids**, v. 23, n. 1–3, p. 65–70, 1 set. 2002.
- HORNYKIEWICZ, O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. Em: **Parkinson's Disease and Related Disorders**. Vienna: Springer Vienna, 2006. p. 9–15.
- HUANG, P. L. et al. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1273–1286, dez. 1993.
- HUKOVIC, S. Responses of the isolated sympathetic nerve-ductus deferens preparation of the guinea-pig. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 4 SUPPL., p. 195–201, 1997.
- JEN, P. Y. et al. Nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase are colocalized in nerves supplying the postnatal human male genitourinary organs. **The Journal of urology**, v. 155, n. 3, p. 1117–21, mar. 1996.
- JÚNIOR, G. Q. et al. Measurement of 6-cyanodopamine, 6-nitrodopa, 6-nitrodopamine and 6-nitroadrenaline by LC–MS/MS in Krebs–Henseleit solution. Assessment of basal release from rabbit isolated right atrium and ventricles. **Biomedical Chromatography**, v. 37, n. 9, 1 set. 2023.
- KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric Oxide: *Biochemistry, Pathophysiology, and Detection*. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 100, n. 5, p. 567–575, 1 nov. 1993.
- KOPIN, I. J. et al. Different relationships of spillover to release of norepinephrine in human heart, kidneys, and forearm. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n. 1, p. R165–R173, 1 jul. 1998.
- KOSHLAND, D. E. The Molecule of the Year. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1861–1861, 18 dez. 1992.
- KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWITZ, D. M. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. **Pharmacological reviews**, v. 26, n. 3, p. 199–288, set. 1974.
- KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The Emerging Multifaceted Roles of Nitric Oxide. **Annals of Surgery**, v. 221, n. 3, p. 220–235, mar. 1995.

- LAKATTA, E. G. Catecholamines and cardiovascular function in aging. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 877–91, dez. 1987.
- LIMA, A. T. et al. β_1 - and β_1/β_2 -adrenergic receptor antagonists block 6-nitrodopamine-induced contractions of the rat isolated epididymal vas deferens. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2022a.
- LIMA, A. T. et al. Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of Pantherophis guttatus aortic rings. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 262, 1 dez. 2022b.
- LOSCALZO, J. Nitric Oxide Insufficiency, Platelet Activation, and Arterial Thrombosis. **Circulation Research**, v. 88, n. 8, p. 756–762, 27 abr. 2001.
- LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell**, v. 70, n. 5, p. 705–707, set. 1992.
- LYONS, C. R. The Role of Nitric Oxide in Inflammation. Em: [s.l: s.n.]. p. 323–371.
- MCCONNELL, J.; BENSON, G. S.; WOOD, J. G. Autonomic innervation of the urogenital system: adrenergic and cholinergic elements. **Brain Research Bulletin**, v. 9, n. 1–6, p. 679–694, jul. 1982.
- M.D. BARRACHINA, B. S. P.; J. PANES, B. S. P.; J.V. ESPLUGUES, B. S. P. Role of Nitric Oxide in Gastrointestinal Inflammatory and Ulcerative Diseases: Perspective for Drugs Development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 1, p. 31–48, 1 jan. 2001.
- MISSALE, C. et al. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189–225, 1 jan. 1998.
- MITCHELL, J. A. et al. Characterization of nitric oxide synthases in non-adrenergic non-cholinergic nerve containing tissue from the rat anococcygeus muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 2, p. 289–291, 1991.
- MOLINOFF, P. B.; AXELROD, J. Biochemistry of Catecholamines. **Annual Review of Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 465–500, jun. 1971.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–42, jun. 1991.
- MURRELL, G. A. et al. Nitric oxide: an important articular free radical. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 78, n. 2, p. 265–74, fev. 1996.
- NAGATS, T. Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. **Neuroscience Research**, v. 12, n. 2, p. 315–345, out. 1991.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 12, p. 3051–64, set. 1992.
- NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia**, v. 43, n. 5, p. 533–549, 2 maio 2000.
- OWMAN, C.; SJOSTRAND, N. O. Short adrenergic neurons and catecholamine-containing cells in vas deferens and accessory male genital glands of different mammals. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 66, n. 2, p. 300–320, 1965.
- PALUMBO, A. et al. Nitrite- and Peroxide-Dependent Oxidation Pathways of Dopamine: 6-Nitrodopamine and 6-Hydroxydopamine Formation as Potential Contributory Mechanisms of Oxidative Stress- and Nitric Oxide-Induced Neurotoxicity in Neuronal Degeneration. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 12, p. 1213–1222, 1 dez. 1999a.
- PALUMBO, A. et al. Nitrite- and Peroxide-Dependent Oxidation Pathways of Dopamine: 6-Nitrodopamine and 6-Hydroxydopamine Formation as Potential Contributory Mechanisms of Oxidative Stress- and Nitric Oxide-Induced Neurotoxicity in Neuronal Degeneration. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 12, p. 1213–1222, 1 dez. 1999b.

- RAND, M. J. NITRERGIC TRANSMISSION: NITRIC OXIDE AS A MEDIATOR OF NON-ADRENERGIC, NON-CHOLINERGIC NEURO-EFFECTOR TRANSMISSION. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 3, p. 147–169, 28 mar. 1992.
- RICHTER, D. Adrenaline and amine oxidase. **Biochemical Journal**, v. 31, n. 11, p. 2022–2028, 1 nov. 1937.
- SACHS, C.; JONSSON, G. Effects of 6-hydroxydopamine on central noradrenaline neurons during ontogeny. **Brain Research**, v. 99, n. 2, p. 277–291, dez. 1975.
- SHAPIRA, S.; KADAR, T.; WEISSMAN, B. A. Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. **Brain Research**, v. 668, n. 1–2, p. 80–84, dez. 1994.
- SHINTANI, F. et al. Bioactive 6-Nitronorepinephrine Identified in Mammalian Brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 23, p. 13561–13565, jun. 1996.
- SHIRAI, M.; SASAKI, K.; RIKIMARU, A. A Histochemical Investigation of the Distribution of Adrenergic and Cholinergic Nerves in the Human Male Genital Organs. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 111, n. 3, p. 281–291, 1973.
- SIBLEY, D. R.; MONSMA, F. J. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 61–69, jan. 1992.
- SMEETS, W. J. A. J.; GONZÁLEZ, A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. **Brain Research Reviews**, v. 33, n. 2–3, p. 308–379, set. 2000.
- STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1898–1902, 18 dez. 1992.
- TSUNODA, M. et al. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1–2, p. 162–166, set. 2007.
- TSUTSUI, M. et al. Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 42–52, jan. 2015.
- VENTURA, S.; BURNSTOCK, G. Variation in nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibres with age and along the length of the vas deferens in the rat. **Cell Tissue Res**, v. 285, n. 3, p. 427–434, 1996.
- WENNEMALM, Å. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 235, n. 4, p. 317–327, 3 abr. 1994.
- WONG, G. K.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 11, n. 1, p. 215–20, jan. 1996.
- ZENG, C. et al. The dopaminergic system in hypertension. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 112, n. 12, p. 583–97, jun. 2007.
- ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, out. 2015.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. Nitric oxide and angiogenesis. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 50, n. 1/2, p. 139–148, 2000.

9. ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CARTA DE SOLICITAÇÃO – INCLUSÃO DE NOVO(S) MEMBRO(S) EXECUTOR(ES)

À CEUA/UNICAMP,

Eu, Gilberto De Nucci, pesquisador responsável pelo protocolo CEUA/UNICAMP de número:

6087-1/2022, Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knowkout eNos,

6067-1/2022, Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knowkout iNos,

5959-1/2022, Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knowkout nNos,

5746-1/2021, Avaliação da ação fisiológica in vivo e in vitro de receptores alfa-adrenérgicos em ratos Wistar,

5831-1/2021, Avaliação da ação fisiológica e farmacológica in vivo e in vitro de receptores nitrodopamina em ratos Wistar tratado com L-NAME cronicamente, cujo(s) executor(es) são Prof.Dr .Gilberto De Nucci e José Britto Júnior, solicito à CEUA/UNICAMP a inclusão de novo(s) membro(s) executor(es), Samuel Goulart Nacácio e Silva, RA 118659 e Lincoln Rangel de Medeiros Teixeira, RA 219199

Justificativa para a inclusão dos novos membros executores:

O Projeto acima faz parte dos seu projeto de pesquisa de mestrado de ambos os alunos

CEUA/UNICAMP
Rua Monteiro Lobato, 80
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521 – 6359
E-mail: comisib@unicamp.br

https://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_principal



CEUA/Unicamp

Declaro que não houve/haverá qualquer alteração em relação ao tipo de animais utilizados, número total, grupos e procedimentos experimentais originalmente enviados e aprovados pela CEUA/UNICAMP.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Pesquisador Responsável

Informação importante:

- O(s) certificado(s) de realização de curso de manipulação animal e legislação do(s) novo(s) executor(es) deve(m) ser encaminhado(s) juntamente com esta solicitação.

CEUA/UNICAMP
Rua Monteiro Lobato, 80
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521 – 6359
E-mail: comisib@unicamp.br

https://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_principal



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knockout nNos**, registrada com o nº **5959-1/2022**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Gilberto De Nucci e JOSE BRITTO JUNIOR, ANTONIO TIAGO SILVA LIMA, Felipe Fernandes Jacintho, AMANDA CONSULIN AMORIM**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **21/03/2022**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2022 a 01/04/2025
Vigência da autorização para manipulação animal:	21/03/2022 a 01/04/2025
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos

CERTIFICADO CEUA nº 55/2022

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Origem:	Instituto de Medicina Tropical- BIOTÉRIO DE EXPERIMENTAÇÃO
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **28 de março de 2022**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 01/04/2022, às 09:27 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 31/03/2022, às 10:05 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
C0BD195B A5A34C40 85B57D2B B18D752B





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knockout eNos**, registrada com o nº **6067-1/2022**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Gilberto De Nucci e José Britto Júnior, Antônio Tiago Silva Lima**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **15/08/2022**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	04/08/2022 a 01/07/2027
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/08/2022 a 01/07/2027
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J

CER/176/2022-CEUA nº 217/2022

INTRANET IB

No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **03 de agosto de 2022.**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 03/08/2022, às 18:28 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **CÍNTIA BAÚ BETIM CAZARIN, VICE-PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 04/08/2022, às 09:03 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
32C85B04 69F547E7 82B619F9 AD1A8FB6



CERTIFICADO CEUA nº 260/2022

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da ação farmacológica in vitro de receptores nitrodopamina em camundongos knockout iNos**, registrada com o nº **6087-1/2022**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Gilberto De Nucci e José Britto Júnior, Antônio Tiago Silva Lima**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **19/09/2022**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	21/09/2022 a 21/09/2026
Vigência da autorização para manipulação animal:	19/09/2022 a 21/09/2026
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
 Informar código 44D82B56 10BE496A 8DD48572 5FA45F52

CERTIFICADO CEUA nº 260/2022

No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6 inos Ko/JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 12.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **29 de setembro de 2022.**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 44D82B56 10BE496A 8DD48572 5FA45F52

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 30/09/2022, às 07:39 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 29/09/2022, às 13:49 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
44D82B56 10BE496A 8DD48572 5FA45F52





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **SAMUEL GOULART NACÁCIO E SILVA** concluiu o curso "**Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**" oferecido, de forma on line, pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP** e com carga horária de 30 horas.

Este certificado tem validade de 05 (cinco) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 02 novembro 2023.


Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Coordenadora da CEUA/UNICAMP