



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GABRIEL AUGUSTO OLIVEIRA STOCCO

**6-NITRODOPAMINA É UM MEDIADOR ENDÓGENO DA
CONTRATILIDADE DA VESÍCULA SEMINAL DE RATO**

6-NITRODOPAMINE IS AN ENDOGENOUS MEDIATOR OF RAT
SEMINAL VESICLE CONTRACTILITY

CAMPINAS
2025

GABRIEL AUGUSTO OLIVEIRA STOCCO

**6-NITRODOPAMINA É UM MEDIADOR ENDÓGENO DA
CONTRATILIDADE DA VESÍCULA SEMINAL DE RATO**

**6-NITRODOPAMINE IS AN ENDOGENOUS MEDIATOR OF RAT
SEMINAL VESICLE CONTRACTILITY**

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

Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmacology

ORIENTADOR: Prof. Dr. Andre Almeida Schenka

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO GABRIEL AUGUSTO OLIVEIRA STOCCO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. ANDRE ALMEIDA SCHENKA

CAMPINAS
2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8402

St62s Stocco, Gabriel Augusto Oliveira, 1999-
6-nitrodopamina é um mediador endógeno da contratilidade da vesícula seminal de rato / Gabriel Augusto Oliveira Stocco. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: André Almeida Schenka.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. 6-nitrodopamina. 2. Catecolaminas. 3. Vesícula seminal. 4. Relação dose-resposta a droga. 5. Imuno-histoquímica. I. Schenka, Andre Almeida, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: 6-nitrodopamine is an endogenous mediator of rat seminal vesicle contractility

Palavras-chave em inglês:

6-nitrodopamine
Catecholamines
Seminal vesicles
Dose-response relationship, Drug
Immunohistochemistry

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Andre Almeida Schenka [Orientador]
Icléia Siqueira Barreto
Fabiano Beraldi Calmasini

Data de defesa: 08-01-2025

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 3. Saúde e bem-estar

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0006-3648-9284>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9661326832714105>

PROF. DR. ANDRE ALMEIDA SCHENKA

PROFA. DRA. ICLÉIA SIQUEIRA BARRETO

PROF. DR. FABIANO BERARDI CALMASINI

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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Gilberto de Nucci por abrir as portas da pesquisa através da FCM-Unicamp, quando eu estava no segundo ano da graduação de ciências farmacêuticas, ao Professor Andre Schenka por aceitar me orientar, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado (001 - 88887.711760/2022-00) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio (2019/16805-4). Ao Professor Stephen Hyslop, por me ensinar diferentes maneiras de enxergar a ciência e interpretar os dados que nos são apresentados. Aos colegas Rafael de Moraes Campos, Antonio Tiago Silva Lima e José Britto Júnior pelo treinamento nas técnicas de experimentação e procedimentos laboratoriais. A Erick Gomes, pela amizade, apoio e direcionamentos. A Felipe Caliani Mathias-Netto pela parceria nos experimentos aos finais de semana, no departamento. Às funcionárias Maria Aparecida Moreira e Ana Maria Cardoso Veras, amigas que tornaram esse ciclo mais confortável. Às minhas queridas professoras da graduação, em especial Juliana Signori Baracat Zeferino, Maria Aparecida Medeiro Barros do Prado e Andressa Polidoro que me inspiraram e me motivaram profissionalmente. À Jaiane Martins Alves Ferreira e demais amigos da graduação, agradeço por todas as aventuras ao longo daqueles anos memoráveis. À ETECAP, que me apresentou aos Laboratórios, à Química e aos amigos Victor Ravaglioli Sant'Ana, Bianca Ferreira Fernandez, Patrick Hideki Fuzimoto e Rodrigo Miranda de Carvalho. Aos meus professores da Escola Estadual Adalberto Nascimento e, em especial, professoras Fátima e Maria Verissimo, que me prepararam para essa jornada, a despeito das dificuldades inerentes ao ensino público brasileiro.

Aos meus avós Carlos Roberto Silva Stocco (exemplo de honestidade e responsabilidade) e Maria Jandira Gama Stocco (conselheira de vida que me ensinou o quão importante é ter Jesus em minha vida). À Tatiana Aparecida de Oliveira, minha querida mãe e amiga para todas as horas que sempre fez o seu melhor por mim. A Rodrigo Gama Stocco e Ana Carolina Stocco, meus amados tios e amigos que sempre se fizeram presentes. À minha avó, Maria Regina Franca, e à Catarina Franca Soares, tia que foi a minha irmã mais velha e hoje é a minha maior saudade. A Julia Pisani Simões por seu constante apoio e presença. A todos esses familiares que me apoiaram e me ensinaram o verdadeiro significado de uma

Família. Por último e mais importante, a Jesus, que me guia e me protege - melhor amigo que me deu forças e a quem tudo confio, sua palavra é luz para o meu caminho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 - 88887.711760/2022-00 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – nº do processo FAPESP: 2019/16805-4. "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 - 88887.711760/2022-00 and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – FAPESP process number: 2019/16805-4.

EPÍGRAFE

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

“O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; ele nunca o deixará, nunca o abandonará.

Deuteronômio 31:8

RESUMO

Introdução: Estudos anteriores envolvendo ducto deferente isolado humano e de *Rattus norvegicus* (rato) demonstraram a liberação de 6-nitrodopamina (6-ND) e sua ação como modulador endógeno da contratilidade destes tecidos. Visto que esse mediador endógeno se apresenta em humanos e é pouco discutido pela comunidade científica, mais dados necessitam ser gerados para se obter um melhor entendimento de seu real papel no organismo. **Objetivos:** Portanto, o presente trabalho propõe avaliar se a vesícula seminal isolada de rato (VSR) também apresenta liberação basal de 6-ND, os mecanismos envolvidos nessa liberação e sua ação na capacidade contrátil desse tecido. **Métodos:** a liberação basal de 6-ND, dopamina, noradrenalina e adrenalina por células da VSR foi avaliada quantitativamente através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Avaliou-se também o efeito do inibidor de óxido nítrico, L-NAME, do bloqueador de canais de sódio voltagem-dependente, tetrodotoxina (TTX), do inibidor da NADPH oxidase NOX1/4, GKT137831 e do peróxido de hidrogênio na liberação basal de 6-ND detectada por LC-MS/MS. Nos estudos funcionais, avaliou-se a capacidade da 6-nitrodopamina, da dopamina, da noradrenalina e da adrenalina, em diferentes concentrações, de induzir ou potencializar a contração das vesículas seminais, bem como o efeito da TTX, do L-NAME e do epitélio nas contrações da VSR induzidas por estímulo elétrico. A expressão de tirosina hidroxilase (TH) foi investigada por imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização “in situ” fluorescente (FISH). **Resultados:** A 6-nitrodopamina foi a catecolamina mais liberada, quando comparada a noradrenalina, adrenalina e dopamina. Pré-incubação com L-NAME reduziu apenas a liberação de 6-ND e a pré-incubação com GKT137831 ou peróxido de hidrogênio causou aumento seletivo na liberação de 6-ND. Pré-incubação com tetrodotoxina não afetou a liberação das catecolaminas. Todas as catecolaminas produziram contrações concentração-dependente em VSR, porém a 6-ND apresentou-se menos potente que as outras catecolaminas. Já em baixa concentração, a 6-ND potencializou significativamente as contrações induzidas por noradrenalina, adrenalina e dopamina, fato que não foi observado na presença de tetrodotoxina. Os estudos de IHQ e FISH revelaram a presença de TH nas células epiteliais de VSR. **Conclusão:** Esta é a primeira

demonstração de que a 6-ND é liberada pelo epitélio da VSR e modula a contratilidade deste órgão.

Palavras-chave – 6-nitrodopamina, catecolaminas, vesícula seminal, banho de órgãos, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Previous studies involving isolated human and *Rattus norvegicus* (rat) vas deferens provided the release of 6-nitrodopamine (6-ND) and its action as an endogenous modulator of the contractility of this tissue. Since this endogenous form is present in humans and is little discussed by the scientific community, more data needs to be generated to obtain a better understanding of its role in the organism.

Objectives: Therefore, the present work proposes to evaluate whether the isolated rat seminal vesicle also presents basal release of 6-ND, the mechanisms involved in the release of this catecholamine and its action on the contractile capacity of the tissue.

Methods: Seminal vesicles underwent assessment of the basal release of 6-ND, dopamine, norepinephrine and adrenaline through an LC-MS/MS process. Basal release was also evaluated in the absence and presence of the nitric oxide inhibitor L-NAME, voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX), NADPH oxidase inhibitor NOX1/4 GKT137831 and hydrogen peroxide through the same LC-MS/MS process. In functional studies, the contraction caused by 6-nitrodopamine, dopamine, norepinephrine and adrenaline in this tissue, in the absence and presence of 6-nitrodopamine, dopamine, norepinephrine and adrenaline in different concentrations as contraction potentiating agents, the effect of TTX on contraction, the effect of L-NAME and the epithelium effect on contractions caused by electrical stimulation were evaluated. The expression of tyrosine hydroxylase was investigated by immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization.

Results: 6-nitrodopamine was the most released catecholamine, when compared to noradrenaline, adrenaline and dopamine. Pre-incubation with L-NAME only affected the release of 6-ND and pre-incubation with GKT137831 or hydrogen peroxide caused a selective increase in 6-ND release. Pre-incubation with tetrodotoxin did not affect the release of catecholamines. All catecholamines produce concentration-dependent contractions of the rat seminal vesicle, but 6-ND is less potent than other catecholamines. At a low concentration, 6-ND potentiated the contractions caused by norepinephrine, adrenaline and dopamine, a factor that was not present in the presence of tetrodotoxin. Immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization revealed the presence and expression of tyrosine hydroxylase in rat seminal vesicle epithelial cells.

Conclusion: This is the first demonstration of the release of 6-

nitrodopamine in a rat seminal vesicle and the results indicate that 6-ND released by the epithelium modulates the contractility of the isolated rat seminal vesicle.

Keywords – 6-nitrodopamine, catecholamines, seminal vesicles, organ bath, immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura das principais catecolaminas presentes em mamíferos.....	209
Figura 2 - Biossíntese das principais catecolaminas presentes em mamíferos.	21
Figura 3 – Metabolismo, armazenamento, liberação e recaptção de catecolaminas.	23
Figura 4 – Estrutura molecular da tetrodotoxina (TTX).....	25
Figura 5 – Órgãos que compõem o sistema genital masculino.	26
Figura 6 - Etapas envolvidas no processo da ejaculação e a fenda sináptica.....	41
Figura 7 – Estrutura molecular do óxido nítrico (NO)	36
Figura 8 – Função esperada do óxido nítrico produzido através da nNOS, eNOS e iNOS.....	37
Figura 9 – Biossíntese de óxido nítrico através da nNOS, eNOS e iNOS.....	38
Figura 10 – Cortes histológicos dos tecidos da vesícula seminal.....	41
Figura 11 – Mecanismo de nitração proposto para as catecolaminas em 1997	42
Figura 12 – Relação entre os produtos das enzimas NOX, DUOX e NOS.....	43
Figura 13 - Estrutura molecular do GKT137831.....	44
Figura 14 - Estrutura molecular do peróxido de hidrogênio.....	45
Figura 15 - Diferença estrutural entre a dopamina e a 6-nitrodopamina	46
Figura 16 - Mecanismo proposto para a biossíntese de 6-nitrodopamina	48
Figura 17 - Liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e dopamina (DA) na vesícula seminal de rato.	71
Figura 18 - Gráfico do teste de Tukey para múltiplas comparações entre os valores de liberação basal da 6-nitrodopamina, noradrenalina, adrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato.....	72
Figura 19 - Inibição da síntese de óxido nítrico reduz a liberação basal de 6-nitrodopamina em vesícula seminal de rato	77
Figura 20 - Efeito da tetrodotoxina na liberação basal de 6-nitrodopamina, dopamina, noradrenalina e adrenalina na vesícula seminal de rato.....	79
Figura 21 - Efeito do peróxido de hidrogênio na liberação basal de 6-nitrodopamina, noradrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato	81
Figura 22 - Efeito do GKT137831 na liberação basal de 6-nitrodopamina, noradrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato	83

Figura 23 - Efeito da presença e ausência do epitélio na liberação basal de 6-nitrodopamina, noradrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato.....	85
Figura 24 - Curvas de contração concentração-dependentes em vesícula seminal de rato induzidas por 6-nitrodopamina (6-ND 10nM a 300 μ M), dopamina (DA 10nM a 300 μ M), noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M) e adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M)	88
Figura 25 - Gráfico do teste de múltiplas comparações de Dunnett entre os valores da pEC50 e Emax obtidos através das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por 6-nitrodopamina (6-ND 10nM a 300 μ M), noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M), adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M) e dopamina (DA 10nM a 300 μ M).....	89
Figura 26 - Efeito da 6-nitrodopamina (6-ND 10pM, 100pM, 1nM, 10nM e 100nM) nas contrações concentração-dependentes induzidas por noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M), adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M) e dopamina (DA 10nM a 300 μ M) na vesícula seminal de rato.....	94
Figura 27 - Efeito da pré-incubação de noradrenalina(10nM), adrenalina(10nM) e dopamina(10nM) nas contrações concentração-dependentes induzidas em vesícula seminal de rato.....	98
Figura 28 - Efeito da tetrodotoxina nas contrações concentração-dependentes induzidas por noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e dopamina (DA) em vesícula seminal de rato.....	102
Figura 29 - Efeito do L-NAME nas contrações frequência-dependentes induzidas por estímulo elétrico na vesícula seminal de rato.....	104
Figura 30 - Efeito do epitélio nas contrações induzidas por estímulo elétrico na vesícula seminal de rato.....	106
Figura 31 - Detecção imuno-histoquímica de tirosina hidroxilase em vesícula seminal de rato	109
Figura 32 - Detecção imunohistoquímica da proteína S-100 em vesícula seminal de rato	110
Figura 33 - Expressão de RNA mensageiro de tirosina hidroxilase em diferentes estruturas histológicas em vesícula seminal de rato	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e dopamina (DA) na vesícula seminal de rato.	72
Tabela 2 - Liberação de 6-nitrodopamina (6-ND), dopamina (DA), noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) em vesícula seminal de rato sob ação de diferentes ferramentas farmacológicas.	86
Tabela 3 - pEC50 e EMAX das contrações induzidas pela 6-nitrodopamina (6-ND 10nM a 300µM), noradrenalina (NA 10nM a 300 µM), adrenalina (ADR 10nM a 300 µM) e dopamina (DA 10nM a 300 µM) em vesícula seminal de rato.....	90
Tabela 4 - Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) das curvas concentraçãodependentes induzidas por noradrenalina, adrenalina e dopamina em vesícula seminal de rato na presença de 6-nitrodopamina (10pM, 100pM, 1nM, 10nM e 100nM).....	95
Tabela 5 - A potência (pEC50) e a resposta máxima (EMAX) das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por dopamina, noradrenalina e adrenalina em vesícula seminal de rato na presença de dopamina(10nM), noradrenalina(10nM) e adrenalina(10nM).	100
Tabela 6 - A potência (pEC50) e a resposta máxima (EMAX) das curvas concentraçãodependentes da noradrenalina e adrenalina em vesícula seminal de rato na presença da tetrodotoxina e associações.	103
Tabela 7 - A resposta máxima (EMAX) das curvas de contração induzidas por estímulo elétrico em vesícula seminal de rato na presença e ausência de L-NAME.	105
Tabela 8 - resposta máxima (EMAX) das curvas de contração induzidas por estímulo elétrico em vesícula seminal de rato na presença e ausência do epitélio.	107
Tabela 9 - Detecção imuno-histoquímica da tirosina hidroxilase, proteína S-100 e calretinina nas vesículas seminais de rato.	111
Tabela 10 - Quantificação da intensidade da positividade (IP = 255-MGV) para tirosina hidroxilase, proteína S-100 e calretinina em vesícula seminal de rato.	112

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. ASPECTOS GERAIS DAS CATECOLAMINAS.....	19
1.1.1. VIA DE BIOSÍNTESE DAS CATECOLAMINAS	20
1.1.2. METABOLISMO, ARMAZENAMENTO, LIBERAÇÃO E RECAPTAÇÃO DE CATECOLAMINAS.....	23
1.1.3. TETRODOTOXINA (TTX).....	26
1.2. SISTEMA GENITAL MASCULINO	28
1.2.1. FISIOLOGIA E PROCESSO DA EJACULAÇÃO	29
1.2.2. RECEPTORES QUE INFLUENCIAM O SISTEMA EJACULATORIO	33
1.2.3. DISFUNÇÕES SEXUAIS.....	36
1.3. ÓXIDO NÍTRICO	39
1.3.1. VIA CLÁSSICA DE SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO (ISOFORMAS ENZIMAS NOS).....	39
1.3.2. VIA ALTERNATIVA DE SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO (VIA NITRATO E NITRITO).....	43
1.3.3. DISTRIBUIÇÃO NO ORGANISMO E O SISTEMA EJACULATORIO	45
1.3.4. NITRAÇÃO DE CATECOLAMINAS.....	47
1.4. ENZIMAS NOX/DUOX.....	48
1.4.1. NOX/DUOX NO SISTEMA EJACULATORIO E GKT137831	50
1.4.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	51
1.4.3. INTERAÇÃO DE EROs E ERNs COM NITROCATECOLAMINAS.....	51
1.5. 6-NITRODOPAMINA	52
1.5.1. POSSÍVEIS VIAS DE BIOSÍNTESE.....	54
1.5.2. LIBERAÇÃO BASAL.....	57
1.5.3. ELECTRIC FIELD STIMULATION - EFS.....	58
1.5.4. 6-ND NO SISTEMA EJACULATORIO	58

1.6. O USO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS E ANTAGONISTAS DE α_1 -ADRENOCEPTORES COMO TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES SEXUAIS.....	61
1.7. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	63
2. OBJETIVOS	65
2.1. OBJETIVOS GERAIS	65
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
3. MATERIAIS E MÉTODOS	66
3.1. ANIMAIS.....	66
3.2. TRATAMENTO L-NAME	66
3.3. OBTENÇÃO DA VESÍCULA SEMINAL DE RATO PARA QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO BASAL E ESTUDOS FUNCIONAIS.....	66
3.4. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA	67
3.5. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO EPITÉLIO.....	68
3.6. PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA E QUANTIFICAÇÃO DAS CATECOLAMINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM (LC-MS/MS)	69
3.7. LINEARIDADE E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	71
3.8. ANÁLISE DE DADOS DA QUANTIFICAÇÃO DAS CATECOLAMINAS.....	71
3.9. ESTUDOS FUNCIONAIS	71
3.10. MONTAGEM DO BANHO DE ÓRGÃOS PARA OS ESTUDOS FUNCIONAIS	73
3.11. CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DAS CURVAS DE CATECOLAMINAS	74
3.12. INTERAÇÃO DE 6-NITRODOPAMINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO	74
3.13. INTERAÇÃO DE NORADRENALINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO	74
3.14. INTERAÇÃO DE ADRENALINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO.....	74
3.15. INTERAÇÃO DE DOPAMINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO.....	75
3.16. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA RESPOSTA DE CONTRAÇÃO DAS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO	75

3.17. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA INTERAÇÃO DE 6-NITRODOPAMINA COM CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	75
3.18. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA INTERAÇÃO DA DOPAMINA COM CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	76
3.19. EFEITO DO L-NAME NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	76
3.20. EFEITO DO EPITÉLIO NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	76
3.21. ANÁLISE DE DADOS DOS ESTUDOS FUNCIONAIS.....	76
3.22. IMUNO-HISTOQUÍMICA	78
3.23. HIBRIDIZAÇÃO “in situ” FLUORESCENTE (FISH).....	80
4. RESULTADOS	83
4.1. LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	83
4.2. EFEITO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, ADRENALINA E NORADRENALINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATOS.....	87
4.3. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA LIBERAÇÃO BASAL DA 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	91
4.4. EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, NORADRENALINA E DOPAMINA NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS.....	94
4.5. EFEITO DO GKT137831 NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, NORADRENALINA E DOPAMINA NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	96
4.6. EFEITO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO EPITÉLIO NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, NORADRENALINA E DOPAMINA.....	98
4.7. CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR 6-ND, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	102
4.8. EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DA 6-NITRODOPAMINA NAS CONTRAÇÕES CONCENTRAÇÃO-DEPENDENTES INDUZIDAS POR NORADRENALINA, ADRENALINA E DOPAMINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATOS	107

4.9. EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE NORADRENALINA, ADRENALINA E DOPAMINA NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO.....	114
4.10. EFEITO DA TETRODOTOXINA NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO	119
4.11. EFEITO DO L-NAME NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO	122
4.12. EFEITO DO EPITÉLIO NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO	124
4.13. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TH, PROTEÍNA S100 E CR	127
4.14. RESULTADO DOS EXPERIMENTOS DE FISH	132
5. DISCUSSÃO	134
6. CONCLUSÃO	136
7. REFERÊNCIAS.....	138

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DAS CATECOLAMINAS

No início do século 20, pesquisadores descobriram um grupo de monoaminas compostas por um grupo catecol e uma cadeia lateral de amina que foram batizadas de “catecolaminas”. O estudo dessas substâncias revolucionou a Farmacologia graças à importância fisiológica que exercem no organismo dos mamíferos. Entre as catecolaminas endógenas (produzidas pelo organismo), destacam-se a adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina) e dopamina que apresentam ação em diferentes sistemas do corpo, como o sistema nervoso e cardiovascular [1]. A noradrenalina é o principal neurotransmissor dos neurônios pós-ganglionares simpáticos, modulando a resposta ao estresse. A dopamina é o neurotransmissor predominante no sistema extrapiramidal de mamíferos e das vias neuronais mesocortical e mesolímbica (participando da regulação do humor e motivação e sistema de recompensas, respectivamente). Já a adrenalina é o hormônio em maior abundância na medula adrenal [2] e é essencial para respostas de “luta ou fuga”.

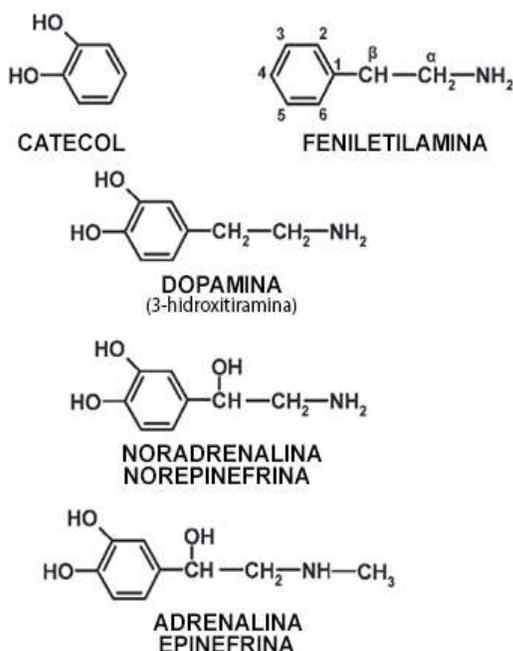


Figura 1 – Estrutura das principais catecolaminas presentes em mamíferos. Fonte: adaptada de [1]. A figura ilustra a configuração do grupo químico denominado catecol e as moléculas da feniletilamina (amina composta por anel benzênico ligado a um grupo etilamina), dopamina, noradrenalina (ou norepinefrina) e adrenalina (ou epinefrina).

1.1.1. VIA DE BIOSÍNTESE DAS CATECOLAMINAS

As catecolaminas endógenas são sintetizadas a partir do aminoácido L-tirosina, que pode ser adquirido na dieta ou sintetizado pelo organismo. A L-tirosina presente na corrente sanguínea é captada para o interior dos neurônios pré-sinápticos, onde interage com a enzima tirosina hidroxilase (TH – fator limitante da biossíntese de catecolaminas) e cofatores (tetra-hidrobiopterina, Fe^{2+} e O_2) para ser transformada em L-DOPA. Em seguida, a L-DOPA é transformada em dopamina após interagir com a enzima DOPA-descarboxilase e o cofator piridoxal-fosfato. Uma vez sintetizada, a dopamina pode ser liberada na corrente sanguínea, ser armazenada nas vias neuronais ou interagir com a enzima dopamina beta-hidroxilase (DBH) e cofatores (ascorbato, Cu^{2+} e O_2) para ser transformada em noradrenalina. A noradrenalina pode alcançar a corrente sanguínea, ser

armazenada em vesículas celulares ou interagir com a enzima feniletanolamina-n-metiltransferase (PNMT ou FNMT) e o cofator S-adenosilmetionina (presentes na medula adrenal), transformando-se em adrenalina (que pode ser alcançar a corrente sanguínea ou ser armazenada no organismo) [3].

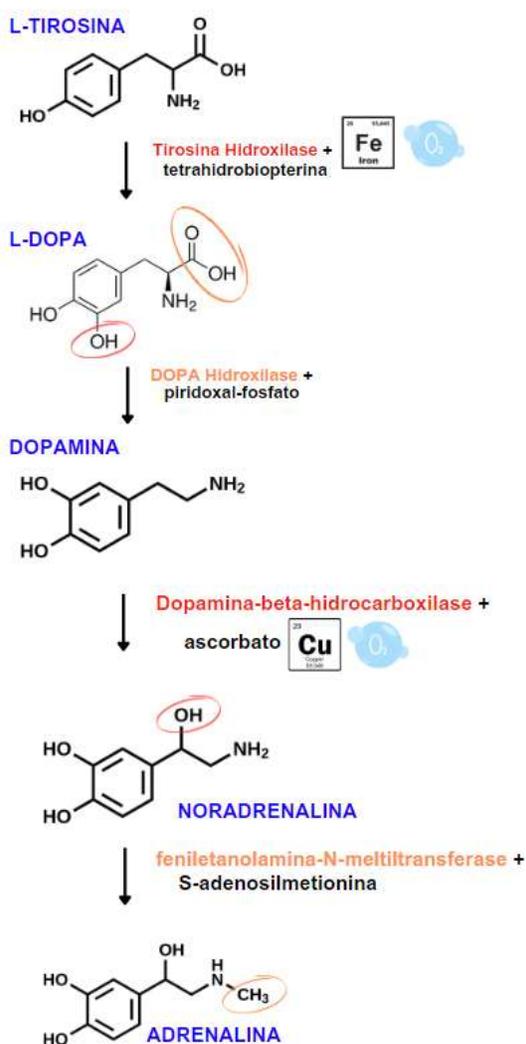


Figura 2 - Biossíntese das principais catecolaminas presentes em mamíferos. Fonte: adaptada de [4]. A figura ilustra a enzima TH que adiciona uma segunda hidroxila ao anel benzênico da L-tirosina, transformando o anel aromático em um grupo catecol e a L-tirosina em L-DOPA. A enzima DOPA descarboxilase remove o grupo carboxila da L-DOPA, transformando esse substrato em dopamina. A enzima dopamina-beta-hidroxilase (DBH) adiciona uma hidroxila ao carbono da cadeia amina que está ligado ao grupo catecol,

transformando a dopamina em L-noradrenalina. A enzima feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT ou FNMT) adiciona um metil à amina primária presente na molécula da L-noradrenalina, transformando-a uma amina secundária e a L-noradrenalina em L-adrenalina.

1.1.2. METABOLISMO, ARMAZENAMENTO, LIBERAÇÃO E RECAPTAÇÃO DE CATECOLAMINAS

A síntese das catecolaminas se inicia no citosol e finaliza nas vesículas sinápticas dos terminais nervosos. Após a síntese, as catecolaminas podem ser degradadas pelas enzimas monoamina oxidase (MAO), presente principalmente nos neurônios pré-sinápticos, e catecol-O-metiltransferase (COMT), presente em diferentes tipos de células nervosas [5]. As catecolaminas também podem interagir com o transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2), que é expresso no sistema nervoso central e apresenta alta seletividade para a dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina (monoamina derivada do triptofano), transportando esses neurotransmissores do citoplasma para dentro das vesículas de armazenamento intracelular [6]. Essa capacidade de armazenamento é uma evolução adaptativa inteligente e essencial para o organismo, pois protege as substâncias de sofrerem metabolismo e as estoca para que o corpo utilize conforme a sua necessidade, sem depender da biossíntese a cada evento de liberação de catecolaminas. Após o armazenamento das catecolaminas nas vesículas intracelulares, o neurônio pré-sináptico pode ser estimulado, causando uma despolarização seguida da liberação (ou exocitose) do conteúdo vesicular na fenda sináptica (região entre o neurônio pré-sináptico e pós-sináptico, onde os neurotransmissores podem interagir com receptores de superfície para gerarem resposta celular). Depois de liberadas na fenda sináptica, as catecolaminas podem ser metabolizadas ou recaptadas para o interior do neurônio pré-sináptico através do transportador de noradrenalina (NET, que apresenta alta afinidade para noradrenalina e menor afinidade para dopamina, porém não apresenta afinidade considerável para a adrenalina) e transportador de dopamina (DAT, que apresenta alta afinidade para dopamina e menor afinidade para noradrenalina e adrenalina) e após a recaptação, podem interagir com as enzimas metabolizadoras de catecolaminas presentes no interior do neurônio pré-sináptico ou novamente armazenadas nas vesículas intracelulares pelo VMAT-2 [7].

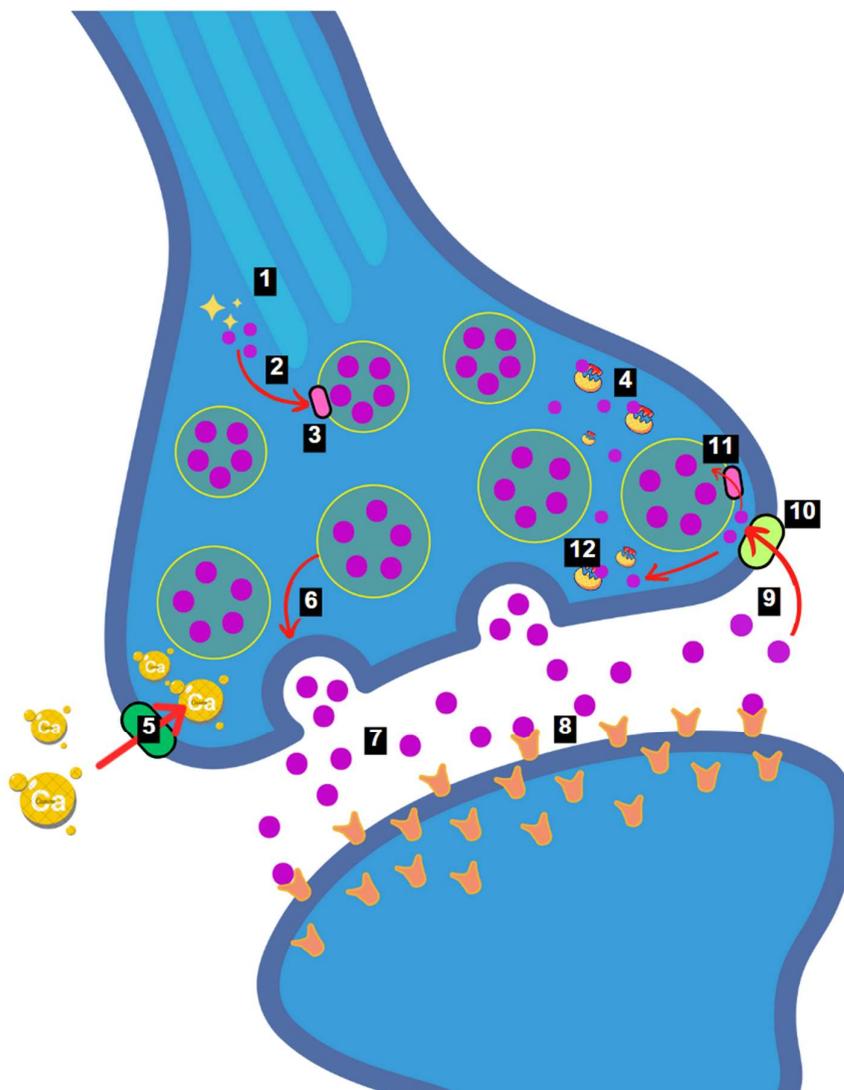


Figura 3 – Metabolismo, armazenamento, liberação e recaptação de catecolaminas. Fonte: imagem criada pelo autor. A figura ilustra o sistema de liberação das catecolaminas, recaptação e metabolismo. Ao serem sintetizadas no citosol (1), as catecolaminas podem ser transportadas (2) para o interior das vesículas de armazenamento através do VMAT-2 (3) ou metabolizadas pelas enzimas MAO (4) pré-sináptica e COMT. Ao receber um estímulo, os canais de cálcio (5) presentes na membrana neuronal permitem um influxo de cálcio (Ca^{2+}) para o interior da célula que a despolariza, causando a liberação (ou exocitose) das substâncias contidas nas vesículas de armazenamento (6). Ao serem liberadas para a fenda sináptica (7), essas substâncias podem interagir com receptores presentes na membrana do neurônio pós-sináptico (8) ou retornar para o interior do neurônio pré-sináptico (9) através do transportador de noradrenalina NET e transportador de dopamina DAT (10). Após a

recaptação, as substâncias podem ser novamente armazenadas nas vesículas pelo VMAT-2 (11) ou metabolizadas pelas enzimas MAO e COMT (12).

1.1.3. TETRODOTOXINA (TTX)

A tetrodotoxina (TTX) é um composto 1000x mais tóxico que o cianeto, sendo naturalmente encontrado no ovário e fígado de peixes da família *Tetraodontidae*, conhecidos popularmente como baiacus [8]. No decorrer do tempo, o número de espécies animais que possuem TTX em seu organismo está aumentando graças à identificação que novos estudos trazem para enriquecer a ciência todos os anos [9, 10]. Os estudos indicam que esses animais não sintetizam a TTX (substância tóxica que não possui antídoto conhecido) mas a adquirem de bactérias sintetizadoras dessa substância (como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*) e que fazem parte de suas dietas [11, 12].

A tetrodotoxina bloqueia os canais de sódio voltagem-dependentes dos tecidos excitáveis (como os neurônios, células cromafins da medula adrenal, músculos cardíacos e esqueléticos), inibindo a abertura desses canais. Esse fato impede o influxo de íons sódio para o interior da membrana celular. Mesmo em baixas concentrações, a TTX bloqueia os canais de sódio voltagem-dependentes das células neuronais e musculares dos mamíferos, impedindo a propagação dos sinais nervosos e contrações musculares [13]. Portanto, ao bloquear os canais de sódio voltagem-dependentes, a TTX impede a despolarização da membrana celular e, conseqüentemente, a propagação do potencial de ação dos tecidos afetados [12].

Embora a tetrodotoxina não afete diretamente a liberação das catecolaminas ou a ação destas em seus receptores, ela as afeta indiretamente, visto que bloqueia a propagação dos potenciais de ação emitidos pelo sistema nervoso central, que necessitam do influxo de íons sódio para se propagar e induzir a ativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes nos terminais dos neurônios simpáticos pré-sinápticos e o influxo dos íons cálcio, culminando na liberação (exocitose) das catecolaminas armazenadas nas vesículas celulares.

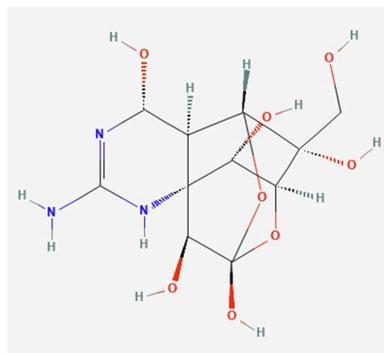


Figura 4 – Estrutura molecular da Tetrodotoxina (TTX). Fonte: [14]. A figura ilustra a estrutura molecular da tetrodotoxina.

1.2. SISTEMA GENITAL MASCULINO

O sistema genital masculino é composto por órgãos internos e externos. São classificados como órgãos externos o pênis e bolsa escrotal e como internos os testículos, epidídimo, ducto deferente, ducto ejaculatório, funículos espermáticos e glândulas sexuais (próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais).

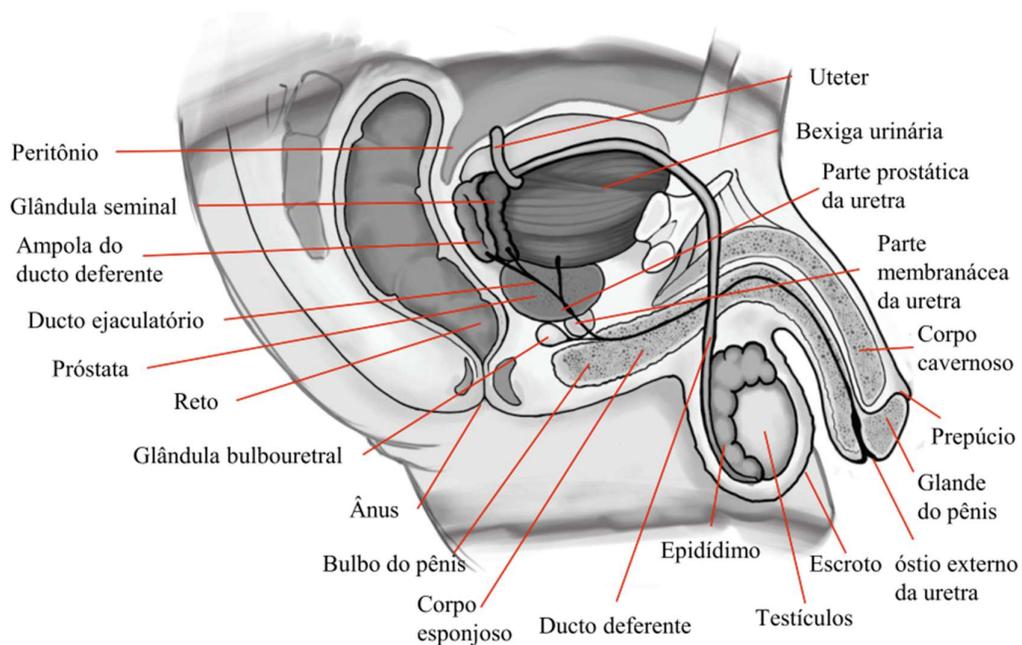


Figura 5 – Órgãos que compõem o sistema genital masculino. Fonte: [15]. A figura ilustra os componentes do sistema genital masculino, destacando o peritônio, glândula seminal, ampola do ducto deferente, ducto ejaculatório, próstata, reto, glândula bulbouretral, ânus, bulbo do pênis, corpo esponjoso, ducto deferente, epidídimo, testículos, escroto, óstio externo da uretra, glândula do pênis, prepúcio, corpo cavernoso, parte membranácea da uretra, parte prostática da uretra, bexiga urinária e ureter.

1.2.1. FISILOGIA E PROCESSO DA EJACULAÇÃO

A ejaculação é definida como a ejeção do sêmen do meio interno para o meio externo do organismo e é dividida em duas fases principais: emissão (os fluidos das glândulas sexuais e espermatozoides são depositados na uretra prostática) e expulsão (o sêmen depositado na uretra prostática é expelido para fora do organismo, através de contrações involuntárias e coordenadas dos músculos perineais) [16]. As inervações adrenérgicas (com receptores para catecolaminas) e colinérgicas (com receptores para acetilcolina) regulam as vesículas seminais no processo ejaculatório [17, 18].

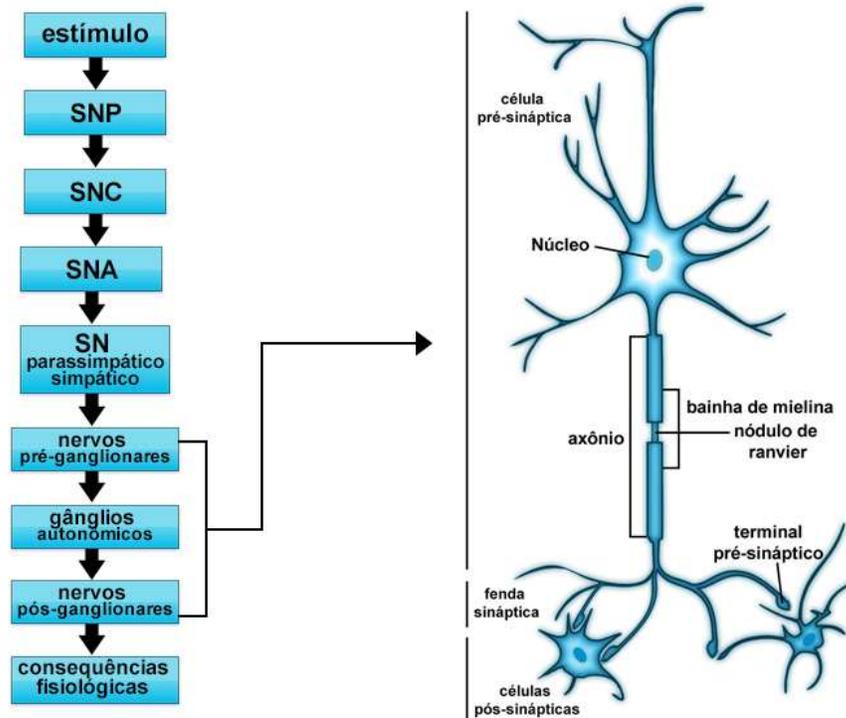


Figura 6 – Etapas envolvidas no processo da ejaculação e a fenda sináptica. Fonte: imagem criada pelo autor. A figura ilustra as etapas envolvidas no processo da ejaculação, desde a captação do estímulo até as consequências fisiológicas. Ao lado do fluxograma das etapas do processo de ejaculação, está demonstrado o esquema de propagação do sinal dos neurônios pré-ganglionares através dos gânglios autonômicos para os neurônios pós-ganglionares, a fim de gerar consequências fisiológicas. Nessa demonstração podemos ver as células pré-

sinápticas, o núcleo das células, o axônio, a bainha de mielina, nódulo de Ranvier, terminal pré-sináptico, fenda sináptica e células pós-sinápticas.

- a) Estímulo:** pode ser sensorial, psicológico ou a combinação de ambos. O sistema nervoso periférico (SNP) capta esse estímulo e o conduz ao sistema nervoso central (SNC) que o interpretará [19].
- b) Ativação do sistema nervoso autônomo:** o SNC envia estímulos ao sistema nervoso autônomo (SNA), ativando as subdivisões sistema nervoso simpático (SNSIM) e parassimpático (SNPAR). O SNPAR é estimulado pela acetilcolina para relaxar os vasos sanguíneos do pênis e aumentar o fluxo sanguíneo dos corpos cavernosos, facilitando a ereção e lubrificação, enquanto o SNSIM é estimulado pela noradrenalina para promover a contração dos músculos lisos dos ductos deferentes e próstata durante a ejaculação, auxiliando no processo de expulsão do sêmen. Desta maneira, os nervos pré-ganglionares conduzem o sinal através dos gânglios autonômicos para os nervos pós-ganglionares, gerando consequências fisiológicas (ereção peniana, secreção de fluidos, emissão, contração muscular, expulsão do esperma e clímax) [20].
- c) Ereção peniana:** a ereção é mediada principalmente pelo SNPAR e a estimulação sexual causa a liberação de óxido nítrico (NO) pelos terminais nervosos e células endoteliais do pênis [21]. O NO ativa a enzima guanilato ciclase que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP). O cGMP causa o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e a dilatação das artérias do pênis, permitindo o influxo de sangue e a ereção [22]. Fármacos como inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5) são usados para tratar disfunção erétil, pois impedem a degradação do cGMP [23], amplificando o efeito do óxido nítrico e facilitando o processo de ereção (ou seja, na ausência de cGMP, os inibidores da PDE5 são ineficazes, pois seu mecanismo de ação é amplificar a resposta do cGMP).

d) Secreção de fluidos e a contração muscular: Durante a estimulação do SNPAR, a liberação de acetilcolina ativa os receptores muscarínicos nas células secretoras das glândulas acessórias, promovendo a secreção dos fluidos [24]. Essas glândulas (bulbouretrais, próstata e vesículas seminais, que são responsáveis por 75% a 80% do volume ejaculado) secretam o fluido seminal que nutre o sêmen com frutose e outras substâncias que ajudam os espermatozoides a sobreviverem [25]. Além disso, o fluido prostático (composto por enzimas, ácido cítrico e zinco) lubrifica o trato reprodutivo masculino e neutralizam a acidez da uretra e da vagina, protegendo os espermatozoides e facilitando a sua movimentação de dentro do organismo masculino até o meio externo [26].

Já no SNSIM, a condução de um potencial de ação (gerado por estímulos) ativa canais de cálcio voltagem-dependentes nos neurônios pré-sinápticos, permitindo a entrada de íons Ca^{2+} nas células e causando a exocitose de neurotransmissores (principalmente a noradrenalina) que alcançam a fenda sináptica, podendo ser recaptados pelo neurônio pré-sináptico ou exercer ação em receptores adrenérgicos [7]. Em receptores alfa-adrenérgicos, a noradrenalina favorece a despolarização e contração das células musculares lisas [27], enquanto em receptores beta-adrenérgicos, favorece o relaxamento da musculatura lisa do sistema ejaculatório (como as vesículas seminais, ducto deferente e corpo cavernoso).

e) Emissão e expulsão do esperma: A emissão é uma fase regulada pelo SNSIM que contrai as vesículas seminais (liberando o fluido seminal), próstata (liberando o fluido prostático) e ductos deferentes (transportando os espermatozoides do epidídimo para a uretra prostática). Quando o sêmen alcança a uretra posterior, ocorre o fechamento do colo vesical para evitar que o sêmen vá para a bexiga.

A expulsão também é mediada pelo SNSIM, que induz contrações musculares coordenadas (ou rítmicas) no assoalho pélvico, próstata, vesículas seminais e base do pênis (de maneira em que todos os componentes trabalham simultaneamente para forçar o sêmen da uretra para fora do pênis) durante o momento da ejaculação [24].

O equilíbrio de ativação entre os receptores alfa- e beta-adrenérgicos e a interação entre as catecolaminas e acetilcolina são fundamentais para o funcionamento pleno do processo ejacutório, pois enquanto os receptores muscarínicos (ativados pela acetilcolina) promovem a secreção dos fluidos, os receptores adrenérgicos (ativados pelas catecolaminas) regulam a contração e relaxamento dos músculos lisos e a liberação dos fluidos. Fármacos que aumentam a liberação de noradrenalina (como a pseudoefedrina) também aumentam a ativação dos receptores adrenérgicos, influenciando positivamente a força e frequência das contrações musculares envolvidas na expulsão do sêmen [19].

- f) Clímax:** O clímax é a etapa final deste processo, caracterizado por alterações físicas e psicológicas intensas, induzidas através da liberação de neurotransmissores que possibilitam o pico do prazer sexual [19]. Fármacos como inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ou ISRS, aumentam os níveis de serotonina no cérebro, podendo reduzir a excitação sexual e a sensibilidade genital), antidepressivos tricíclicos (efeito negativo parecido com os ISRS), benzodiazepínicos (embora o efeito ansiolítico ajude, o efeito sedativo atrapalha), agonistas e antagonistas dopaminérgicos (em pequenas doses, podem melhorar a libido, porém em doses elevadas podem apresentar efeitos colaterais que atrapalham a função ejacutória) e opioides (que deprimem o sistema nervoso central e suas respostas) podem dificultar o alcance do clímax [24]. Vale ressaltar que a interação entre os neurotransmissores e receptores envolvidos no sistema ejacutório é complexa (envolvendo múltiplos sistemas e sinalizadores moleculares) e a resposta gerada pode variar conforme o paciente, a quantidade de neurotransmissores liberados e a distribuição de receptores nos tecidos que foram estimulados.

1.2.2. RECEPTORES QUE INFLUENCIAM O SISTEMA EJACULATORIO

a) Receptores alfa adrenérgicos: Os subtipos α_1 (acoplados à proteína Gq) e α_2 (acoplados à proteína Gi) estão distribuídos em diversos tecidos, incluindo músculos lisos (e musculatura vascular), próstata e bexiga; no sistema ejaculatório, o α_1 é mais relevante. São ativados endogenamente pela noradrenalina e adrenalina, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular.

PROTEÍNA Gq - α_1

1. A ativação da proteína Gq (heterotrimerico composto pelas subunidades alfa α -, beta β - e gama γ -) por um agonista catalisa a substituição da guanosina difosfato (GDP) ligada à subunidade α - por guanosina trifosfato (GTP) [28]. Essa substituição causa uma mudança conformacional na proteína Gq que dissocia as subunidades Gq α - (ligada ao GTP), Gq β - e Gq γ -.
2. A subunidade Gq α -GTP dissociada ativa a fosfolipase C (PLC) que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) na membrana plasmática para formar os segundos mensageiros inositol trifosfato (IP3, substância hidrossolúvel que se difunde no citoplasma) e o diacilglicerol (DAG, substância hidrofóbica que permanece na membrana plasmática).
3. O IP3 (difundido no citoplasma) se liga aos receptores de IP3 no retículo sarcoplasmático, induzindo a liberação de íons Ca^{2+} (armazenados no retículo sarcoplasmático) para o citosol (onde atuam como um importante segundo mensageiro intracelular da contração das fibras musculares lisas) [29].
4. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) e quando associado aos íons Ca^{2+} , ativa a proteína quinase C dependente de cálcio (PKCa). Ambas as proteínas modulam a atividade de canais iônicos e regulam a atividade enzimática através da fosforilação de proteínas, causando a contração das fibras musculares lisas [30].
5. O Ca^{2+} interage com a calmodulina (que também modula outros sinalizadores intracelulares), formando o complexo calmodulina-cálcio que ativa a MLCK (quinase da cadeia leve de miosina). Esse complexo também inibe o

caldesmon (proteína que impede a interação entre a actina e a miosina, atrapalhando a contração dos músculos lisos), facilitando essa contração [31].

6. Após sua ativação, a MLCK fosforila uma serina ou treonina da cadeia leve da miosina das fibras musculares lisas, permitindo a interação da miosina e a actina que gera a contração muscular.
7. A enzima GTPase hidrolisa o GTP em GDP, encerrando a cascata de sinalização [32].

b) Receptores beta adrenérgicos: Os subtipos $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ (todos acoplados à proteína Gs) são encontrados em diferentes tecidos e desempenham diversas funções [27]; no sistema ejaculatório, o subtipo $\beta 2$ é mais relevante. Ativados endogenamente pela noradrenalina e adrenalina, desencadeiam uma complexa cascata de sinalização intracelular.

PROTEÍNA Gs - $\beta 2$

1. A ativação da proteína Gs (heterotrímero composto pelas subunidades alfa α -, beta β - e gama γ -) por um agonista catalisa a substituição da guanosina difosfato (GDP) ligada à subunidade α - por guanosina trifosfato (GTP) [28]. Essa substituição causa uma mudança conformacional na proteína que dissocia as subunidades $Gs\alpha$ - (ligada ao GTP), $Gs\beta$ - e $Gs\gamma$ -.
2. A subunidade $Gs\alpha$ -GTP dissociada ativa a adenilato ciclase, enzima que converte a adenosina trifosfato (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc).
3. O AMPc atua como segundo mensageiro e ativa as subunidades catalíticas da proteína quinase A dependente de AMPc (PKA). O AMPc também estimula a guanilato ciclase (aumentando a liberação de óxido nítrico) e inibe a liberação de cálcio (facilitando o relaxamento das células musculares lisas), causando a vasodilatação.
4. A PKA é uma enzima que modula a atividade de diversos diversos sinalizadores intracelulares (como fatores de transcrição e enzimas metabólicas) através da fosforilação, inclusive da MLCK que tem sua atividade

inibida pela PKA. Inibindo a MLCK, a PKA impede a fosforilação da cadeia leve da miosina causada pela MLCK (impedindo a interação entre a miosina e actina e dificultando a contração celular), auxiliando as células musculares a relaxar. A PKA também pode ativar enzimas que removem grupos fosfatos da cadeia leve da miosina (adicionados pela MLCK, por exemplo), facilitando e acelerando o relaxamento muscular.

5. A enzima GTPase hidrolisa o GTP em GDP, encerrando a cascata de sinalização. Fosfodiesterases degradam AMPc, diminuindo a atividade da PKA. Proteínas fosfatases removem grupos fosfatos adicionados pela PKA (como os adicionados na MLCK, por exemplo), revertendo os efeitos da fosforilação [32].

c) Receptores muscarínicos: Os subtipos M1, M2 e M3 (todos acoplados à proteína Gq) são mais relevantes no sistema ejaculatório e estão presentes nas glândulas acessórias. Assim como receptores α 1-adrenérgicos, esses subtipos muscarínicos estão ligados à proteína Gq e geram a mesma cascata de sinalização intracelular, porém são ativados de forma endógena pela acetilcolina que é liberada pelo SNPAR. Sua ativação contrai as glândulas acessórias, causando a secreção dos fluidos glandulares [16, 33].

d) Receptores dopaminérgicos D1-like (D1 e D5, acoplados à proteína Gs): Distribuídos principalmente no SNC (em córtex frontal, núcleo accumbens, hipotálamo e hipocampo). Ativado endogenamente pela dopamina, desencadeia uma cascata de sinalização celular similar aos receptores beta adrenérgicos (Gs). Promovem a excitabilidade neuronal, intensificando as experiências sensoriais (fator que pode afetar o desejo sexual e o orgasmo, tornando o processo mais prazeroso pelo alto nível de estímulos) [34, 35].

e) Receptores dopaminérgicos D2-like (D2, D3 e D4, acoplados à proteína

Gi/o): Distribuídos principalmente no SNC, porém também presente no sistema endócrino em alguns tecidos periféricos (como nos testículos e parede média de veias e artérias). Ativado endogenamente pela dopamina, os receptores D2 (Gi/o) inibem a adenilato ciclase (reduzindo os níveis de AMPc e ativação da PKA), canais de cálcio [36] (diminuindo a excitose), a síntese da prolactina [37] (a dopamina interage com receptores D2 nas células lactotróficas da adenohipófise que sintetizam a prolactina, inibindo a síntese deste sinalizador que inibe a libido e função sexual) e ativa canais de potássio (hiperpolarizando as células neuronais), reduzindo a excitabilidade neuronal. Os receptores D2-like presentes nos neurônios pré-sinápticos atuam como um feedback negativo, diminuindo a liberação de dopamina (a fim de evitar estímulos em excesso). Também presentes nos neurônios pós-sinápticos e na medula espinhal, esses receptores contribuem para a contração muscular, facilitando a expulsão do esperma durante a ejaculação [34, 35].

f) Outros fatores que influenciam o sistema ejaculatório: Além dos descritos acima, fatores como o óxido nítrico, ATP (que participa da sinalização de diversos sistemas moleculares), oxitocina, serotonina, opióides, GABA, canabinoides, prolactina, sistema renina-angiotensina, peptídeo vasoativo do intestino, adenosina e ATP também podem influenciar no sistema ejaculatório, assim como fármacos que influenciam esses sinalizadores [38].

1.2.3. DISFUNÇÕES SEXUAIS

Disfunções sexuais podem se manifestar através da diminuição da libido, disfunção erétil e/ou dificuldades para atingir o orgasmo; como a ejaculação precoce, tardia e a anejaculação (incapacidade de ejacular). A qualidade de vida do paciente é extremamente afetada por disfunções sexuais, pois esses quadros causam tensão sobre o assunto e ato sexual, gerando estresse e ansiedade no

paciente e dificultando ainda mais o ato sexual (esse conjunto de fatores tende a afetar a relação do paciente com sua parceira/seu parceiro, acarretando problemas de autoestima, cessamento da atividade sexual, afastamento social e até depressão) [35, 38, 39, 40, 41].

As disfunções podem ter causas biológicas, psicológicas e até sociais. Entre as causas biológicas, estão o estresse e ansiedade (quando não são a causa primária, podem surgir pela disfunção e agravar ainda mais o quadro), doenças neurológicas (como Parkinson e Alzheimer), danos na medula espinhal, doenças cardiovasculares, inflamações crônicas (gerando radicais livres que danificam os tecidos), desregulações hormonais (como baixos níveis de testosterona e altos de prolactina), reações adversas à medicamentos e o desequilíbrio entre as vias de sinalização que participam do processo ejaculatório (como a interação entre catecolaminas e NO ou a ativação de receptores D1 e D2).

As interações entre os neurotransmissores são diversas e complexas. Ao focar no papel das catecolaminas e NO, sabe-se que a contração da musculatura lisa e a liberação do sêmen são modulados pela interação entre esses sinalizadores, porém os radicais livres gerados pelo estresse oxidativo tendem a reagir com o NO (diminuindo a sua biodisponibilidade) e promover um desequilíbrio neste sistema, atrapalhando o processo ejaculatório. O desequilíbrio entre a ativação de receptores dopaminérgicos D1 (que aumenta a excitabilidade neuronal) e D2 (que inibe a atividade neuronal) pode ocorrer devido às interações moleculares que a dopamina sofre no organismo (como ações enzimáticas e de radicais livres que alteram a sua biodisponibilidade), afetando o processo ejaculatório.

A terapia e acompanhamento psicológico são recomendados para esses quadros e existem farmacoterapias sendo testadas e utilizadas para melhorar a qualidade de vida destes pacientes. Bloqueadores de alfa1-adrenoceptores (como alfuzosina e tamsulosina) são utilizados para tratar sintomas da hiperplasia prostática, pois relaxam os músculos lisos na próstata e no colo da bexiga, o que pode melhorar o fluxo urinário, porém também pode interferir na função das glândulas acessórias e na dinâmica do fluido seminal [42]. Inibidores da acetilcolinesterase (aumentam a biodisponibilidade de acetilcolina) podem aumentar a secreção das glândulas acessórias e alterar a qualidade da produção de fluidos

que nutrem e protegem os espermatozoides [33]. Agonistas e antagonistas de receptores dopaminérgicos alteram a resposta excitatória. Inibidores da recaptação da dopamina e inibidores da enzima MAO prolongam os efeitos da dopamina na fenda sináptica, alterando a libido e desejo sexual. Inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) são utilizados no tratamento da depressão e ansiedade, podendo ser aliados em disfunções sexuais, porém entre os efeitos colaterais destes medicamentos está a ejaculação retardada ou anorgasmia.

1.3. ÓXIDO NÍTRICO

Descoberto como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF), o óxido nítrico (NO) foi inicialmente relatado por Furchogott e Zawadzki em 1980 [43]. Caracterizado como o produto de secreção celular de mamíferos que apresenta um dos menores pesos moleculares conhecidos, o NO é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) que está presente em diferentes partes do organismo (como cérebro, trato gastrointestinal, sistema respiratório e circulatório, etc), participando de uma ampla gama de eventos fisiológicos [39].

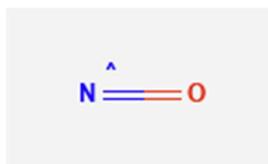


Figura 7 – Estrutura molecular do óxido nítrico (NO). Fonte: [44]. A figura ilustra a estrutura molecular do óxido nítrico.

1.3.1. VIA CLÁSSICA DE SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO (ISOFORMAS ENZIMAS NOS)

A via clássica de síntese do NO acontece no citosol e é regulada pela presença de cálcio e estímulos inflamatórios e/ou mecânicos, através das enzimas NOS (óxido nítrico sintase). A família de enzimas NOS possui três isoformas, sendo elas:

1. eNOS (óxido nítrico sintase endotelial): dependente de cálcio e localizada em células endoteliais. Sua ativação causa a síntese de NO e, conseqüentemente, a vasodilatação dependente do endotélio e inibição da agregação plaquetária.

2. nNOS (óxido nítrico sintase neuronal): dependente de cálcio e localizada em neurônios do sistema nervoso central e periférico. Sua ativação causa a síntese de NO que participa da neurotransmissão e do relaxamento de esfíncteres gastrointestinais e urinários.
3. iNOS (óxido nítrico sintase induzível): independente de cálcio e localizada em diversos tipos celulares. Sua ativação ocorre em resposta a estímulos mecânicos e inflamatórios e causa a síntese de grandes quantidades de NO que participará do processo inflamatório.

As enzimas eNOS e nNOS são consideradas constitutivas, pois produzem quantidades basais de NO e participam de eventos fisiológicos comuns. Já a iNOS é considerada induzível, por ser ativada como resposta à estímulos inflamatórios e mecânicos [45, 46].

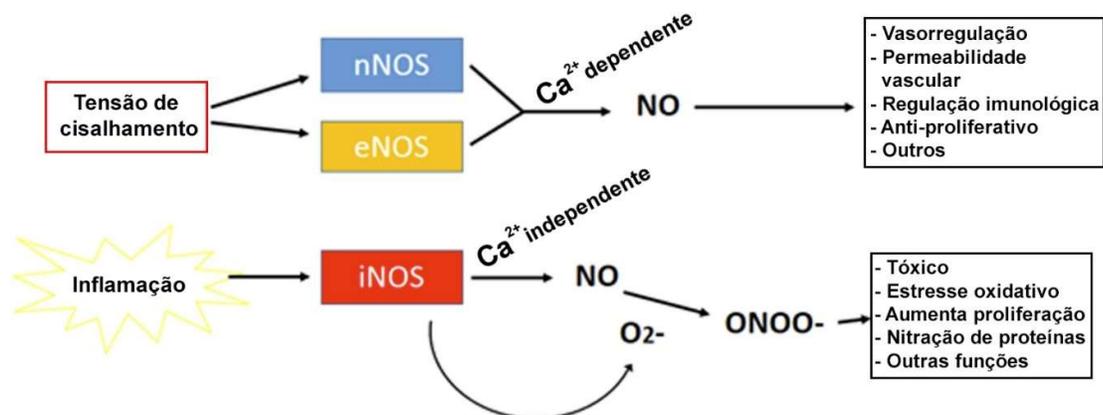


Figura 8 - Função esperada do óxido nítrico produzido através da nNOS, eNOS e iNOS. Fonte: adaptada de [47]. A figura ilustra a tensão de cisalhamento que induz as isoformas nNOS e eNOS (enzimas dependentes de cálcio) a produzirem óxido nítrico (NO) para a manutenção das funções de vasorregulação, permeabilidade vascular, regulação imunológica, anti-proliferativo e outros. A inflamação induz a iNOS (enzima independente de cálcio) a produzir óxido nítrico (NO) que posteriormente reage com O₂⁻ e se transforma em peroxinitrito (ONOO⁻) que é tóxico para o organismo, causando estresse oxidativo, aumento da proliferação, nitração de proteínas e outras funções.

Essas isoformas transformam o aminoácido L-arginina e cofatores (NADPH, O_2 , H^+) em L-citrulina e cofatores (H_2O , $NADP^+$, NO), sintetizando assim o NO como subproduto desta reação bioquímica [48]. O NO ativa a enzima guanilato ciclase que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP). O cGMP causa o relaxamento de células de músculos lisos (participando do relaxamento do corpo cavernoso) e a dilatação dos vasos sanguíneos (modulando o sistema cardiovascular), além de apresentar ação antioxidante (protegendo as células contra danos causados pelo estresse oxidativo) e potencializar a transmissão sináptica (como um neurotransmissor atípico) [22].

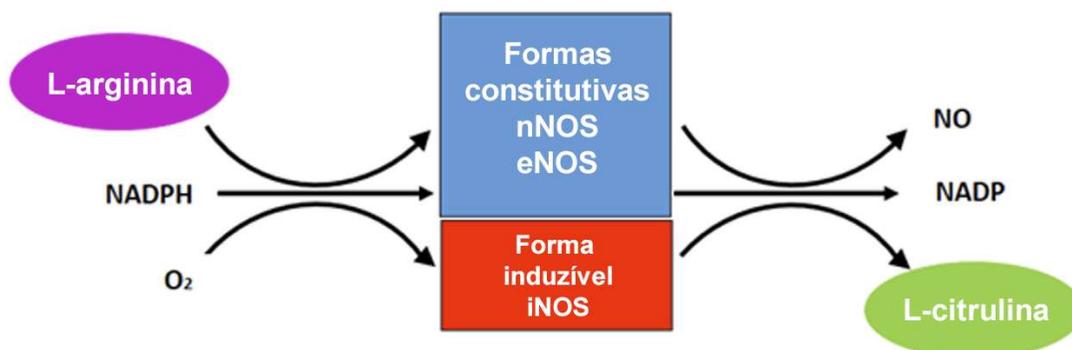
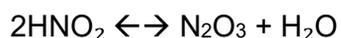


Figura 9 – Biossíntese de óxido nítrico através da nNOS, eNOS e iNOS. Fonte: adaptada de [47]. A figura ilustra a síntese de óxido nítrico que ocorre pela biotransformação do aminoácido L-arginina em L-citrulina através das isoformas das enzimas NOS (responsáveis pela síntese do óxido nítrico) e cofatores NADPH e O_2 . nNOS e eNOS dependem de cálcio para realizar essa transformação, enquanto a iNOS não depende do cálcio. Essa biotransformação da L-citrulina também resulta na formação de óxido nítrico (NO) e NADP.

1.3.2. VIA ALTERNATIVA DE SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO (VIA NITRATO E NITRITO)

Além da via clássica, o NO também pode ser sintetizado através de uma via alternativa envolvendo o nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-) que são obtidos por processos endógenos e pela dieta. Tanto a via clássica quanto a alternativa modulam a biodisponibilidade do NO, porém elas apresentam mecanismos diferentes de produção e regulação.

A via alternativa de síntese do óxido nítrico é ativa em diversos locais, como no estômago, pele, urina e coração. As reações envolvidas (reguladas pelo pH e presença de agentes redutores) podem ocorrer no citosol, mitocôndrias e no espaço extracelular. Estudos demonstram que bactérias presentes na cavidade oral podem reduzir nitrato à nitrito e a acidez do estômago favorece a essa reação, além da redução de nitrito à NO. Na pele, as bactérias reduzem o nitrato à nitrito, assim como numa infecção urinária, onde as bactérias reduzem nitrato à nitrito, favorecendo a acidificação da urina. A xantina oxidase (localizada em diversos tecidos, participa do metabolismo de purinas e do ciclo da ureia, reduzindo o NO_3^- para NO_2^-), hemoglobina desoxigenada (transporta o oxigênio dos alvéolos pulmonares para os tecidos, porém também atua como um agente redutor que reduz o NO_2^- a NO e ocorre principalmente nos tecidos periféricos) e mioglobina (armazena oxigênio em células musculares e também pode reduzir o NO_2^- a NO) também podem atuar como agentes redutores neste processo de síntese [45, 46].



1.3.3. DISTRIBUIÇÃO NO ORGANISMO E O SISTEMA EJACULATORIO

O NO já foi relatado no trato urogenital de *Rattus norvegicus* (rato) [49] e humano, desempenhando funções no corpo cavernoso [50-52], uretra [52, 53], bexiga urinária [52, 54] e vesícula seminal [52]; evidenciando seu papel na manutenção das funções destes tecidos (como na contração muscular e ereção) e a sua importância (a disfunção de NO pode causar a inflamação da próstata e dificultar a função erétil) [55]. A vesícula seminal é composta pela mucosa (revestida por um epitélio colunar pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios que modula a secreção), adventícia (camada externa de tecido conjuntivo denso não modelado, rico em fibras colágenas e elásticas que fornece suporte à vesícula seminal e a fixa aos tecidos adjacentes), músculos lisos (que participam da contração do tecido) e é irrigada por vasos sanguíneos. Esses vasos são revestidos internamente por endotélio (epitélio simples pavimentoso especializado) e possuem uma túnica muscular composta por células musculares lisas [17, 40]. A presença de epitélio e endotélio neste sistema apontam para uma possível síntese local de NO, pois ambos participam de diversas funções do organismo, incluindo a síntese do óxido nítrico [21, 40].

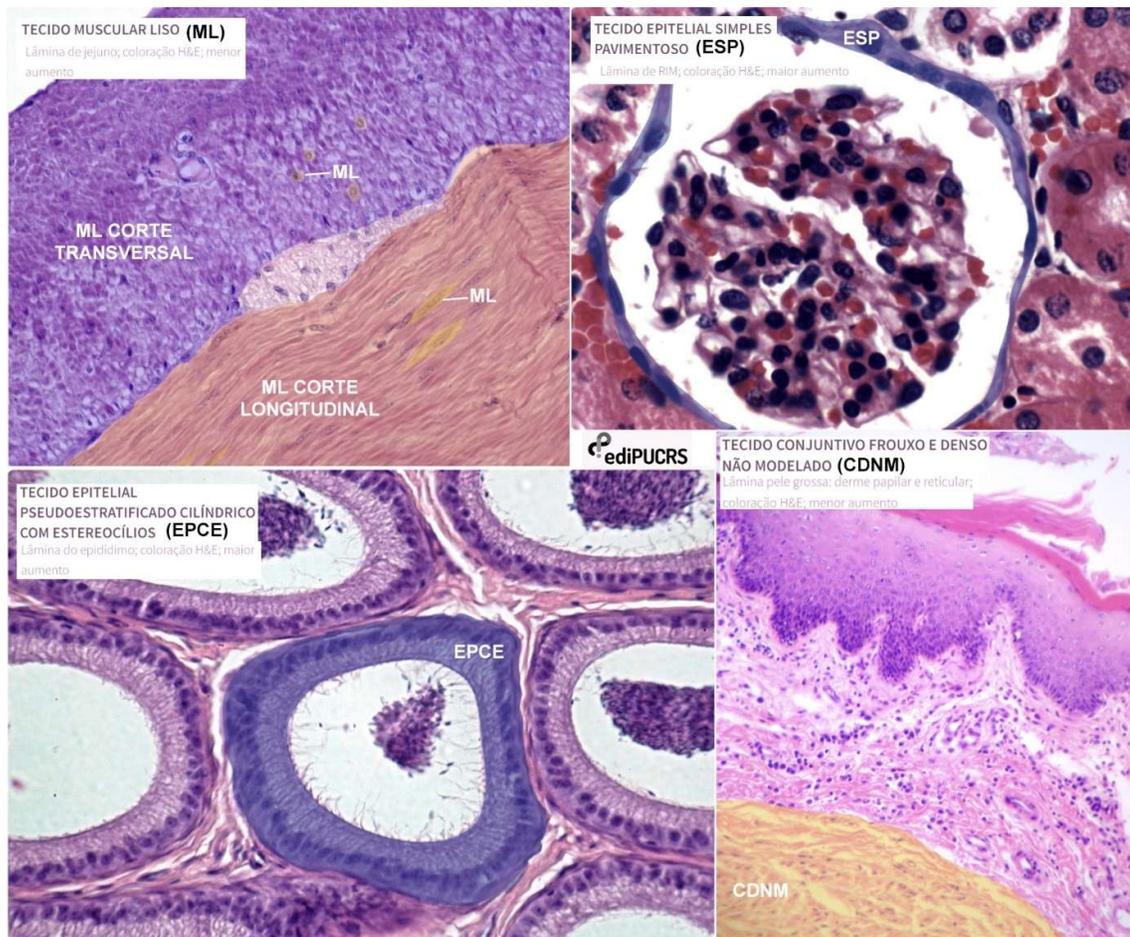


Figura 10 – Cortes histológicos dos tecidos da vesícula seminal. Fonte: [56]. A figura ilustra cortes histológicos, destacando tecido muscular liso (ML), tecido epitelial simples pavimentoso (ESP), tecido epitelial pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios (EPCE) e tecido conjuntivo frouxo e denso não modelado (CDNM).

1.3.4. NITRAÇÃO DE CATECOLAMINAS

A primeira evidência sobre o processo de nitração de catecolaminas foi relatada na década de 90 quando pesquisadores notaram que a quantificação de noradrenalina em hipotálamo de rato era reduzida na presença de NO. Em sequência, observaram que a quantificação de 6-nitronoradrenalina em cérebro de rato era reduzida após exposição ao L-NAME (*N*^w-nitro-L-arginine methyl ester), substância que inibe a síntese de NO, e que esse quadro era revertido após exposição ao precursor do NO (L-Arginina), demonstrando uma via de interação entre catecolaminas e o NO [57]. Estudos posteriores relataram que esse processo ocorre em ambientes com altas concentrações de NO (como uma resposta adaptativa à inflamação), sendo regulado pela quantidade de NO, moléculas alvo (como uma catecolamina) e antioxidantes presentes no meio [58].

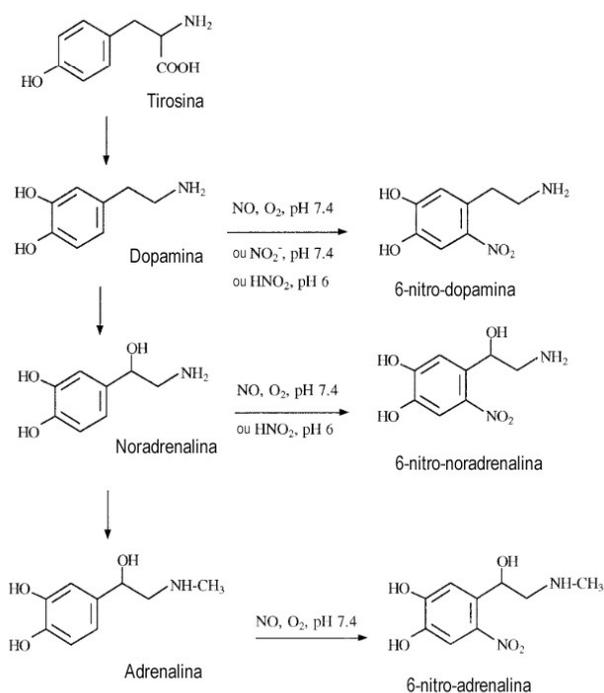


Figura 11 – Mecanismo de nitração proposto para as catecolaminas em 1997. Fonte: adaptada de [58]. A figura ilustra a tirosina que é transformada em dopamina, que pode ser nitrada em 6-nitro-dopamina por NO, O₂, NO₂⁻ (pH 7.4) ou HNO₂ (pH 6). A dopamina é transformada em noradrenalina, que pode ser nitrada em 6-nitro-noradrenalina por NO, O₂ (pH 7.4) ou HNO₂ (pH 6). A noradrenalina é transformada em adrenalina, que pode ser nitrada em 6-nitro-adrenalina por NO, O₂ (pH 7.4).

noradrenalina é transformada em adrenalina, que pode ser nitrada em 6-nitro-adrenalina por NO e O₂ (pH 7.4).

1.4. ENZIMAS NOX/DUOX.

Diferentes sistemas biológicos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs, ou no inglês, “ROS”) através das famílias de enzimas Nox (NADPH oxidases) e Duox (duo oxidases). Existem subtipos das enzimas Nox (tipos 1 a 5) e Duox (tipos 1 e 2) [59-60] e o produto de síntese enzimática varia conforme o subtipo [61]. Nox 1, 2, 3 e 5 (subtipo ativado por Ca²⁺) produzem principalmente superóxido, enquanto a Nox4 produz principalmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂). DUOX1/2 produzem ambos. Após a síntese, as EROs interagem com diversos sistemas para regular ações como a transdução de sinal, funções imunológicas, biossíntese hormonal [62]. O superóxido pode sofrer reação de dismutação (formando H₂O₂) ou interagir com o NO, resultando na formação do ONOO⁻ de forma rápida e eficiente e diminuindo a biodisponibilidade do NO [63]. Existem diferentes mecanismos antioxidantes para neutralizar o peroxinitrito e demais ERNs e EROs, como a ação da catalases e glutathiona peroxidase.

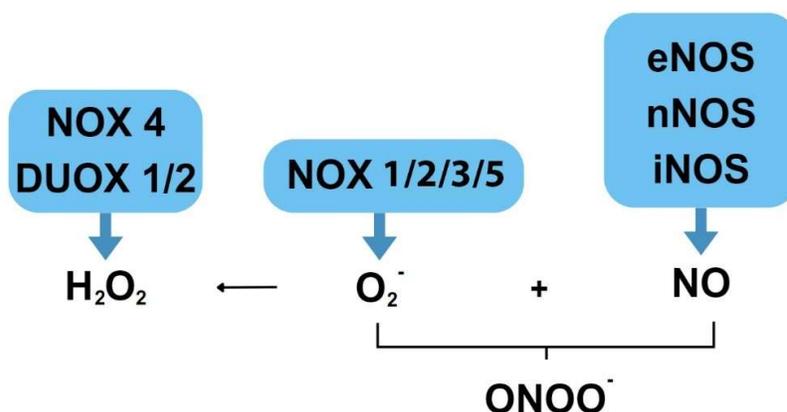


Figura 12 – Relação entre os produtos das enzimas NOX, DUOX e NOS. Fonte: imagem criada pelo autor. A figura ilustra a relação entre os produtos das enzimas NOX 1, 2, 3, 4, 5 e DUOX 1/2 com o produto das isoformas das enzimas NOS. As enzimas NOX 1,2,3 e 5 sintetizam superóxido (O₂⁻) que pode sofrer reação de dismutação para a síntese de H₂O₂ ou reagir com o NO produzido

pelas isoformas NOS, formando o peroxinitrito (ONOO^-). As enzimas NOX4 e DUOX1/2 sintetizam o H_2O_2 .

1.4.1. NOX/DUOX NO SISTEMA EJACULATORIO E GKT137831

As EROs produzidas pelas enzimas NOX/DUOX podem participar como segundos mensageiros em diversas vias fisiológicas, como a contração de músculos esqueléticos, ativação de quinases e a contração dos músculos lisos do sistema ejaculatório. Embora a interação entre essas enzimas e seus subprodutos não esteja elucidada, o bloqueio farmacológico de NOX/DUOX tem sido associado a alterações na função ejaculatória em modelos animais. Ferramentas farmacológicas como o GKT137831 (ou Setanaxibe, que apresenta alta seletividade para inibir as enzimas Nox 1 e 4) estão sendo utilizadas em uma gama de estudos [64-67] para estudar os efeitos da diminuição da síntese de EROs. Visto que diminuindo e/ou impedindo a síntese de EROs, a reação que ocorre entre o NO e o superóxido é dificultada, a aplicação de ferramentas como o GKT137831 pode causar um aumento na biodisponibilidade de NO.

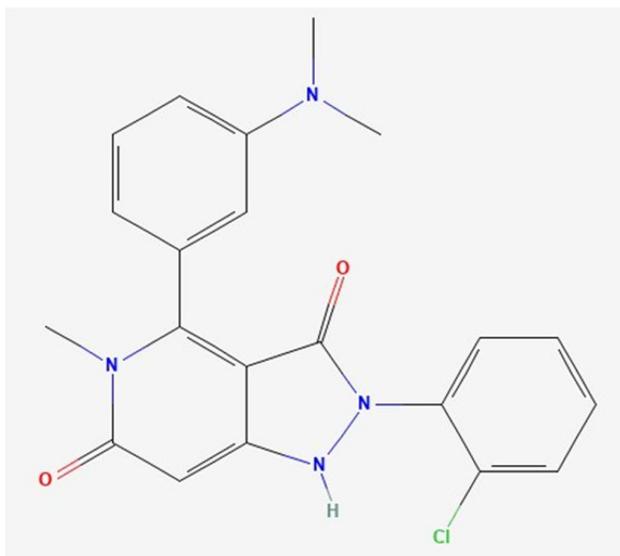


Figura 13 – Estrutura molecular do GKT137831. Fonte: [68]. A figura ilustra a estrutura molecular do GKT137831.

1.4.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

O metabolismo das mitocôndrias pode produzir o H₂O₂ em diferentes tecidos e animais [69] e essa substância pode aumentar o influxo de cálcio através de variados mecanismos [70, 71], fato que é demonstrado em diversos estudos, inclusive nos que investigam células de músculo liso [72]. Embora não exerça ação direta, o H₂O₂ pode influenciar indiretamente o processo de liberação das catecolaminas, pois aumenta o influxo de cálcio para o meio intracelular, favorecendo a exocitose. A formação de H₂O₂ a partir da reação de dismutase do superóxido auxilia a regular os níveis de superóxido no organismo, além de favorecer a biodisponibilidade de NO e H₂O₂.

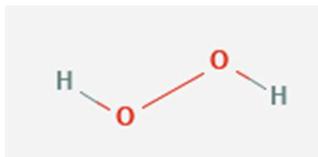


Figura 14 – Estrutura molecular do peróxido de hidrogênio. Fonte: [73]. A figura ilustra a estrutura molecular do peróxido de hidrogênio.

1.4.3. INTERAÇÃO DE EROs E ERNs COM NITROCATECOLAMINAS

Em estudos de liberação basal, a pré-incubação de H₂O₂ aumentou a liberação basal da catecolamina nitrada 6-nitrodopamina (6-ND) em artéria umbilical humana (e a liberação foi diminuída na presença da enzima catalase, demonstrando a relevância do H₂O₂ nesse processo), assim como o GKT137831 e o Difenilenoiodônio, um inibidor das isoformas NOX/DUOX. Quando foi associado com o L-NAME, o GKT137831 não aumentou a liberação basal de 6-ND neste tecido, assim como ocorreu com o Difenilenoiodônio e H₂O₂. Ainda neste tecido, o ácido úrico utilizado como antioxidante para o peroxinitrito não afetou a liberação de 6-ND. Em átrio direito e ducto deferente, o GKT137831 aumentou a quantidade liberada de 6-ND [74].

1.5. 6-NITRODOPAMINA

A 6-nitrodopamina é um produto da nitração da dopamina que é sintetizado através da adição de um grupo nitro (-NO₂) no sexto carbono da molécula e essa reação altera as funções e interações biológicas da molécula, como a afinidade e ação em receptores.

A dopamina age como agonista de receptores D1-like (D₁R e D₅R, associados à estimulação da adenilato ciclase) e D2-like (D₂R, D₃R e D₄R, associados à inibição da adenilato ciclase). Causa vasoconstrição em veia umbilical humana via ativação de receptores D2 e quando o tecido é tratado com L-NAME, o efeito é potencializado. Em artéria umbilical humana, a dopamina causa vasoconstrição apenas quando o tecido é tratado com L-NAME. No coração, apresenta inotropismo moderado e cronotropismo positivo que acabam rapidamente após a lavagem do tecido para a remoção da dopamina.

Já a 6-ND age como antagonista de receptores D2, impedindo a estimulação da adenilato ciclase ao inibir a ação de agonistas (como a dopamina e sumanirole) e, conseqüentemente, a vasoconstrição causada pela dopamina em vasos umbilicais humanos. No coração, apresenta inotropismo e cronotropismo positivos e potentes que continuam mesmo após a lavagem do tecido para a remoção da 6-ND. Os efeitos inotrópicos e cronotrópicos apresentados por essa nitrocatecolamina são inibidos por antagonistas β1-adrenérgicos [74]. Em aorta torácica e artéria pulmonar de sagui, a 6-ND agiu como um agente vasodilatador de maneira independente da via guanilato ciclase (NO-sGC-GMPc).

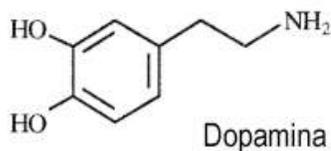


Figura 15 – Diferença estrutural entre a dopamina e a 6-nitrodopamina. Fonte: adaptada de [58]. A figura ilustra a diferença entre as moléculas da dopamina e 6-nitrodopamina que está na adição de um grupo nitro (NO₂) no sexto carbono do anel catecol.

1.5.1. POSSÍVEIS VIAS DE BIOSSÍNTESE

A principal via de biossíntese da 6-ND é dependente da biodisponibilidade de NO gerada pelas enzimas NOS e ocorre na membrana das células endoteliais em que se localizam as eNOS. Uma segunda possível via de biossíntese da 6-ND depende da biodisponibilidade de NO gerada pela redução do nitrato a nitrito e do nitrito a NO, sendo uma via independente de enzimas NOS. A síntese da 6-ND é influenciada por EROs (como através do H_2O_2 que exerce efeito positivo e o O_2^- com efeito negativo), ERNs (como o NO com efeito positivo) e enzimas (como as famílias NOS produzindo NO, NOX/DUOX sintetizando H_2O_2 e O_2^- , catalase degradando H_2O_2 e nitrato redutase aumentando a biodisponibilidade de NO), além das condições locais ideais (como o pH e a concentração de dopamina) para favorecer o processo de nitração das catecolaminas, que pode ocorrer no citosol ou meio extracelular [75].

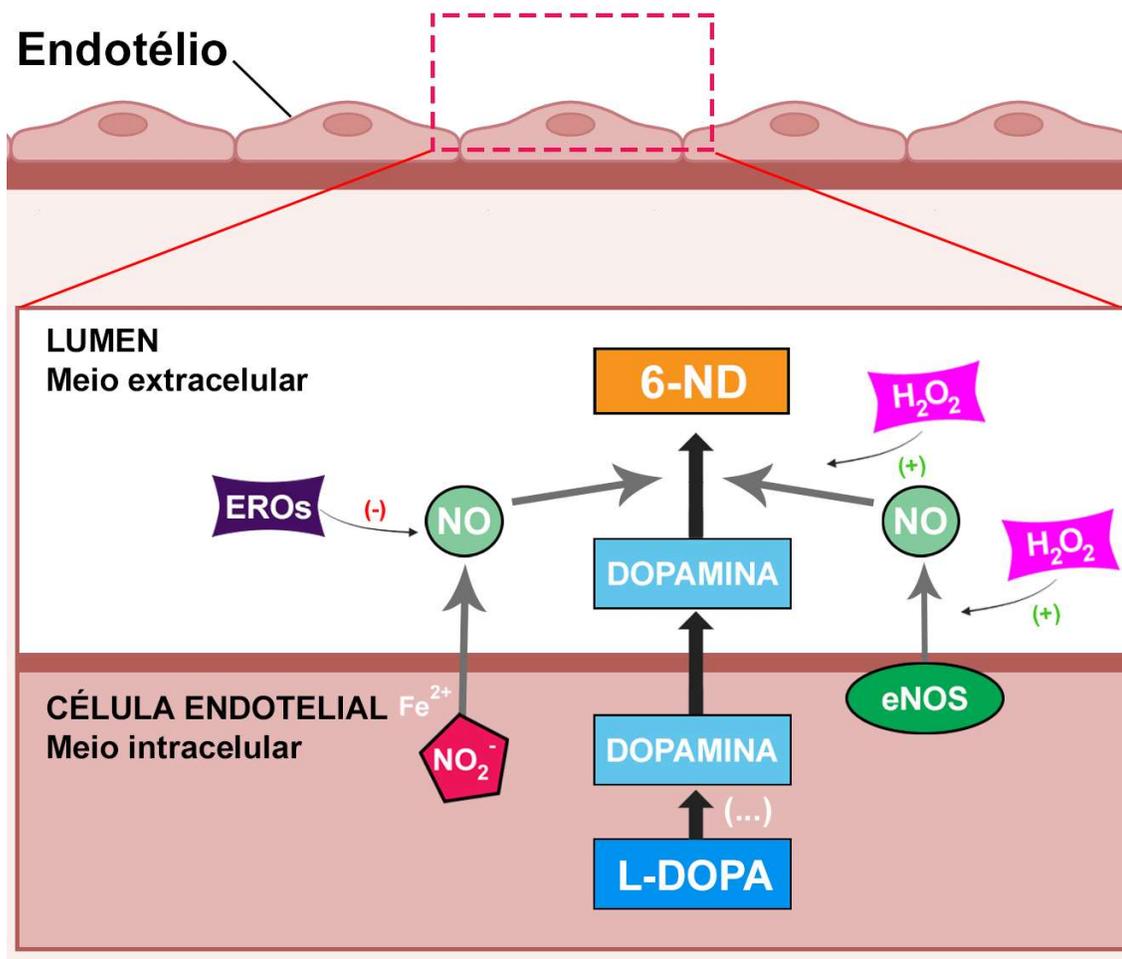


Figura 16 – Mecanismo proposto para a biossíntese de 6-nitrodopamina. Fonte: adaptada de [75]. A figura ilustra o citosol da célula endotelial, onde a dopamina é sintetizada a partir da L-DOPA e é liberada no meio extracelular, podendo interagir com o NO (sintetizado via eNOS e via NO₂⁻) e ocorrer o processo de nitração da dopamina, sintetizando a 6-nitrodopamina. O H₂O₂ aumenta a produção de NO via eNOS e também pode favorecer a síntese da 6-ND, enquanto as EROs afetam negativamente a biodisponibilidade de NO, o que desfavorece a síntese de 6-ND.

1.5.2. LIBERAÇÃO BASAL

A liberação basal de 6-ND foi identificada em artéria e veia umbilical e poplítea humanas [76], aorta de jabuti (*Chelonoidis carbonaria*) [77], aorta de cobra do milho (*Pantherophis guttatus*) [78], artéria pulmonar e aorta de sagui (*Callithrix* spp.) [79], átrio de rato [80], átrios e ventrículos de camundongo [81] e coelho [82], vasos deferentes de ratos [83] e humanos [84] e veia umbilical humana [85].

Em todos os tecidos que apresentaram liberação basal de 6-ND, o pré-tratamento com L-NAME reduziu, porém não aboliu a liberação de 6-ND. Em veia e artéria umbilical humana, a liberação basal de 6-ND apresentou redução significativa tanto com a remoção mecânica do endotélio quanto com o pré-tratamento com L-NAME. Esses dados demonstram que a via de biossíntese da 6-ND pode apresentar uma importante, porém não exclusiva, dependência pelo NO gerado através das enzimas NOS presentes nas células endoteliais. É conhecido que a aorta de répteis apresenta enzimas NOS e a produção de NO. Análises imuno-histoquímicas em aorta de jabuti demonstraram a presença da enzima TH (fator limitante na síntese de catecolaminas) neste tecido, indicando a síntese e liberação de catecolaminas.

Em veia umbilical humana, a liberação basal de 6-ND aumentou significativamente com a pré-incubação do H₂O₂, enquanto a pré-incubação de catalase (enzima que degrada o H₂O₂) apresentou o efeito contrário, demonstrando que o H₂O₂ pode influenciar a via de biossíntese da 6-ND [74].

A TTX (que bloqueia a liberação de neurotransmissores) não afetou a liberação basal de 6-ND em átrio isolado de rato, sugerindo que a 6-ND não provém de uma biossíntese neurogênica. A imuno-histoquímica não detectou os neuromarcadores proteína S-100 e calretinina (CR - encontrados em terminais nervosos) nas túnicas íntima e média da aorta da cobra do milho, indicando a possibilidade da biossíntese da 6-ND neste tecido ser de uma via não neurogênica, cooperando com a hipótese levantada através da ineficiência da TTX em reduzir a liberação basal de 6-ND.

1.5.3. ELECTRIC FIELD STIMULATION - EFS

A técnica do Estímulo de Campo Elétrico (do inglês, EFS) induz contrações em células e tecidos biológicos através de estímulos elétricos. Estudos empregaram EFS em anéis de aorta de cobra do milho [78] e jabuti [86] e demonstraram a importância do endotélio na contração gerada, pois a técnica induziu contrações nos tecidos com o endotélio intacto, porém nos tecidos cujo endotélio foi removido mecanicamente, a habilidade de contração dos tecidos foi drasticamente reduzida. O endotélio também se demonstrou importante para a síntese da 6-ND, pois em veias e artérias umbilicais humanas, a liberação basal reduziu significativamente após a remoção do endotélio.

Em aorta de jabuti, a contração induzida por EFS não foi afetada pela presença da TTX (ferramenta farmacológica que bloqueia a propagação de estímulos nervosos), apontando que o EFS está contraindo de forma independente a estímulos nervosos. Já a pré-incubação de fentolamina (antagonista adrenérgico não seletivo) reduziu de forma significativa as contrações induzidas por EFS, sugerindo que a contração induzida por EFS neste tecido pode ser afetada pela ação da fentolamina (que impede a estimulação de receptores adrenérgicos). As contrações EFS em veia umbilical humana [85] também se demonstraram dependentes do endotélio, sendo inibidas pela fentolamina e não sendo afetadas por TTX, corroborando com os dados das aortas de cobra do milho e jabuti.

1.5.4. 6-ND NO SISTEMA EJACULATÓRIO

Como demonstrado em estudos anteriores, os ductos deferentes isolados de rato e de humano apresentaram liberação de 6-ND, demonstrando a possibilidade dessa nitrocatecolamina influenciar esse sistema e, conseqüentemente, a função sexual. A 6-ND também induziu contrações concentração-dependentes nestes tecidos e potencializou as contrações induzidas por dopamina, noradrenalina, adrenalina e EFS [84].

Camundongos nocaute (KO) para as enzimas eNOS, iNOS e nNOS foram utilizados para avaliar a influência das isoformas NOS na liberação basal de 6-ND em ducto deferente [83]. Em KO-nNOS, a liberação foi significativamente reduzida, porém não afetada em KO-eNOS e KO-iNOS. A pré-incubação de TTX reduziu significativamente a liberação basal de KO-eNOS e KO-iNOS, porém não afetou KO-nNOS. As forças contráteis induzidas por EFS em ducto deferente foram reduzidas significativamente em KO-eNOS e KO-iNOS, porém não foram reduzidas em KO-nNOS (assim como ocorreu com a pré-incubação com L-NAME). As contrações EFS também foram significativamente menos potentes nos ductos deferentes obtidos de KO-nNOS. Estudos anteriores demonstraram a relevância das enzimas NOS na via de biossíntese da 6-ND e os resultados obtidos em camundongos nocaute demonstraram que a nNOS é a principal isoforma NOS na via de biossíntese da 6-ND em ducto deferente de camundongo.

A biossíntese e liberação de 6-nitrodopamina foi aumentada quando o ducto deferente foi pré-incubado com o GKT137831 (inibidor NOX1/4) e esse aumento ocorreu com uma redução simultânea e significativa na quantidade detectada de dopamina [74], sugerindo que a inibição da síntese de ânions superóxido causada pelo GKT137831 pode aumentar a síntese e liberação da 6-ND.

A pré-incubação dos antidepressivos tricíclicos desipramina, clomipramina e amitriptilina inibiu a contração induzida por 6-ND em ducto deferente isolado de rato [87] e de humano [84] sem afetar a contração induzida pelas catecolaminas clássicas, assim como os bloqueadores α_1 -adrenoceptores que antagonizaram seletivamente a contração induzida por 6-ND em rato [88] e humano [89]. Antagonistas seletivos β_1 -adrenérgicos e antagonistas não seletivos β_1/β_2 -adrenérgicos reduziram significativamente a contração gerada pela 6-ND em ducto deferente de rato, mas não afetaram as contrações induzidas pela dopamina, noradrenalina e adrenalina. Em concentrações maiores, esses antagonistas também reduziram as contrações induzidas por EFS, porém não nos tecidos previamente tratados com L-NAME. Os efeitos inotrópicos e cronotrópicos apresentados pela 6-ND são inibidos por antagonistas β_1 -adrenérgicos. As ferramentas farmacológicas RO-363 (agonista seletivo β_1), salbutamol (agonista seletivo β_2) e mirabegron (agonista seletivo β_3) não apresentaram efeitos contráteis no ducto deferente de

rato, portanto os antagonistas beta-adrenérgicos (seletivos e não seletivos) que reduziram a resposta contrátil gerada pela 6-ND podem ter gerado esse efeito interagindo com receptores diferentes dos beta-adrenérgicos, abrindo a possibilidade da existência de receptores específicos para a 6-ND endógena [90].

1.6. O USO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS E ANTAGONISTAS DE α_1 -ADRENOCEPTORES COMO TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES SEXUAIS

Os antidepressivos tricíclicos inibem a recaptação de noradrenalina e serotonina [91], prolongando o seu tempo de permanência na fenda sináptica e, conseqüentemente, aumentando a concentração disponível destes neurotransmissores para estimular receptores. Essa classe farmacológica pode modular o SNC induzindo a ejaculação tardia e redução do volume ejaculatório. Porém, diminuição da libido e disfunção erétil são reações adversas encontradas na bula do Anafril®, marca referência da Clomipramina que compõe o grupo dos antidepressivos tricíclicos.

Os antagonistas de α_1 -adrenoceptores bloqueiam a ação da noradrenalina [92] ao competir pelo sítio de ligação farmacológico. Essa classe farmacológica reduz a excitabilidade do SNSIM ao diminuir o estímulo causado pela noradrenalina aos receptores, podendo aumentar o tempo necessário para a ejaculação. Porém, impotência sexual é encontrada na bula do Minipress SR® (marca referência da prazosina, substância que compõe o grupo de antagonistas de α_1 -adrenoceptores) como reação adversa.

Os antidepressivos tricíclicos [93, 94] e os antagonistas de α_1 -adrenoceptores [95] apresentam efeitos adversos que diminuem a performance sexual, portanto são associados a distúrbios ejaculatórios, como a ejaculação tardia, a redução do volume de ejaculação e/ou a ausência de ejaculação. Cria-se então um paradoxo farmacológico, pois embora essas classes farmacológicas apresentem efeitos colaterais que podem piorar ou até causar os sintomas das disfunções sexuais, ambos são utilizados no tratamento da ejaculação precoce [96, 97].

Considerando que essas duas classes farmacológicas apresentam mecanismos de ação opostos e efeitos adversos como distúrbios sexuais (e ainda assim são empregadas no tratamento da ejaculação precoce), é provável que haja uma via de sinalização em comum entre eles (porém diferente das vias serotoninérgicas e adrenérgicas até então estudadas) no processo ejaculatório, visto

que esse complexo processo é modulado por múltiplos sistemas de neurotransmissão. As disfunções sexuais associadas a essas classes podem não ser atribuídas exclusivamente ao efeito direto causado por elas em receptores adrenérgicos e serotoninérgicos, mas sim por uma nova via de sinalização. Mais estudos são necessários para elucidar essa possível interação, além de desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes que minimizam os efeitos adversos dessas classes.

1.7. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Considerando que:

- (1) a 6-nitrodopamina é um modulador endógeno da contratilidade do ducto deferente humano [84] e de rato [87],
- (2) o óxido nítrico é relevante na via da 6-ND [33, 75, 81, 83, 85, 98],
- (3) as espécies reativas de oxigênio podem influenciar a biodisponibilidade da 6-ND [100],
- (4) o GKT137831 e o peróxido de hidrogênio aumentam a liberação de 6-ND em ducto deferente [74],
- (5) a liberação basal de 6-ND na vesícula seminal humana não é afetada por TTX [101],
- (6) e o ducto deferente e a vesícula seminal exercem atividade no sistema reprodutor masculino, investigar se a vesícula seminal isolada de rato naturalmente, ou de forma induzida, libera 6-ND e a ação que essa nitrocatecolamina exerce na contração deste tecido, torna-se plausível.

Interrogamos se:

- (1) a 6-ND comporta-se na vesícula seminal da mesma maneira que em ducto deferente;
- (2) a 6-ND demonstra potência contrátil diferente das demais catecolaminas na vesícula seminal;
- (3) a síntese da 6-ND ocorre através da nitração da dopamina sintetizada pela L-DOPA na vesícula seminal; e
- (4) a ação da 6-ND em vesícula seminal humana e de rato se assemelham, como ocorre em ducto deferente

Mais estudos são necessários para elucidar a influência da 6-ND nas funções da vesícula seminal. Avaliar a expressão de TH através de imuno-histoquímica e hibridização “in situ” fluorescente neste tecido pode contribuir para a pesquisa de catecolaminas e possíveis tecidos que as sintetizam. O aprimoramento da compreensão das catecolaminas e seus análogos é essencial para a evolução do

conhecimento médico e farmacológico, podendo impactar os tratamentos farmacológicos existentes e a qualidade de vida dos pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a liberação basal de 6-nitrodopamina na vesícula seminal isolada de *Rattus norvegicus* (rato) e a sua influência na capacidade contráctil deste tecido.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Quantificar a liberação basal de 6-nitrodopamina, dopamina, adrenalina e noradrenalina e a liberação destas quando influenciadas pela pré-incubação com L-NAME, TTX, H₂O₂, GKT137831 e a remoção do epitélio, experimentando cada situação de forma isolada em vesícula seminal isolada de rato.
- 2) Em vesícula seminal de rato, analisar as seguintes situações contráteis, experimentando cada situação de forma isolada:
 - Contrações bases induzidas por 6-nitrodopamina, dopamina, adrenalina e noradrenalina e comparar a concentração pEC₅₀ e o E_{max}.
 - Contrações bases induzidas pelas mesmas catecolaminas, porém quando influenciadas pela pré-incubação de 6-nitrodopamina, adrenalina, dopamina, noradrenalina e tetrodotoxina.
 - Contrações frequência-dependentes induzidas por estímulo elétrico na presença e ausência de L-NAME e do epitélio da vesícula seminal de rato.
- 3) Em vesícula seminal de rato, avaliar os biomarcadores TH, S100 e CR através das técnicas imuno-histoquímica e de hibridização “in situ”.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Ratos Wistar machos adultos foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP e da ANILAB (Paulínia, São Paulo, Brasil). O protocolo para a utilização de ratos foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP: 6172-1/2023 e 6320-1/2023) e seguiu recomendações do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA - Lei Arouca, nº11.794) [102] e o “ARRIVE Guideline – Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments” [103]. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brasil), onde foram posicionados três animais por gaiola em local ventilado com umidade de $55\pm 5\%$ e temperatura $24\pm 1^\circ\text{C}$ em ciclo de 12 horas de luz por dia, com alimentação padrão de roedores e água ad libitum.

3.2. TRATAMENTO L-NAME

Ratos foram tratados cronicamente com o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME (20mg/rato/dia) disposto na água de consumo durante 4 semanas [104]. Animais de controle receberam água comum para o consumo.

3.3. OBTENÇÃO DA VESÍCULA SEMINAL DE RATO PARA QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO BASAL E ESTUDOS FUNCIONAIS

As vesículas seminais isoladas de rato foram obtidas de animais anestesiados e eutanasiados com overdose de isofurano (concentração de 5% por 2 minutos), seguido de sangria. Após a eutanásia, o par de vesículas seminais do

animal foi removido post mortem e, então, colocado em solução de Krebs (KHS). O par foi dividido em duas tiras longitudinais (esquerda e direita) de vesícula seminal e dissecado, retirando o líquido seminal contido em seu interior e lavando com solução salina. Após esse preparo, as duas tiras de vesícula seminal de rato foram encaminhadas para utilização na quantificação da liberação de catecolaminas e nos estudos funcionais.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA

Após o preparo das vesículas seminais, um único par (composto pelas duas tiras) foi alocado durante 30 minutos numa cuba de banho de órgãos que foi previamente preparada com 3 mL de solução KHS e ácido ascórbico (3mM) a 37°C, recebendo continuamente uma mistura gasosa de 95% O₂ e 5% CO₂. Essa incubação foi dividida em duas fases de 30 minutos cada.

Na primeira fase, a cuba conteve apenas solução KHS e ácido ascórbico e, após 30 os minutos, uma alíquota de 2 mL foi coletada e armazenada em tubo âmbar a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).

A segunda fase ocorreu após a coleta da primeira alíquota e lavagem da cuba (o tecido foi removido da cuba, o conteúdo líquido restante foi extravasado e então a cuba foi preenchida com 10 mL de solução KHS. Após o preenchimento, o líquido foi extravasado e o procedimento se repetiu cinco vezes para finalmente retornar o tecido para a cuba). A cuba foi preparada com 3 mL de solução KHS, ácido ascórbico (3mM) e com uma ferramenta farmacológica (L-NAME 100µM, tetrodotoxina 1µM, GKT137831 1µM ou peróxido de hidrogênio 100µM) para avaliar a liberação basal das quatro catecolaminas, seguindo as mesmas condições e tempo da primeira fase. Após os 30 minutos, a segunda alíquota de 2 mL foi

coletada e armazenada em tubo âmbar a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).

Portanto, cada par de vesícula seminal de rato passou por duas fases de liberação. A primeira na ausência de ferramentas farmacológicas e a segunda na presença de apenas uma ferramenta.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO EPITÉLIO

Após o preparo das vesículas seminais, um único par (composto pelas duas tiras) foi alocado durante 30 minutos numa cuba do banho de órgãos que foi previamente preparada com 3 mL de solução KHS e ácido ascórbico (3mM) a 37°C , recebendo continuamente uma mistura gasosa de 95% O_2 e 5% CO_2 . Essa incubação foi dividida em duas fases de 30 minutos cada.

A primeira fase experimentou a liberação basal de catecolaminas do tecido sem intervenções e após os primeiros 30 minutos, uma alíquota de 2 mL foi coletada e armazenada em tubo âmbar a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).

A segunda fase ocorreu após a coleta da primeira alíquota, a remoção do tecido e a lavagem da cuba (o tecido foi removido da cuba, o conteúdo líquido restante foi extravasado e então a cuba foi preenchida com 10 mL de solução KHS. Após o preenchimento, o líquido foi extravasado e o procedimento se repetiu cinco vezes para finalmente retornar o tecido para a cuba). O par de tecido removido da cuba passou por um procedimento de raspagem para a remoção do epitélio (a adventícia da vesícula seminal é cortada, atravessando a camada muscular e expondo o epitélio que passa pelo processo de raspagem). Então, foi alocado na cuba que novamente foi preparada com 3 mL de solução KHS e ácido ascórbico (3mM). Após 30 minutos, uma segunda alíquota de 2 mL foi coletada e armazenada em tubo âmbar a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).

3.6. PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA E QUANTIFICAÇÃO DAS CATECOLAMINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM (LC-MS/MS)

As catecolaminas (6-nitrodopamina, dopamina, adrenalina e noradrenalina) foram extraídas da solução KHS através de cartuchos SPE reversos poliméricos Strata™-X 33 mm (Phenomenex Inc, USA). Os padrões internos deuterados 6-nitrodopamina-d4, dopamina-d3, noradrenalina-d6 e adrenalina-d6 (50 µL, 100 ng/mL) foram adicionados à amostra de solução KHS (1 mL) e a solução foi mixada por equipamento de vórtex durante 10 segundos para ser injetada no cartucho preconditionado (1 mL de solução metanol seguido por 2 mL de água deionizada). A eluição das catecolaminas foi realizada com 0.9 mL de solução metanol/água deionizada (90/10, v/v) com 0,1% de ácido fórmico e o líquido eluente foi evaporado sob fluxo constante de gás nitrogênio a 50°C. O resíduo foi dissolvido em 0,1 mL de solução acetonitrila/água deionizada (50/50, v/v) e 0.1% de ácido fórmico. A fase móvel, composta por 75% de solução A (água deionizada + 0.1% de ácido fórmico v/v) e 25% de solução B (Acetonitrila/água deionizada 90/10 v/v + 0.1% de ácido fórmico) foi bombeada num fluxo de 350 µL/min através de uma coluna Shim-pack GIST-HP C18 150 mm x 3mm, tamanho de partícula de 3 µm (Shimadzu, Duisburg, Alemanha). O espectrômetro de massa (Shimadzu 8060 espectrometro de massa triplo quádruplo, Shimadzu, Kyoto, Japão) foi operado em modo de ionização por electrospray positiva e os resíduos dissolvidos foram injetados (3µL) por um auto injetor SIL-30AC (Shimadzu, Japão), mantido a 8°C em um sistema de cromatografia líquida LC ADVp Shimadzu (Shimadzu, Japão). As transições monitoradas por espectrometria de massa em tandem com monitoramento de reação múltipla (MRM), volume de injeção, tempo de execução, limite de quantificação e validação do método seguindo as diretrizes da FDA para métodos bioanalíticos (FDA, 2023) foram descritas em trabalho anterior do grupo [77].

3.7. LINEARIDADE E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

A linearidade é avaliada através das curvas de calibração de 8 padrões de calibração nas faixas de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 e 20 ng/mL, em duplicata. A razão da área dos picos do padrão interno de 6-nitrodopamina é plotada em relação à concentração nominal de 6-nitrodopamina. Uma análise de regressão linear ponderada (1/x) foi feita para determinar a curva das linhas de calibração, intercepto e coeficiente de correlação (r) para avaliar a linearidade. O critério de aceitação para “r” foi >0.98. O limite de quantificação (LLOQ) foi avaliado através da análise de 7 replicatas da menor concentração da curva de calibração (0.1 ng/mL) com precisão de <20%, determinada pelo coeficiente de variação (CV%) e a precisão de 80%-120% calculada como porcentagem relativa de erro (% RE).

3.8. ANÁLISE DE DADOS DA QUANTIFICAÇÃO DAS CATECOLAMINAS

Os dados foram expressos em média + erro padrão da média do número de experimentos (N). ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para a análise dos dados da liberação basal das quatro catecolaminas. Teste T de Student não pareado monocaudal foi utilizado para a análise dos dados da liberação basal influenciada por ferramentas farmacológicas. O valor de $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

3.9. ESTUDOS FUNCIONAIS

Curvas de concentração-resposta foram utilizadas para avaliar as forças contráteis das vesículas seminais isoladas de rato quando induzidas por catecolaminas, na ausência e na presença de ferramentas farmacológicas.

3.10. MONTAGEM DO BANHO DE ÓRGÃOS PARA OS ESTUDOS FUNCIONAIS

Após a obtenção do par de vesículas seminais de rato através do método descrito anteriormente, cada tira do par passou por uma técnica de amarração com uma linha de costura fina que posicionou um laço na parte superior e outro na parte inferior do tecido. Ambas as tiras foram montadas verticalmente numa cuba de vidro de um banho de órgãos preenchida com 10 mL de solução KHS.

O laço da parte inferior da vesícula seminal foi preso num gancho de ferro que é fixo dentro cuba e o laço da parte superior foi alocado no transdutor isométrico. A solução KHS de dentro da cuba foi continuamente alimentada por gás carbogênio (95% O₂, 5% CO₂) e mantida a 37°C através de um aquecedor Heated Circulator (PolyScience, Illinois, EUA). A tira de tecido é equilibrada sob tensão de 10 mN (milinewtons) durante 45 minutos e a tensão isométrica é registrada através de um PowerLab System (ADInstruments, Sydney, Austrália) e o registro dos dados pelo software LabChart™ (versão 8.0, ADInstrument, MA, EUA).

Após 45 minutos, a tira de tecido passou por uma contração teste inicial induzida por 10µM de noradrenalina que verificou a viabilidade de sua utilização ao longo do experimento através da força contrátil exercida pelo tecido montado. Quando o tecido contraiu acima de 5mN de diferença da estabilização de 10mN, o mesmo foi considerado viável para o experimento. Caso contrário, foi descartado, pois provavelmente sofreu danos durante o preparo e não contrai como deveria, portanto, não estaria apto para ser empregado no experimento de contração. Nessa etapa, as duas tiras montadas foram divididas entre controle e tratado (que foi experimentado na presença de ferramentas farmacológicas)

3.11. CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DAS CURVAS DE CATECOLAMINAS

As curvas cumulativas de concentração-resposta para 6-nitrodopamina (10nM a 300µM), dopamina (10nM a 300 µM), noradrenalina (10nM a 300µM) e adrenalina (10nM a 300µM) foram realizadas na vesícula seminal de rato.

3.12. INTERAÇÃO DE 6-NITRODOPAMINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

As curvas cumulativas de concentração-resposta para dopamina (10nM a 300µM), noradrenalina (10nM a 300µM) e adrenalina (10nM a 300µM) foram realizadas na vesícula seminal de rato na ausência e presença de 6-nitrodopamina (10pM a 100nM, pré-incubada por 30 minutos).

3.13. INTERAÇÃO DE NORADRENALINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

As curvas cumulativas de concentração-resposta para dopamina (10nM a 300µM) e adrenalina (10nM a 300µM) foram realizadas na vesícula seminal de rato na ausência e presença de noradrenalina (10nM, pré-incubada por 30 minutos).

3.14. INTERAÇÃO DE ADRENALINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

As curvas cumulativas de concentração-resposta para dopamina (10nM a 300µM) e noradrenalina (10nM a 300µM) foram realizadas na vesícula seminal de rato na ausência e presença de adrenalina (10 nM, pré-incubada por 30 minutos).

3.15. INTERAÇÃO DE DOPAMINA COM AS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

As curvas cumulativas de concentração-resposta para noradrenalina (10nM a 300µM) e adrenalina (100nM a 300µM) foram realizadas na vesícula seminal de rato na ausência e presença de dopamina (10nM, pré-incubada por 30 minutos).

3.16. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA RESPOSTA DE CONTRAÇÃO DAS CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

As curvas cumulativas de concentração-resposta para dopamina (10nM a 300µM), noradrenalina (10nM a 300µM) e adrenalina (10nM a 300µM) foram realizadas na vesícula seminal de rato na ausência e presença de tetrodotoxina (1µM, pré-incubada por 30 minutos).

3.17. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA INTERAÇÃO DE 6-NITRODOPAMINA COM CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

As curvas cumulativas de concentração-resposta para dopamina (10nM a 300µM), noradrenalina (10nM a 300µM) e adrenalina (10nM a 300µM) foram realizadas na vesícula seminal de rato com tetrodotoxina (1µM, pré-incubada por 30 minutos) na ausência e presença de 6-nitrodopamina (100nM, pré-incubada por 30 minutos).

3.18. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA INTERAÇÃO DA DOPAMINA COM CATECOLAMINAS NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

As curvas cumulativas de concentração-resposta para noradrenalina (10nM a 300 μ M) e adrenalina (10nM a 300 μ M) foram realizadas na vesícula seminal de rato com tetrodotoxina (1 μ M, pré-incubada por 30 minutos) na ausência e presença de dopamina (10nM, pré-incubada por 30 minutos).

3.19. EFEITO DO L-NAME NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

A análise da frequência-resposta para estímulo elétrico (4, 8, 16 e 32 Hz) foi realizada na vesícula seminal de rato na presença e ausência de L-NAME (100 μ M, pré-incubado por 30 minutos).

3.20. EFEITO DO EPITÉLIO NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

A análise da frequência-resposta para estímulo elétrico (4, 8, 16 e 32 Hz) foi realizada na vesícula seminal de rato na ausência e na presença do epitélio. Para realizar o teste com o epitélio, o tecido foi montado como descrito anteriormente. Para realizar o teste sem o epitélio, foi realizada uma técnica de raspagem para a remoção do epitélio antes da montagem do tecido na cuba do banho de órgãos.

3.21. ANÁLISE DE DADOS DOS ESTUDOS FUNCIONAIS

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média do número experimental (N). Os valores de pEC₅₀ foram determinados com uma análise de regressão não linear através do GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 9.5, San Diego, Califórnia, USA). Os valores E_{MAX} (mN) foram determinados através do

efeito máximo produzido pela ferramenta farmacológica que induziu a contração do tecido, na maior dose administrada ou frequência de estímulo elétrico. Cada animal proveu duas tiras de vesícula seminal, sendo que uma tira foi utilizada como controle e a outra passou por tratamento com ferramenta farmacológica. ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett foi utilizado para a análise de comparação dos dados das curvas cumulativas de concentração-resposta entre as quatro catecolaminas. No teste de múltiplas comparações de Dunnett, os dados da 6-nitrodopamina foram utilizados como “controle” para comparação com as demais catecolaminas. Teste T de Student não pareado monocaudal foi utilizado para a análise dos dados das curvas cumulativas de concentração-resposta influenciadas por ferramentas farmacológicas. O valor de $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

3.22. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Amostras de vesículas seminais obtidas de 4 ratos Wistars foram fixadas em formalina tamponada 10% (FFPE - formalin-fixed/paraffin-embedded) e submetidas ao processamento histológico automático (processador automático de tecidos Lupetec). Cortes histológicos de 4µm de espessura foram obtidos dos blocos de parafina contendo as amostras das vesículas seminais e coradas com Hematoxilina&Eosina (H&E).

Também foram feitos cortes histológicos na mesma espessura para as reações de imuno-histoquímica (IHP). Para a IHP, os cortes de tecido foram desparafinados em xileno e reidratados em uma série de banhos de etanol em concentrações decrescentes, durante 5 minutos cada. Os anticorpos utilizados nesse estudo foram: anti-S100 (monoclonal de coelho; clone EP32; pronto para uso; Leica, Biosystems, São Paulo, Brasil), anti-CR (monoclonal de coelho; código de catálogo ac92341, diluição 1:100 em PBS, Abcam, Cambridge, UK) e anti-TH (policlonal de galinha; código de catálogo ac76442; diluição 1:500 em PBS; Abcam; Cambridge, USA). A reação de IHP para o anticorpo anti-S100 foi realizada em equipamento (Bond Max Leica Automated Immunostainer (Leica Biosystems, São Paulo, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. A imunodeteção de TH e CR foi desenvolvida manualmente, seguindo protocolos padronizados em estudos anteriores pela equipe.

Com relação à recuperação antigênica (para a IHP manual e automatizada), foi utilizada a solução tampão citrato pH 6.0 (10mM) em panela a vapor por 20 minutos (a 95°C). Os anticorpos primários foram incubados durante 2h em temperatura ambiente (25°C). Depois, as lâminas foram lavadas em PBS (2x5 min cada). Para o anticorpo anti-TH, foram realizados os seguintes passos: (1) Incubação com anticorpo secundário de cabra anti-gama imunoglobulina IgG de galinha (ac150169, diluição 1:500 em PBS, Abcam, USA) por 1 h a temperatura ambiente; (2) Incubação com anticorpo terciário de coelho anti-gama imunoglobulina IgG (AP106P, diluição 1:500 em PBS, Abcam, USA) por 1 hora a temperatura ambiente.

Para a revelação de todas as amostras com os respectivos anticorpos (anti-TH e anti-CR) foi utilizado o NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra/Leica Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Para a detecção da expressão dos marcadores foi utilizado o Diaminobenzidine (DAB líquido, DakoCytomation, Carpinteria, USA) como cromógeno. A contracoloração foi feita com Hematoxilina de Harris, foram feitas lavagens em água corrente e, posteriormente, as lâminas foram desidratadas em uma sequência seriada de álcoois e xilóis. A montagem das lâminas foi feita com Entellan (Merck/Sigma). Em seguida, as lâminas foram analisadas e fotomicrografadas utilizando um microscópio Trinocular Eclipse 50i (Nikon, Tokyo, Japan) acoplado a uma câmera digital CMOS 10MP (AmScope, EUA).

Amostras de cérebro humano fixadas em formalina foram utilizadas como controle positivo para a presença de TH, S100 e CR. Já no controle negativo, o anticorpo primário foi omitido e as lâminas foram incubadas com os diluentes do anticorpo primário. Isso foi feito para todos os experimentos de imuno-histoquímica para identificar qualquer reação de fundo. Os dados foram analisados por um médico patologista MD, PhD (AAS) que não sabia da ausência ou presença do anticorpo primário na amostra sob análise (o observador não sabia se analisava uma amostra incubada com os anticorpos primários de interesse ou um controle de omissão de anticorpo primário, pois os rótulos das lâminas foram cobertos com um adesivo removível).

3.23. HIBRIDIZAÇÃO “in situ” FLUORESCENTE (FISH)

Para confirmar e validar a expressão e a topografia da proteína TH, foi avaliada a expressão de mRNA de TH, utilizando o método FISH. Os cortes de vesícula seminal de rato (N=4) de 4µm foram desparafinados em xileno e reidratados gradualmente através de banhos de etanol de concentração decrescente, durando 5 minutos cada banho. As amostras foram incubadas em solução HCl 0.2 N por 20 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, tratadas com solução tampão citrato pH 6.0 (ZytoVision kit, código de catálogo Z-2028-20, Alemanha) por 1h a 80°C. Após esse tempo, as lâminas foram incubadas com pepsina por 8 min a temperatura ambiente para a realização da digestão enzimática.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com 2XSSC (ZytoVision kit, código de catálogo Z-2028-20, Alemanha) e submetidas a uma sequência de banhos em etanol (75%, 80% e 100% por 2 minutos cada) e secadas à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com 100µL de sonda para detecção de mRNA TH marcada com o fluoróforo Fluoresceína 6-FAM na região 5' (sequência de nucleotídeos da sonda: 5'-AACCGCGGGGACATGATGGCCT-3'; RNA T_m = 77.8°C; código de catálogo VC00021, Sigma/Merck, Alemanha), na concentração de 100µM em água livre de enzima RNase por 10 min a 75°C e, overnight a 37°C em hidridador Dako (Dako, Denmark).

No dia seguinte, as lâminas foram colocadas em solução UREA/0,1Xssc a 45°C por 30 minutos, lavadas com solução 2xSSC por 2 minutos e desidratadas em banhos de etanol 75%, 85% e 100% por 2 minutos cada, e secadas em temperatura ambiente.

Por fim, as lâminas foram montadas em 15 µL de DAPI (do ZytoVision Kit) e lamínula (seladas com Fixogum Rubber Cement, Marabu, Alemanha). Todas as lâminas obtidas pelo método FISH foram analisadas e fotomicrografadas utilizando um Microscópio Trinocular DM4000 B LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) acoplado a uma Câmera DFC 310 FX 1.4MP (Leica, Switzerland). O controle negativo consistiu na omissão da sonda do mRNA e foi realizado em todos os experimentos de FISH (um controle negativo/caso) para o controle de qualquer autofluorescência significativa.

LISTA DE ANTICORPOS, REAGENTES E FORNECEDORES

- 6-nitrodopamina e 6-nitrodopamina-d4 foram adquiridas de Toronto Research Chemical Inc (Toronto, Ontario, Canada).
- Adrenalina, noradrenalina, tetrodotoxina e GKT137831 foram adquiridos da Cayman Chemical Co (Michigan, EUA).
- Dopamina foi obtida de Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, Missouri, EUA).
- Cloridrato de Dopamina-d3, cloridrato de DL-noradrenalina-d6 e cloridrato de adrenalina-d6 foram adquiridas de CDN Isotopes (Quebec, Canadá).
- Peróxido de Hidrogênio foi adquirido de Exodo Científica (Sumaré, São Paulo, Brasil).
- Cartuchos Strata™-X 33 mm Polymeric Reversed SPE foram adquiridos de Phenomenex (Califórnia, EUA).
- Coluna cromatográfica GIST-HP C18 foi obtida de Shimadzu (Duisburg, Alemanha).
- Cloreto de Sódio (NaCl), Cloreto de Potássio (KCl), Cloreto de Cálcio (CaCl₂), Sulfato de Magnésio (MgSO₄), Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃), Fosfato de Potássio monobásico (KH₂PO₄) e Dextrose (glucose) foram adquiridas de Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).
- A composição da solução de Krebs-Henseleit's em mM: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.3 e Dextrose 5.6.
- Anti-S100 (monoclonal de coelho; clone EP32; pronto para uso) foi adquirido de Leica Biosystems (São Paulo, Brasil).
- Anti-CR (monoclonal de coelho; código de catálogo ac92341, diluição 1:100 em PBS) foi adquirido de Abcam (Cambridge, Reino Unido).
- Anti-TH (policlonal de galinha; código de catálogo ac76442; diluição 1:500 em PBS) foi adquirido de Abcam (Cambridge, Reino Unido).
- Anticorpo secundário de cabra anti-gama imunoglobulina IgG de galinha (ac150169, diluição 1:500 em PBS) foi adquirido de Abcam (California, EUA).
- Anticorpo terciário de coelho anti-gama imunoglobulina IgG (AP106P, diluição 1:500 em PBS) foi adquirido de Abcam (California, EUA).

- Diaminobenzidina (DAB líquido) foi obtido de DakoCytomation, (Carpenteria, EUA).
- Entellan foi adquirido de Merck/Sigma Aldrich (Gillingham, Reino Unido).
- Solução tampão citrato pH 6.0 (ZytoVision kit, código de catálogo Z-2028-20) foi adquirido de ZytoVision (Bremerhaven, Alemanha).
- 2XSSC (ZytoVision kit, código de catálogo Z-2028-20) foi adquirido de ZytoVision (Bremerhaven, Alemanha).
- Sonda de mRNA TH marcada com o fluoróforo Fluoresceína 6-FAM na região 5' (RNA mensageiro de TH com a sequência de sonda 5'-AACCGCGGGGACATGATGGCCT-3'. RNA T_m = 77.8°C, na concentração de 100µM em água livre de enzima RNase, código de catálogo VC00021) foi adquirido de Merck/Sigma Aldrich (Gillingham, Reino Unido).
- DAPI (ZytoVision kit, código de catálogo Z-2028-20) foi adquirido de ZytoVision (Bremerhaven, Alemanha).
- Fixogum Rubber Cement foi adquirido de Marabu (Berlim, Alemanha).
- Hematoxilina&Eosina (H&E).
- Formalina tamponada 10% (FFPE - formalin-fixed/paraffin-embedded).
- Solução PBS foi adquirida de Merck/Sigma Aldrich (Gillingham, Reino Unido).
- Solução HCl 0.2 N. HCL foi adquirida de Merck/Sigma Aldrich (Gillingham, Reino Unido).
- Pepsina (ZytoVision kit, código de catálogo Z-2028-20) foi adquirido de ZytoVision (Bremerhaven, Alemanha).
- Solução UREA/0,1Xssc foi adquirida de Merck/Sigma Aldrich (Gillingham, Reino Unido).
- Amostras de cérebro humano controle positivo TH, proteína S100 e CR.
- sequência seriada de álcoois e xilóis.

4. RESULTADOS

4.1. LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO

A vesícula seminal de rato apresentou liberação basal das quatro catecolaminas, porém a 6-nitrodopamina (6-ND) indicou níveis maiores do que a noradrenalina (NA, $p= 0.0002^*$), adrenalina (ADR, $p<0.0001^*$) e dopamina (DA, $p<0.0001^*$). Todos os grupos apresentaram $n = 23$ e foram detectados através de LC-MS/MS. Gráficos dispostos nas figuras 17 e 18 e dados na tabela 1.

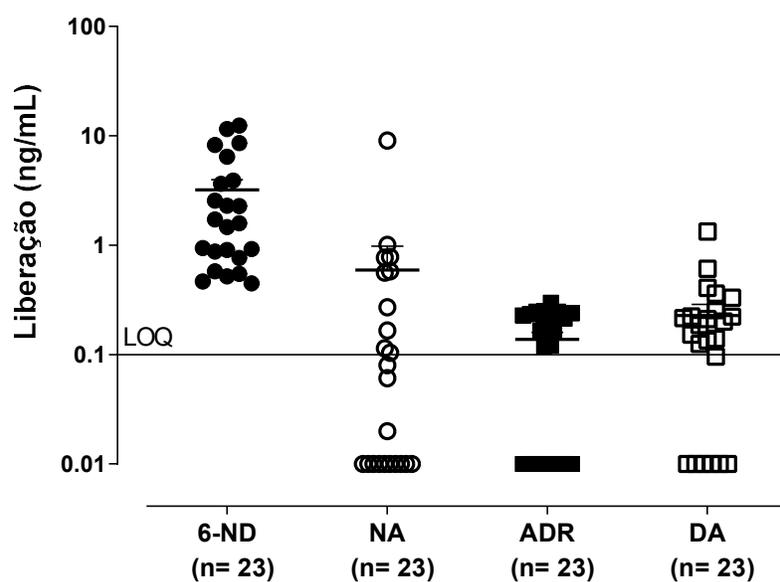


Figura 17 - Liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e dopamina (DA) na vesícula seminal de rato. Cada ponto representa duas vesículas seminais de um único animal e todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1ng/mL).

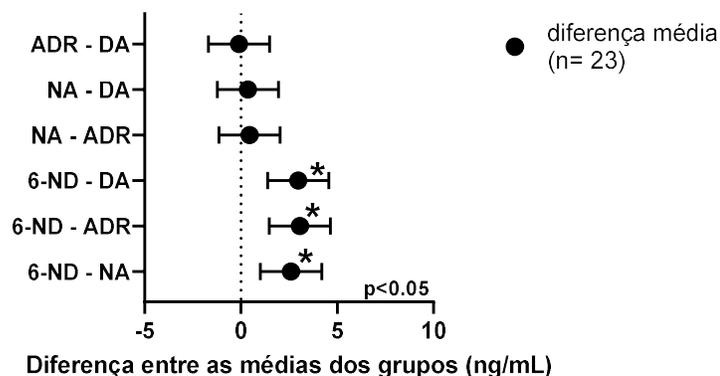


Figura 18 - Gráfico do teste de Tukey para múltiplas comparações entre os valores de liberação basal da 6-nitrodopamina, noradrenalina, adrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato. Intervalo de confiança de 95%. Análise através de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Cada ponto representa a diferença média de sua respectiva comparação. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Valores dispostos na tabela 1.

Tabela 1 - Liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND), noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e dopamina (DA) na vesícula seminal de rato.

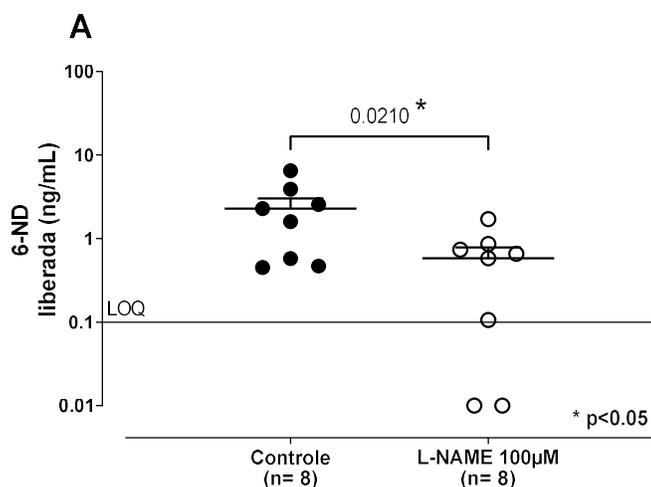
	6-ND (ng/mL)	NA (ng/mL)	ADR (ng/mL)	DA (ng/mL)	p (1)	n
Liberação basal	3.206 ± 0.762	0.594 ± 0.389	0.138 ± 0.022	0.229 ± 0.059	0.0001*	23
Teste de Tukey	Diferença média (ng/mL)		p (2)			
6-ND vs. NA	2.612		0.0002*			
6-ND vs. ADR	3.068		<0.0001*			
6-ND vs. DA	2.976		<0.0001*			
NA vs. ADR	0.4559		0.8757			
NA vs. DA	0.3643		0.9316			

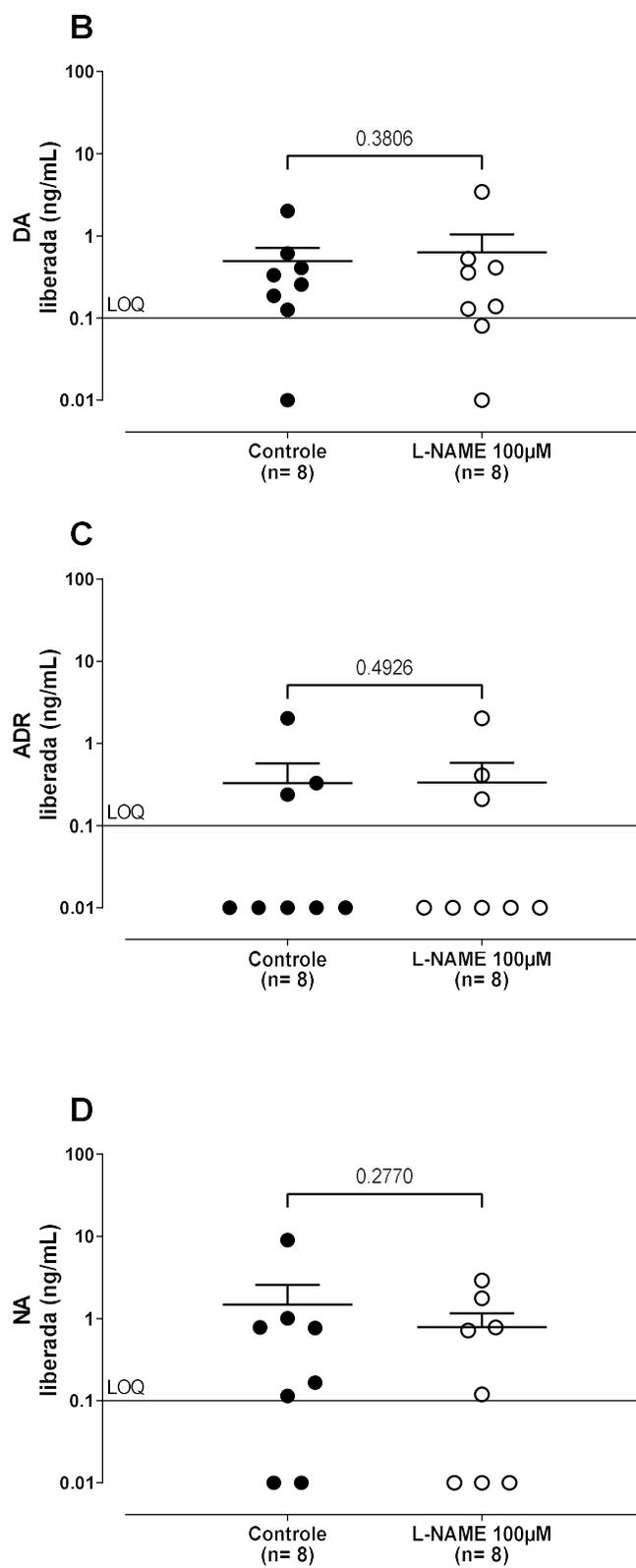
ADR vs. DA	0.09161	0.9988	
-------------------	---------	--------	--

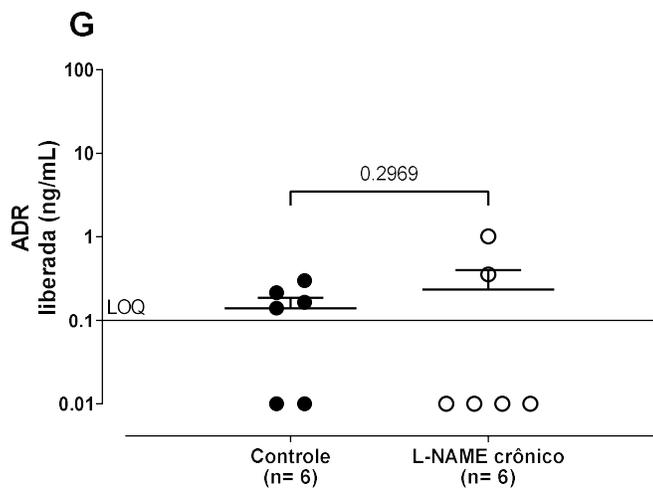
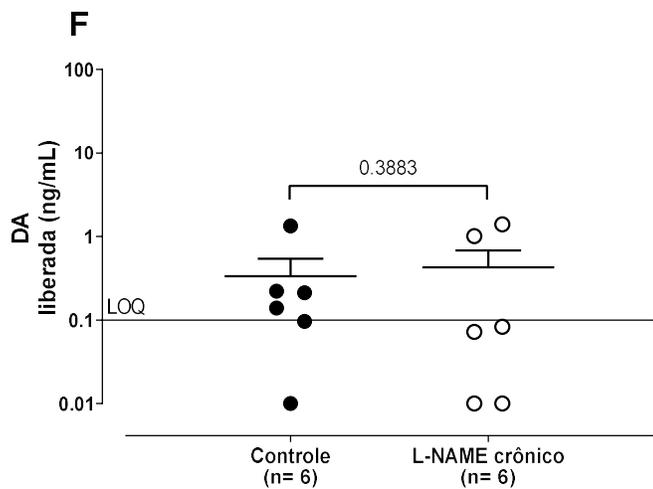
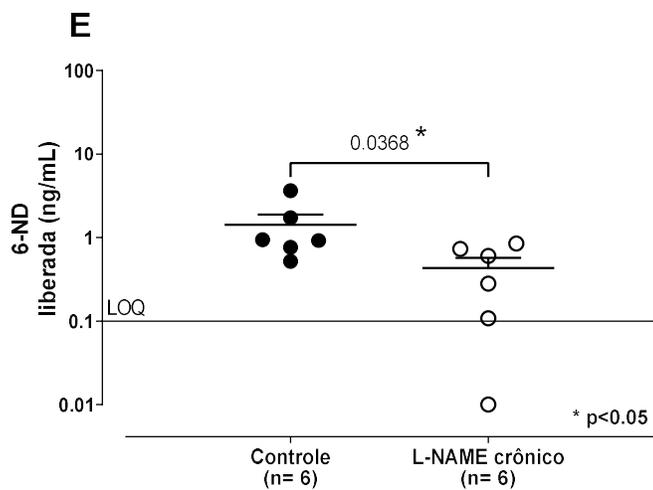
Todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1ng/mL). Análise através de ANOVA de uma via, que gerou o p (1), seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações, que gerou o p (2). $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Nota-se que a 6-nitrodopamina apresenta um alto valor de liberação basal quando comparado aos valores da adrenalina, noradrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato.

4.2. EFEITO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, ADRENALINA E NORADRENALINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO

Pré-incubação da vesícula seminal de rato com o inibidor de óxido nítrico N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 100 µM, 30 minutos) apresentou redução da liberação basal de 6-nitrodopamina (figura 19a, $p=0.0210^*$). Quando o experimento foi realizado com vesículas seminais adquiridas de ratos tratados cronicamente com L-NAME (20mg/kg, quatro semanas), a liberação de 6-nitrodopamina também apresentou redução (figura 19e, $p=0.0368^*$). A pré-incubação da vesícula seminal de rato, seguindo as mesmas condições de experimentação, não apresentou efeito significativo sobre a liberação basal de dopamina (DA, figura 19b, $p=0.3806$), noradrenalina (NA, figura 19d, $p=0.2770$) e adrenalina (ADR, figura 19c, $p=0.4926$). Da mesma maneira e condições de experimentação, as quantidades liberadas de dopamina (DA, figura 19f, $p=0.3883$), noradrenalina (NA, figura 19h, $p=0.3740$) e adrenalina (ADR, figura 19g, $p=0.2969$) não mudaram nas vesículas seminais obtidas de animais cronicamente tratados com L-NAME. Gráficos dispostos na figura 19 e valores na tabela 2.







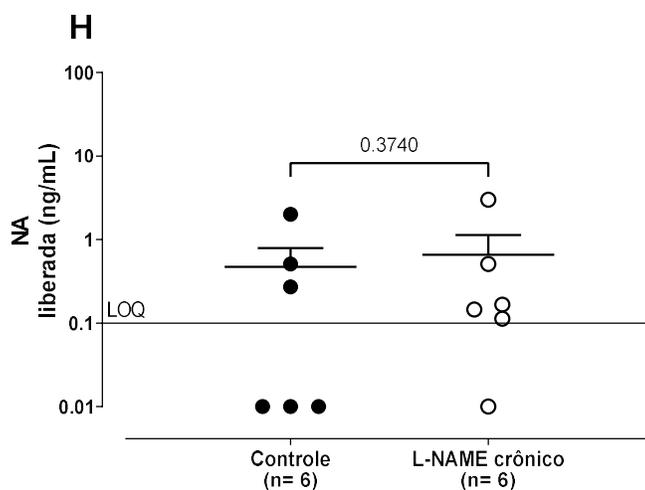
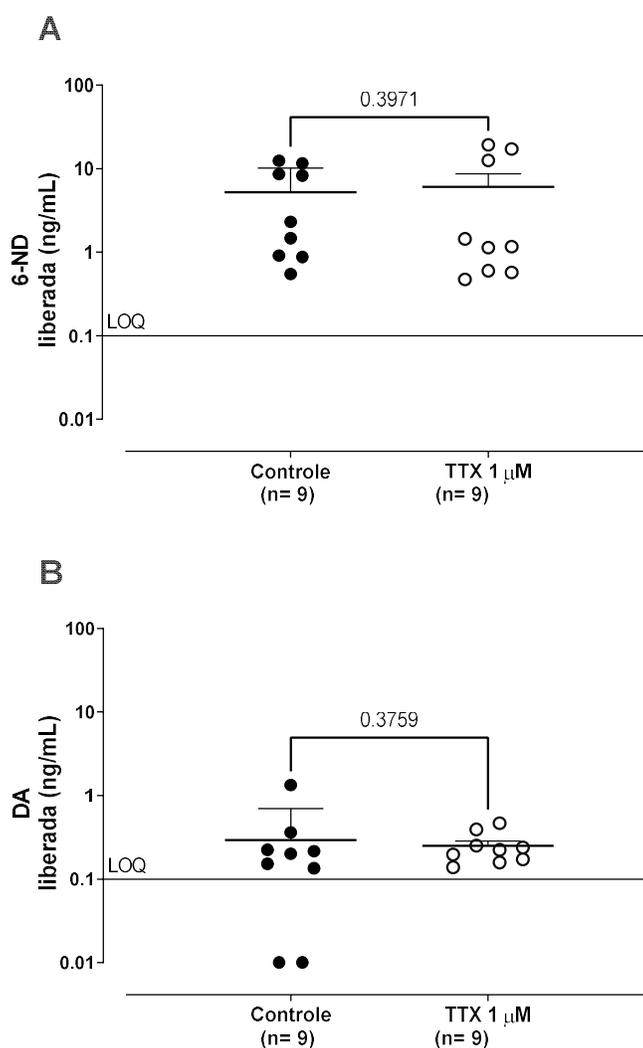


Figura 19 - Inibição da síntese de óxido nítrico reduz a liberação basal de 6-nitrodopamina em vesícula seminal de rato. Figura 19a demonstra a liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND) da vesícula seminal isolada de rato em solução de Krebs-Henseleit's na presença e ausência de L-NAME (100 μ M). Seguindo as mesmas condições, as liberações basais de dopamina (figura 19b), adrenalina (figura 19c) e noradrenalina (figura 19d) são demonstradas. Figura 19e demonstra a liberação basal de 6-nitrodopamina da vesícula seminal de rato obtida de animais controle e animais tratados cronicamente com L-NAME. Seguindo as mesmas condições, as liberações basais de dopamina (figura 19f), adrenalina (figura 19g) e noradrenalina (figura 19h) são demonstradas. Cada ponto representa duas vesículas seminais de um único animal e todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1ng/mL). Análise entre a liberação basal controle e tratado (ou cronicamente tratado) deu-se através de teste T de Student não pareado monocaudal. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

4.3. EFEITO DA TETRODOTOXINA NA LIBERAÇÃO BASAL DA 6-NITRODOPAMINA, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

Pré-incubação da vesícula seminal de rato com tetrodotoxina (TTX 1 μ M, 30 min) não apresentou efeito significativo na liberação basal de 6-nitrodopamina (figura 20a, $p=0.3971$), assim como em dopamina (figura 20b, $p=0.3759$), noradrenalina (figura 20c, $p=0.4939$) e adrenalina (figura 20d, $p=0.0605$). Gráficos dispostos na figura 20 e valores na tabela 2.



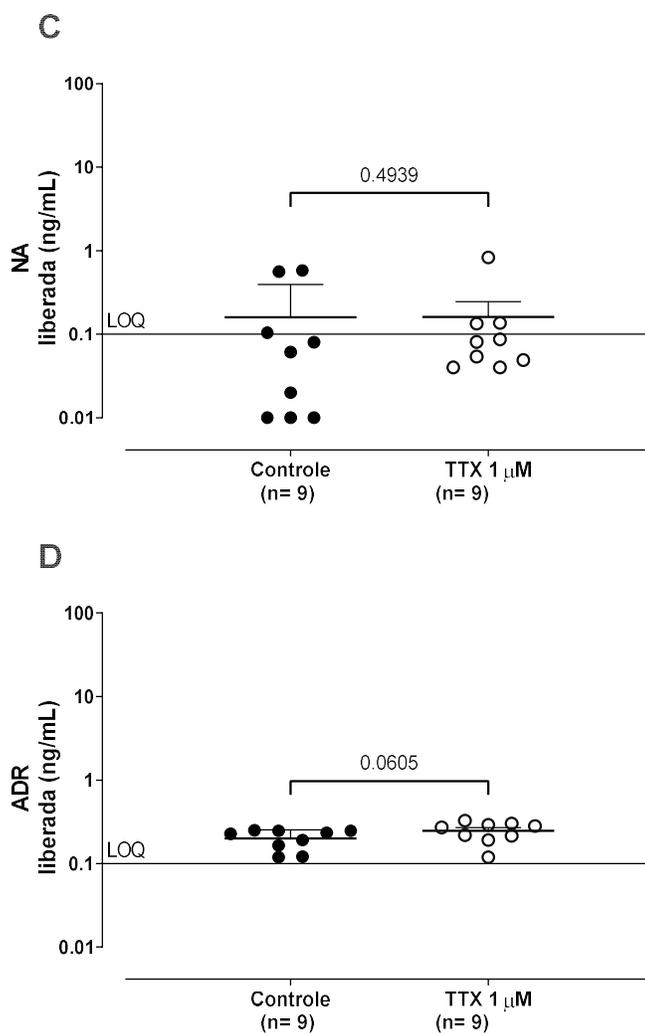
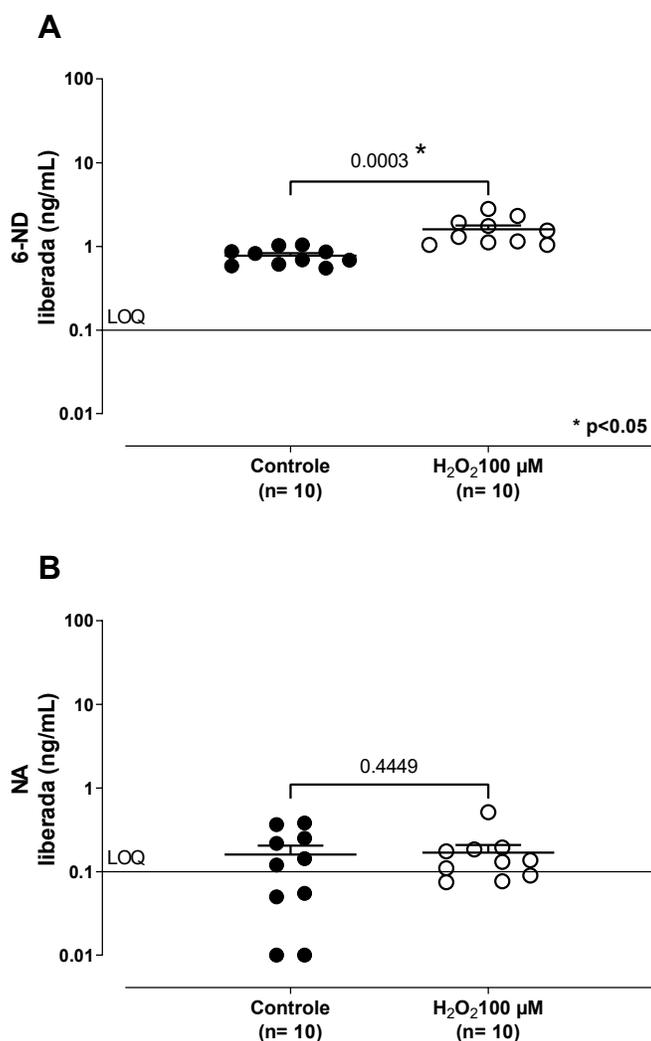


Figura 20 - Efeito da tetrodotoxina na liberação basal de 6-nitrodopamina, dopamina, noradrenalina e adrenalina na vesícula seminal de rato. Fonte: elaborado pelo autor (2024). Figura 20a demonstra a liberação de 6-nitrodopamina (6-ND) em vesícula seminal isolada de rato em solução de Krebs-Henseleit's na presença e ausência de tetrodotoxina (TTX 1 μ M). Seguindo as mesmas condições, as liberações basais de dopamina (figura 20b), noradrenalina (figura 20c) e adrenalina (figura 20d) são demonstradas. Cada ponto representa duas vesículas seminais de um único animal e todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1ng/mL). Análise entre a liberação basal controle e tratado deu-se através de teste T de Student não pareado monocausal. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

4.4. EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, NORADRENALINA E DOPAMINA NA VESÍCULA SEMINAL DE RATOS

Pré-incubação da vesícula seminal de rato com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 100 μ M, 30min) aumentou a liberação basal de 6-nitrodopamina (figura 21a, $p=0.0003^*$) e dopamina (figura 21c, $p=0.0135$), mas não afetou a liberação basal de noradrenalina (figura 21b, $p=0.4449$). Gráficos dispostos na figura 21 e valores na tabela 2.



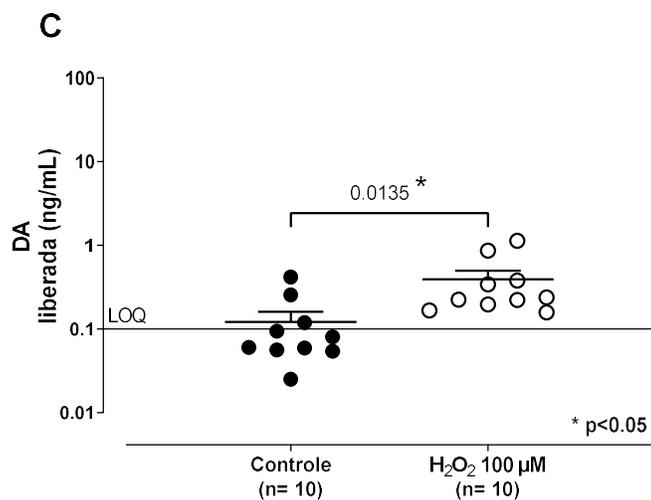
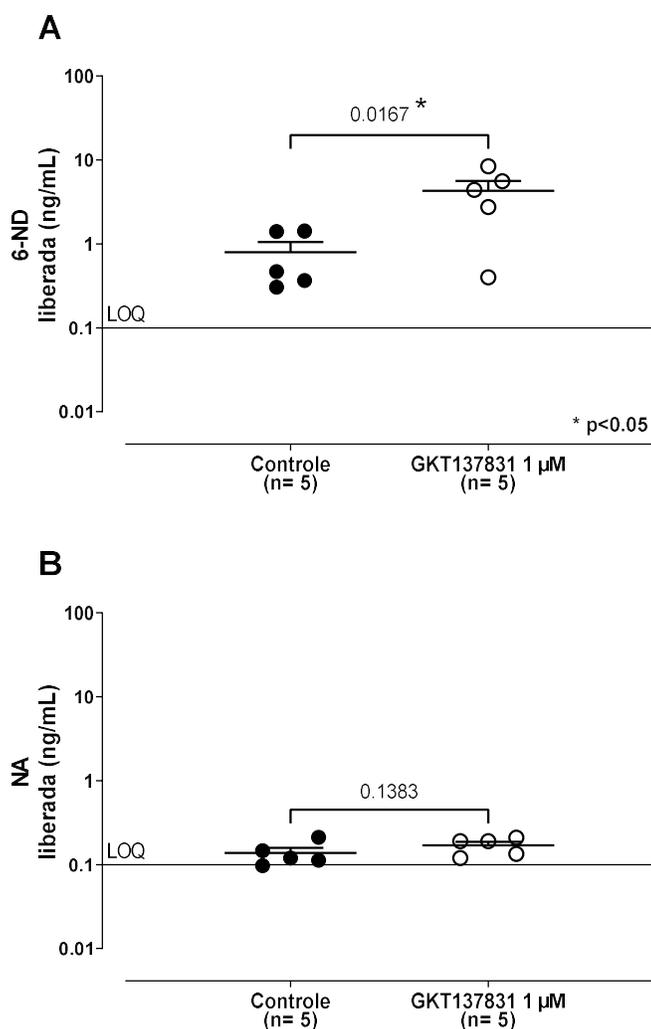


Figura 21 - Efeito do peróxido de hidrogênio na liberação basal de 6-nitrodopamina, noradrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato. Figura 21a demonstra a liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND) na vesícula seminal de rato em solução de Krebs-Henseleit's na presença e ausência de H₂O₂ (100 μM). Seguindo as mesmas condições, as liberações basais de noradrenalina (figura 21b) e dopamina (figura 21c) são demonstradas. Cada ponto representa duas vesículas seminais de um único animal e todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1ng/mL). Análise entre a liberação basal controle e tratado deu-se através de teste T de Student não pareado monocaudal. p<0.05 (*) foi considerado significativo.

4.5. EFEITO DO GKT137831 NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, NORADRENALINA E DOPAMINA NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

Pré-incubação da vesícula seminal de rato com inibidor de NOX1/4 GKT137831 (1 μ M, 30 min) apresentou aumento significativo na liberação basal de 6-nitrodopamina (figura 22a, $p=0.0167^*$), mas não afetou de forma significativa a liberação basal da noradrenalina (figura 22b, $p=0.1383$) e dopamina (figura 22c, $p=0.3552$). Gráficos dispostos na figura 22 e valores na tabela 2.



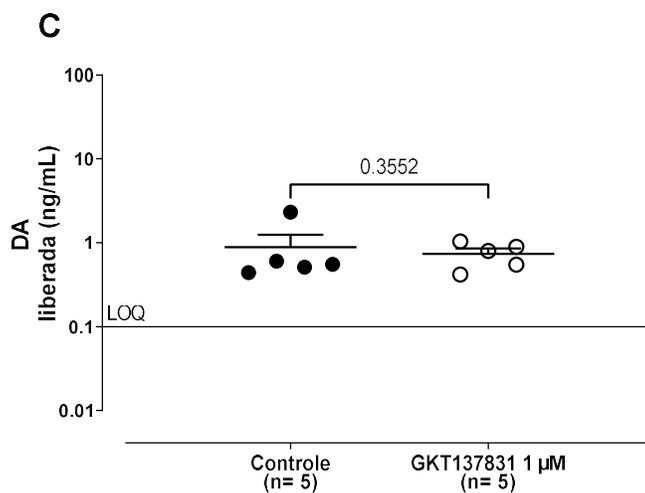
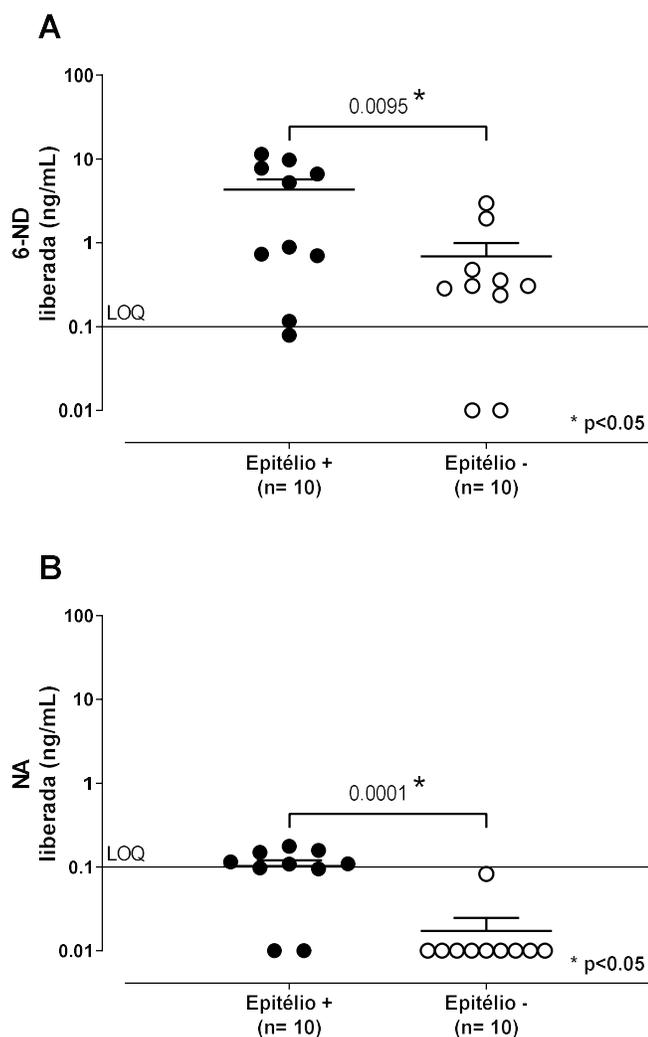


Figura 22 - Efeito do GKT137831 na liberação basal de 6-nitrodopamina, noradrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato. Figura 22a demonstra a liberação basal de 6-nitrodopamina (6-ND) na vesícula seminal isolada de rato em solução de Krebs-Henseleit's na presença e ausência de GKT137831 (1 μ M). Seguindo as mesmas condições, as liberações basais de noradrenalina (figura 22b) e dopamina (figura 22c) são demonstradas. Cada ponto representa duas vesículas seminais de um único animal e todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1 ng/mL). Análise entre a liberação basal controle e tratado deu-se através de teste T de Student não pareado monocaudal. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

4.6. EFEITO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO EPITÉLIO NA LIBERAÇÃO BASAL DE 6-NITRODOPAMINA, NORADRENALINA E DOPAMINA

A remoção do epitélio da vesícula seminal de rato apresentou efeito significativo na liberação basal de 6-nitrodopamina (figura 23a, $p=0.0095^*$), noradrenalina (figura 23b, $p=0.0001^*$) e dopamina (figura 23c, $p=0.0120^*$). Gráficos dispostos na figura 23 e valores na tabela 2.



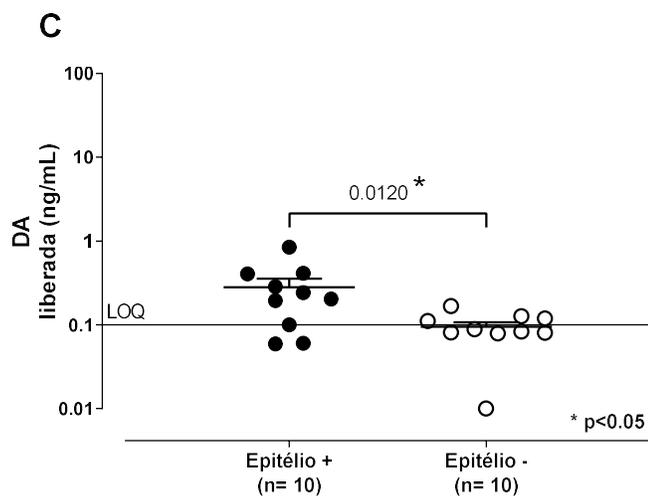


Figura 23 - Efeito da presença e ausência do epitélio na liberação basal de 6-nitrodopamina, noradrenalina e dopamina na vesícula seminal de rato. Figura 23a demonstra a liberação de 6-nitrodopamina (6-ND) em vesícula seminal isolada de rato em solução de Krebs-Henseleit's na presença e ausência do epitélio. Seguindo as mesmas condições, as liberações basais de noradrenalina (figura 23b) e dopamina (figura 23c) são demonstradas. Cada ponto representa duas vesículas seminais de um único animal e todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1ng/mL). Análise entre a liberação basal controle e tratado deu-se através de teste T de Student não pareado monocaudal. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

Tabela 2 - Liberação de 6-nitrodopamina (6-ND), dopamina (DA), noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) em vesícula seminal de rato sob ação de diferentes ferramentas farmacológicas.

	DA (ng/mL)	P	NA (ng/mL)	P	ADR (ng/mL)	P	6-ND (ng/mL)	P	n
Controle	0.493 ± 0.226		1.487 ± 1.087		0.329 ± 0.244		2.288 ± 0.735		8
L-NAME 100 µM	0.636 ± 0.405	0.3806	0.790 ± 0.372	0.2770	0.335 ± 0.245	0.4926	0.583 ± 0.201	0.0210*	8
Controle	0.337 ± 0.203		0.470 ± 0.319		0.140 ± 0.047		1.420 ± 0.474		6
Tratamento crônico L-NAME	0.431 ± 0.250	0.3883	0.659 ± 0.475	0.3740	0.234 ± 0.165	0.2969	0.431 ± 0.142	0.0368*	6
Controle	0.294 ± 0.135		0.159 ± 0.078		0.200 ± 0.018		5.212 ± 1.644		9
TTX 1 µM	0.249 ± 0.037	0.3759	0.161 ± 0.084	0.4939	0.246 ± 0.022	0.0605	6.036 ± 2.635	0.3971	9
Controle	0.122 ± 0.039		0.160 ± 0.044		-		0.773 ± 0.056		10
H₂O₂ 100 µM	0.392 ± 0.105	0.0135*	0.169 ± 0.041	0.4449	-	-	1.597 ± 0.189	0.0003*	10
Controle	0.886 ± 0.358		0.138 ± 0.020		-		0.793 ± 0.254		5
GKT137831 1 µM	0.742 ± 0.113	0.3552	0.169 ± 0.018	0.1383	-	-	4.309 ± 1.346	0.0167*	5
Epitélio +	0.280 ± 0.074		0.103 ± 0.018		-		4.322 ± 1.376		10
Epitélio -	0.095 ± 0.013	0.0120*	0.017 ± 0.007	0.0001*	-	-	0.689 ± 0.307	0.0095*	10
LOQ – Limite de quantificação (0.1ng/mL)									

Todos os experimentos foram quantificados por LC-MS/MS. LOQ – limite de quantificação (0.1ng/mL). Dados expressos como média ± erro padrão da média em ng/mL. Análise entre a liberação basal do controle e o seu respectivo tratamento deu-se através de teste T de Student não

pareado monocaudal. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Nota-se que a liberação de 6-nitrodopamina é influenciada por L-NAME (em tratamento agudo e crônico), H_2O_2 100 μM , GKT137831 1 μM e pela remoção do epitélio, porém a ação da TTX 1 μM não afeta a liberação de forma considerável.

4.7. CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR 6-ND, DOPAMINA, NORADRENALINA E ADRENALINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO

6-Nitrodopamina (10nM a 300 μM), dopamina (10nM a 300 μM), noradrenalina (10nM a 300 μM) e adrenalina (10nM a 300 μM) causaram contrações concentração-dependente na vesícula seminal de rato (figura 24). A pEC₅₀ da 6-nitrodopamina (3.713 ± 0.185) foi menor que a noradrenalina (5.215 ± 0.114 , $p=0.3532$), adrenalina (5.344 ± 0.144 , $p=0.4751$) e dopamina (4.448 ± 0.151 , $p=0.7903$). O E_{MAX} da 6-nitrodopamina (7.911 ± 1.552) não apresentou diferença significativa quando comparado à noradrenalina (9.946 ± 1.305 , $p=0.7133$), adrenalina (8.764 ± 1.570 , $p=0.9671$) e dopamina (10.214 ± 2.044 , $p=0.6350$). Gráficos dispostos nas figuras 24 e 25 e valores na tabela 3. Nas curvas de contração concentração-dependentes induzidas pela 6-nitrodopamina 10nM a 300 μM em vesícula seminal isolada de rato, os dados apontam valores de pEC₅₀ e E_{max} da 6-nitrodopamina menores do que os valores obtidos através das curvas de contração concentração-dependentes da noradrenalina, adrenalina e dopamina, porém os valores p não atingiram significância.

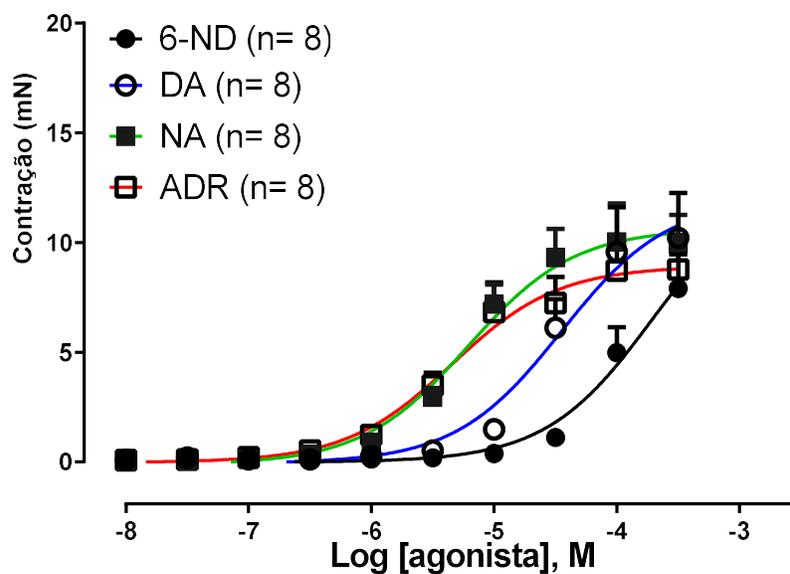


Figura 24 - Curvas de contração concentração-dependentes em vesícula seminal de rato induzidas por 6-nitrodopamina (6-ND 10nM a 300 μ M), dopamina (DA 10nM a 300 μ M), noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M) e adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M). Gráfico das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por 6-nitrodopamina (6-ND 10nM a 300 μ M), dopamina (DA 10nM a 300 μ M), noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M) e adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M) em vesícula seminal de rato. O conjunto de vesículas seminais de cada animal forneceu duas tiras de tecido para experimentação, mas as duas tiras do mesmo conjunto passaram obrigatoriamente por experimentos diferentes. Portanto, duas vesículas seminais do mesmo animal não foram utilizadas para realizar curvas de contração concentração-dependentes do mesmo agonista. Dados expressos como média \pm erro padrão da média de contração (mN) induzida por cada dose de agonista e curvas traçadas através de análises de regressão não linear. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Valores dispostos na tabela 3.

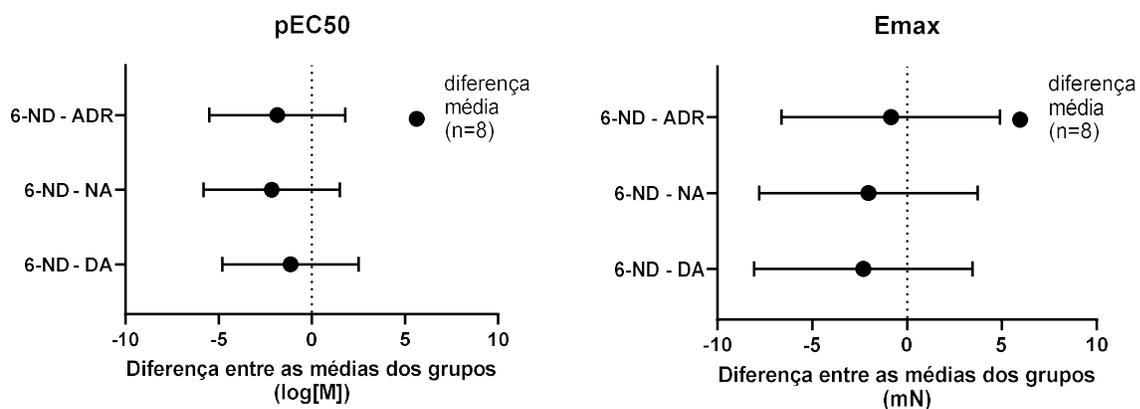


Figura 25 - Gráfico do teste de múltiplas comparações de Dunnett entre os valores da pEC50 e Emax obtidos através das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por 6-nitrodopamina (6-ND 10nM a 300 μ M), noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M), adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M) e dopamina (DA 10nM a 300 μ M). Análise através de ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett. Cada ponto representa a diferença média de sua respectiva comparação. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Valores dispostos na tabela 1.

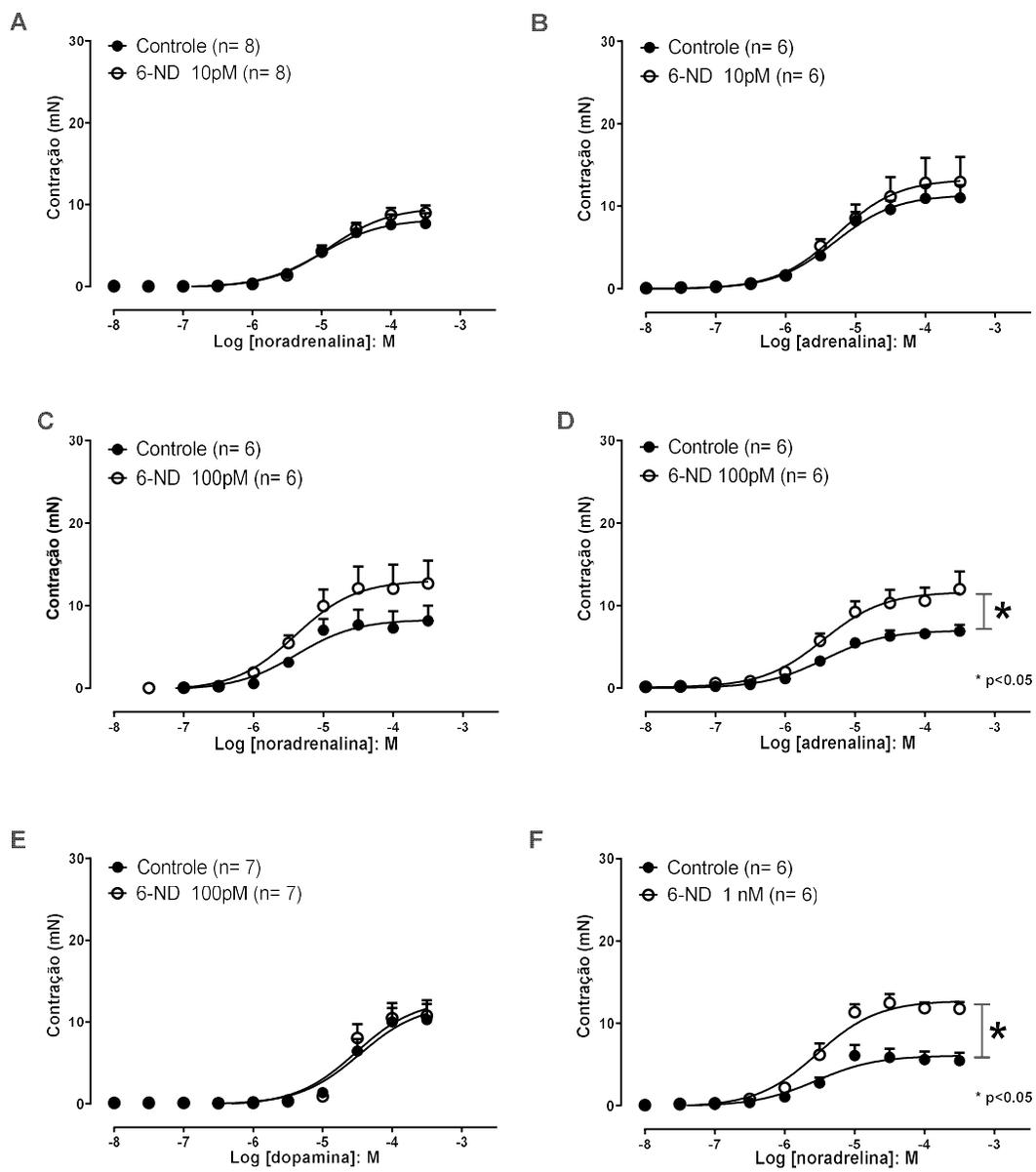
Tabela 3 - pEC50 e EMAX das contrações induzidas pela 6-nitrodopamina (6-ND 10nM a 300µM), noradrenalina (NA 10nM a 300 µM), adrenalina (ADR 10nM a 300 µM) e dopamina (DA 10nM a 300 µM) em vesícula seminal de rato.

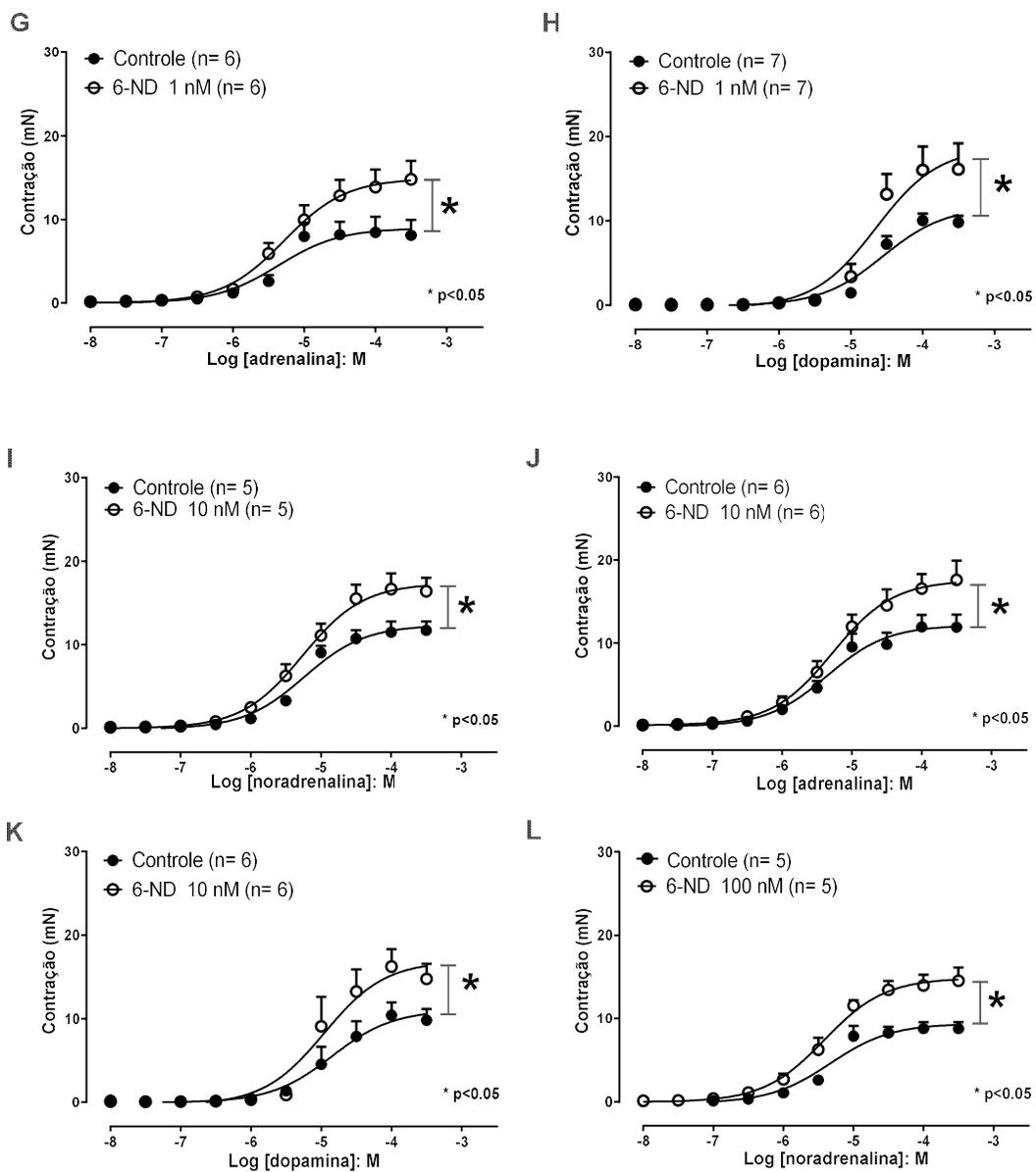
6-nitrodopamina 300µM						
	6-ND	NA	ADR	DA	p (1)	n
pEC50 (log[M])	3.713 ± 0.185	5.215 ± 0.114	5.344 ± 0.144	4.448 ± 0.151	0.4960	8
Emax (mN)	7.911 ± 1.552	9.946 ± 1.305	8.764 ± 1.570	10.214 ± 2.044	0.7359	8
pEC50			Emax			
Teste de Dunnet	Diferença de média (log[M])	p (2)		Teste de Dunnet	Diferença de média (mN)	p (3)
6-ND vs. DA	1.138	0.7903		6-ND vs. DA	2.303	0.6350
6-ND vs. NA	2.152	0.3532		6-ND vs. NA	2.034	0.7133
6-ND vs. ADR	1.844	0.4751		6-ND vs. ADR	0.853	0.9671

pEC50 foi determinada através da análise de regressão não linear da EC50. Emax (mN) é o efeito máximo produzido pela droga na maior dose administrada. N representa o número de animais utilizados no estudo, sendo que cada animal contribuiu com um conjunto de vesículas seminais de duas tiras de tecido para experimentação. Como regra, duas tiras do mesmo par foram utilizadas para curvas de contração concentração-dependentes de diferentes ferramentas farmacológicas. Análise através de ANOVA de uma via, que gerou o p (1), seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, que gerou o p (2) para os dados da pEC50 e o p (3) para os dados da Emax. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

4.8. EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DA 6-NITRODOPAMINA NAS CONTRAÇÕES CONCENTRAÇÃO-DEPENDENTES INDUZIDAS POR NORADRENALINA, ADRENALINA E DOPAMINA EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO

Pré-incubação da vesícula seminal de rato com 6-nitrodopamina (10pM, 30 min) não apresentou efeito significativo sobre a pEC₅₀ e E_{max} das contrações concentração-dependentes induzidas pela noradrenalina (figura 26a, p=0.4298 e p=0.2088, respectivamente) ou adrenalina (figura 26b, p=3907 e p=0.2891, respectivamente). Elevando a concentração da pré-incubação da 6-nitrodopamina (100pM, 30 min) neste mesmo tecido, os dados demonstraram um efeito não significativo na pEC₅₀ e E_{max} das contrações induzidas pela noradrenalina (figura 26c, p=0.1914 e p=0.1028, respectivamente) e dopamina (figura 26e, p=0.04694 e p=0.4319, respectivamente), enquanto na adrenalina não houve um aumento significativo da pEC₅₀, porém houve no E_{max} (figura 26d, p=0.1888 e p=0.0248*, respectivamente). A pré-incubação com 6-nitrodopamina (1nM, 30 min) apresentou efeito não significativo sobre a pEC₅₀, porém significativo sobre o E_{max} das contrações induzidas pela noradrenalina (figura 26f, p=0.0881 e p=0.0002*, respectivamente), adrenalina (figura 26g, p=0.1840 e p=0.0215*, respectivamente) e dopamina (figura 26h, p=0.2382 e p=0.0355*, respectivamente) na vesícula seminal de rato. As pré-incubações com 6-nitrodopamina (10nM e 100nM, 30 min) também não apresentaram efeitos significativos sobre a pEC₅₀, porém significativos sobre o E_{max} das contrações induzidas por noradrenalina (figura 26i, p=0.2415 e p=0.0206*, respectivamente; e figura 26l, 0.1565 e p=0.0058*, respectivamente), adrenalina (figura 26j, p=0.2448 e p=0.0324*, respectivamente; e figura 26m, p=0.0112*) e dopamina (figura 26k, p=0.2361 e p=0.0264*, respectivamente; e figura 26n, p=0.2907 e p=0.0317*, respectivamente), mas não apresentaram efeitos maiores do que a concentração anterior de 6-nitrodopamina (1nM, 30 min). Gráficos dispostos na figura 26 e os valores pEC₅₀, E_{MAX}, N e p na tabela 4.





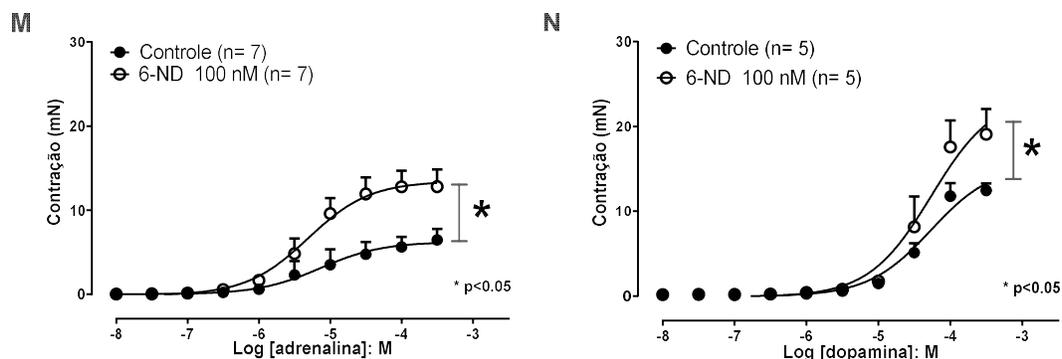


Figura 26 - Efeito da 6-nitrodopamina (6-ND 10pM, 100pM, 1nM, 10nM e 100nM) nas contrações concentração-dependentes induzidas por noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M), adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M) e dopamina (DA 10nM a 300 μ M) na vesícula seminal de rato. Gráficos das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por ferramenta farmacológica, comparando o controle com o respectivo tratamento em vesícula seminal de rato. Noradrenalina (NA 10nM a 300 μ M) com pré-incubação (30 min) de 6-nitrodopamina (6-ND) nas concentrações de 10pM (figura 26a), 100pM (figura 26c), 1nM (figura 26f), 10nM (figura 26i) e 100nM (figura 26l). Adrenalina (ADR 10nM a 300 μ M) com pré-incubação (30 min) de 6-nitrodopamina (6-ND) nas concentrações de 10pM (figura 26b), 100pM (figura 26d), 1nM (figura 26g), 10nM (figura 26j) e 100nM (figura 26m). Dopamina (DA 10nM a 300 μ M) com pré-incubação (30 min) de 6-nitrodopamina (6-ND) nas concentrações de 100pM (figura 26e), 1nM (figura 26h), 10nM (figura 26k) e 100nM (figura 26n). O conjunto de vesículas seminais de cada animal forneceu duas tiras de tecido para experimentação, sendo utilizadas uma para controle e outra para o respectivo tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média de contração (mN) induzida por cada dose de agonista e curvas traçadas através de análises de regressão não linear. p<0.05 (*) foi considerado significativo. Valores dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) das curvas concentração-dependentes induzidas por noradrenalina, adrenalina e dopamina em vesícula seminal de rato na presença de 6-nitrodopamina (10pM, 100pM, 1nM, 10nM e 100nM)

Noradrenalina	pEC50 (log[M])	p (1)	EMAX (mN)	p (2)	n
Controle	5.002 ± 0.129		7.680 ± 1.300		8
6-ND 10pM	4.883 ± 0.083	0.4298	9.007 ± 0.912	0.2088	8
Controle	5.388 ± 0.1859		8.158 ± 1.855		6
6-ND 100pM	5.401 ± 0.1715	0.1914	12.684 ± 2.780	0.1028	6
Controle	5.557 ± 0.1623		5.449 ± 0.966		6
6-ND 1nM	5.535 ± 0.082	0.0881	11.765 ± 0.779	0.0002*	6
Controle	5.240 ± 0.082		11.706 ± 1.069		5
6-ND 10nM	5.263 ± 0.090	0.2415	16.417 ± 1.619	0.0206*	5
Controle	5.330 ± 0.092		8.787 ± 0.773		5
6-ND 100nM	5.417 ± 0.083	0.1565	14.538 ± 1.586	0.0058*	5
Adrenalina					
Adrenalina	pEC50 (log[M])	p (1)	EMAX (mN)	p (2)	n
Controle	5.295 ± 0.1045		11.010 ± 1.536		6
6-ND 10pM	5.262 ± 0.1707	0.3907	12.951 ± 3.007	0.2891	6
Controle	5.440 ± 0.087		6.890 ± 0.785		6
6-ND 100pM	5.453 ± 0.130	0.1888	11.987 ± 2.143	0.0248*	6
Controle	5.365 ± 0.177		8.100 ± 1.846		6
6-ND 1nM	5.282 ± 0.123	0.1840	14.787 ± 2.217	0.0215*	6
Controle	5.357 ± 0.111		11.920 ± 1.492		6
6-ND 10nM	5.277 ± 0.102	0.2448	17.618 ± 2.307	0.0324*	6
Controle	5.136 ± 0.244		6.464 ± 1.305		7
6-ND 100nM	5.310 ± 0.139	0.0793	12.814 ± 2.045	0.0112*	7
Dopamina					
Dopamina	pEC50	p (1)	EMAX (mN)	p (2)	n

	<i>(log[M])</i>				
Controle	4.467 ± 0.1664		10.283 ± 2.359		7
6-ND 100pM	4.521 ± 0.117	0.4694	10.765 ± 1.406	0.4319	7
Controle	4.555 ± 0.086		9.810 ± 0.807		7
6-ND 1nM	4.650 ± 0.142	0.2382	16.109 ± 3.076	0.0355*	7
Controle	4.848 ± 0.151		9.802 ± 1.352		6
6-ND 10nM	4.957 ± 0.145	0.2361	14.755 ± 1.806	0.0264*	6
Controle	4.272 ± 0.091		12.460 ± 0.823		5
6-ND 100nM	4.265 ± 0.149	0.2907	19.082 ± 2.964	0.0317*	5

pEC₅₀ foi determinada através da análise de regressão não linear da EC₅₀. E_{MAX} (mN) é o efeito máximo produzido pela droga na maior dose administrada. N representa o número de animais utilizados no estudo, sendo que cada animal contribuiu com um conjunto de vesículas seminais de duas tiras de tecido para experimentação. Uma tira foi utilizada para controle e a outra para a respectiva pré-incubação. Análise entre as contrações controle e a respectiva pré-incubação deu-se através do teste T de Student não pareado monocaudal que, a partir dos dados pEC₅₀ (log[M]) gerou o p (1) e, a partir dos dados E_{max}(mN), gerou o p (2). p<0.05 (*) foi considerado significativo.

4.9. EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE NORADRENALINA, ADRENALINA E DOPAMINA NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO

Pré-incubação da vesícula seminal de rato com noradrenalina (10nM, 30 min) não apresentou efeito significativo sobre a pEC₅₀ e o E_{max} das contrações concentração-dependentes induzidas por dopamina (figura 27a, p=0.4694 e p=0.3943, respectivamente) ou adrenalina (figura 27b, p=0.3973 e p=0.2886, respectivamente).

Pré-incubação da vesícula seminal de rato com adrenalina (10nM, 30 min) não apresentou efeito significativo sobre a pEC₅₀ e o E_{max} das contrações concentração-dependentes induzidas por noradrenalina (figura 27c, p=0.4407 e p=0.2993, respectivamente) ou dopamina (figura 27d, p=0.4796 e p=0.4509, respectivamente). Já a pré-incubação com dopamina (10nM, 30 min) não apresentou efeito significativo sobre a pEC₅₀, porém significativo sobre o E_{max} das contrações induzidas por noradrenalina (figura 27e, p=0.3697 e p=0.0496*, respectivamente) e adrenalina (figura 27f, p=0.1851 e p=0.0149*, respectivamente) em vesícula seminal de rato. Gráficos dispostos na figura 27 e os valores pEC₅₀, E_{MAX}, N e p na tabela 5.

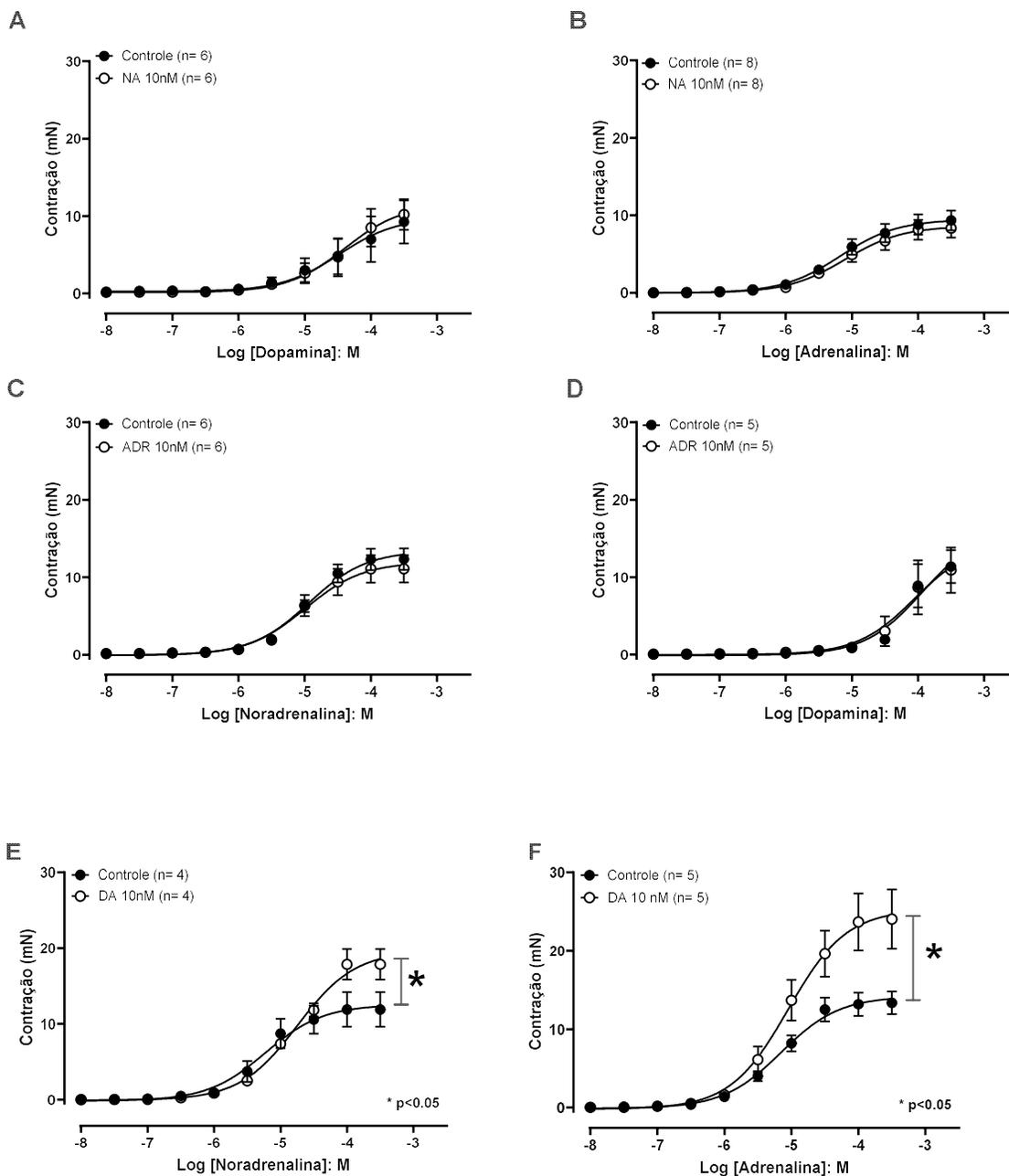


Figura 27 - Efeito da pré-incubação de noradrenalina(10nM), adrenalina(10nM) e dopamina(10nM) nas contrações concentração-dependentes induzidas em vesícula seminal de rato. Gráficos das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por ferramentas farmacológicas, comparando o controle com o respectivo tratamento em vesícula seminal de rato. Contração induzida por dopamina (10nM a 300 μ M) com pré-incubação (30 min) de noradrenalina (10nM, figura 27a) e adrenalina (10nM, figura 27d). Contração induzida

por adrenalina (10nM a 300 μ M) com pré-tratamento (30 min) de noradrenalina (10nM, figura 27b) e dopamina (10nM, figura 27f). Contração induzida por noradrenalina (10nM a 300 μ M) com pré-tratamento (30 min) de adrenalina (10nM, figura 27c) e dopamina (10nM, figura 27e). O conjunto de vesículas seminais de cada animal forneceu duas tiras de tecido para experimentação, sendo utilizadas uma para controle e outra para o respectivo tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média de contração (mN) induzida por cada dose de agonista e curvas traçadas através de análises de regressão não linear. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Valores dispostos na tabela 5.

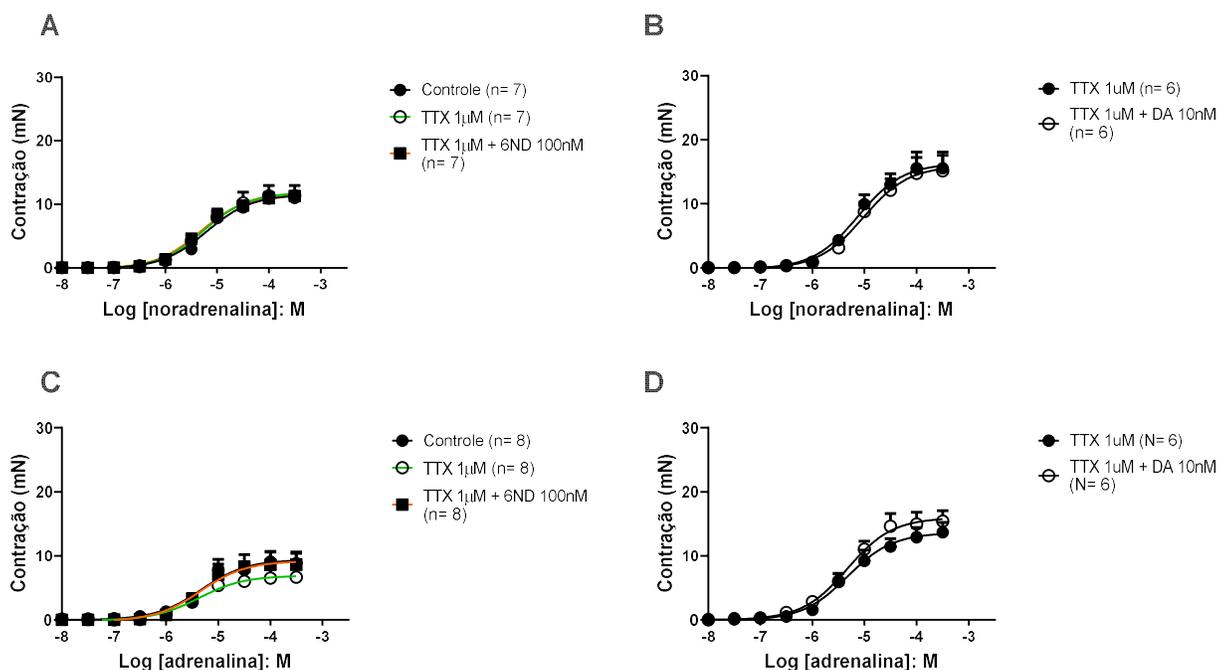
Tabela 5 - A potência (pEC50) e a resposta máxima (EMAX) das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por dopamina, noradrenalina e adrenalina em vesícula seminal de rato na presença de dopamina(10nM), noradrenalina(10nM) e adrenalina(10nM).

Dopamina 10nM a 300µM	pEC50 (log[M])	p (1)	EMAX (mN)	p (2)	n
Controle	4.482 ± 0.2860		9.275 ± 2.777		6
NA 10nM	4.392 ± 0.2063	0.4694	10.215 ± 1.985	0.3943	6
Controle	3.938 ± 0.1892		11.384 ± 2.120		5
ADR 10nM	4.052 ± 0.2528	0.4796	10.923 ± 2.932	0.4509	5
Noradrenalina 10nM a 300µM					
Noradrenalina 10nM a 300µM	pEC50 (log[M])	p (1)	EMAX (mN)	p (2)	n
Controle	4.938 ± 0.086		12.353 ± 1.402		6
ADR 10nM	4.992 ± 0.1293	0.4407	11.121 ± 1.781	0.2993	6
Controle	5.228 ± 0.1484		11.902 ± 2.285		4
DA 10nM	4.747 ± 0.076	0.3697	17.856 ± 2.029	0.0496*	4
Adrenalina 10nM a 300µM					
Adrenalina 10nM a 300µM	pEC50 (log[M])	p (1)	EMAX (mN)	p (2)	n
Controle	5.178 ± 0.1187		9.359 ± 1.279		8
NA 10nM	5.106 ± 0.1275	0.3973	8.346 ± 1.231	0.2886	8
Controle	5.153 ± 0.0888		13.376 ± 1.457		5
DA 10nM	5.047 ± 0.1180	0.1851	24.061 ± 3.779	0.0149*	5

pEC_{50} foi determinada através da análise de regressão não linear da EC_{50} . E_{MAX} (mN) é o efeito máximo produzido pela droga na maior dose administrada. N representa o número de animais utilizados no estudo, sendo que cada animal contribuiu com um conjunto de vesículas seminais de duas tiras de tecido para experimentação. Uma tira foi utilizada para controle e a outra para a respectiva pré-incubação. Análise entre as contrações controle e a respectiva pré-incubação deu-se através do teste T de Student não pareado monocaudal que, a partir dos dados pEC_{50} ($\log[M]$) gerou o p (1) e, a partir dos dados $E_{max}(mN)$, gerou o p (2). $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

4.10. EFEITO DA TETRODOTOXINA NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS EM VESÍCULA SEMINAL DE RATO

Pré-incubação do bloqueador de canal de sódio voltagem-dependente tetrodotoxina (TTX 1 μ M, 30 min) isolado ou associado com 6-nitrodopamina (TTX 1 μ M + 6-nitrodopamina 100nM, 30 min) em vesícula seminal de rato não apresentou efeito significativo sobre a pEC₅₀ o E_{max} das contrações induzidas por noradrenalina (figura 28a, p=0.9932 e p=0.9716, respectivamente), adrenalina (figura 28c, p=0.8249 e p=0.6082, respectivamente) e dopamina (figura 28e, p=0.9125 e p=0.2301, respectivamente). A pré-incubação simultânea (30 min) de TTX (1 μ M) e dopamina (DA 10nM) não apresentou efeito significativo sobre a pEC₅₀ e o E_{max} das contrações concentração-dependentes induzidas por noradrenalina (figura 28b, p=0.4449 e 0.4554, respectivamente) e adrenalina (figura 28d, p=0.3629 e p=0.2262, respectivamente) em vesícula seminal de rato. Gráficos dispostos na figura 28 e os valores pEC₅₀, E_{MAX}, N e p na tabela 6.



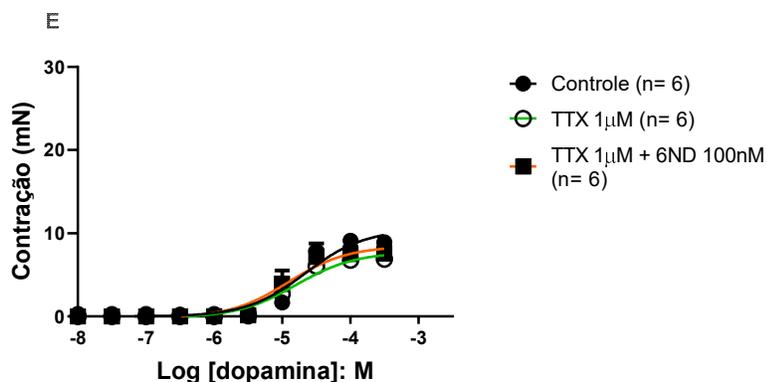


Figura 28 - Efeito da tetrodotoxina nas contrações concentração-dependentes induzidas por noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e dopamina (DA) em vesícula seminal de rato. Gráficos das curvas de contração concentração-dependentes induzidas por ferramentas farmacológicas, comparando o controle com o respectivo tratamento em vesícula seminal de rato. Contração induzida por Noradrenalina (10nM a 300µM) com pré-incubação (30 min) de tetrodotoxina (TTX 1µM, figura 28a), TTX associado à 6-nitrodopamina (1µM e 100nM, respectivamente, figura 28a) e TTX associado à dopamina (1µM e 10nM, respectivamente, 30 min, figura 28b). Contração induzida por adrenalina (10nM a 300µM) com pré-incubação (30 min) de TTX (1µM, figura 28c), TTX associado à 6-nitrodopamina (1µM e 100nM, respectivamente, figura 28c) e TTX associado à dopamina (1µM e 10nM, respectivamente, figura 28d). Contração induzida por dopamina (10nM a 300µM) com pré-incubação (30 min) de TTX (1µM) e TTX associado à 6-nitrodopamina (1µM e 100nM, respectivamente, figura 28e). O conjunto de vesículas seminais de cada animal forneceu duas tiras de tecido para experimentação, sendo utilizadas uma para controle (nos experimentos das figuras 28b e 28d, TTX 1µM ao invés de controle) e outra para o respectivo tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média de contração (mN) induzida por cada dose de agonista e curvas traçadas através de análises de regressão não linear. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Valores dispostos na tabela 6.

Tabela 6 - A potência (pEC50) e a resposta máxima (EMAX) das curvas concentração-dependentes da noradrenalina e adrenalina em vesícula seminal de rato na presença da tetrodotoxina e associações.

Noradrenalina (10nM a 300µM)						
	controle	TTX 1 µM	TTX 1µM + 6ND 100nM	TTX 1µM + DA 10nM	p	n
pEC50 (log[M])	5.207 ± 0.080	5.266 ± 0.1170	5.328 ± 0.069	-	0.9932	7
Emax (mN)	11.002 ± 0.866	11.349 ± 1.632	11.339 ± 0.801	-	0.9716	7
pEC50 (log[M])	-	5.121 ± 0.1170	-	5.020 ± 0.1200	0.4449	6
Emax (mN)	-	15.534 ± 2.523	-	15.127 ± 2.481	0.4554	6
Adrenalina (10nM a 300µM)						
pEC50 (log[M])	5.329 ± 0.1470	5.374 ± 0.1867	5.341 ± 0.1811	-	0.8249	8
Emax (mN)	8.829 ± 1.588	6.670 ± 1.404	8.630 ± 1.973	-	0.6082	8
pEC50 (log[M])	-	5.330 ± 0.1013	-	5.330 ± 0.1006	0.3629	6
Emax (mN)	-	13.693 ± 1.544	-	15.432 ± 1.544	0.2262	6
Dopamina (10nM a 300µM)						
pEC50 (log[M])	4.657 ± 0.0892	4.800 ± 0.1333	4.911 ± 0.1306	-	0.9125	6
Emax (mN)	8.904 ± 0.558	6.878 ± 0.884	7.579 ±	-	0.2301	6

			0.929			
--	--	--	-------	--	--	--

pEC₅₀ foi determinada através da análise de regressão não linear da EC₅₀. E_{MAX} (mN) é o efeito máximo produzido pela droga na maior dose administrada. N representa o número de animais utilizados no estudo, sendo que cada animal contribuiu com um conjunto de vesículas seminais de duas tiras de tecido para experimentação. Uma tira foi utilizada para controle (nos experimentos das figuras 26b e 26d, TTX 1µM ao invés de controle) e a outra para a respectiva pré-incubação. Análise entre as contrações controle e a respectiva pré-incubação deu-se através do teste T de Student não pareado monocaudal que gerou os respectivos valores p a partir dos dados pEC₅₀ (log[M]) e dados E_{max}(mN). p<0.05 (*) foi considerado significativo.

4.11. EFEITO DO L-NAME NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

Pré-incubação do inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME (100µM, 30 min) em vesícula seminal de rato não apresentou efeito significativo sobre o E_{max} das contrações induzidas por estímulo elétrico (60v, 0.1ms) em 4Hz (p=0.0705), porém significativo em 8, 16 e 32Hz (p=0.0305*, 0.0032* e 0.0005*, respectivamente). Visto que a ferramenta farmacológica pré-incubada afeta a ação da enzima óxido nítrico sintase, esse resultado demonstrou a importância da biodisponibilidade de óxido nítrico nas contrações deste tecido. Gráfico disposto na figura 29 e os valores E_{MAX}, N e p na tabela 7.

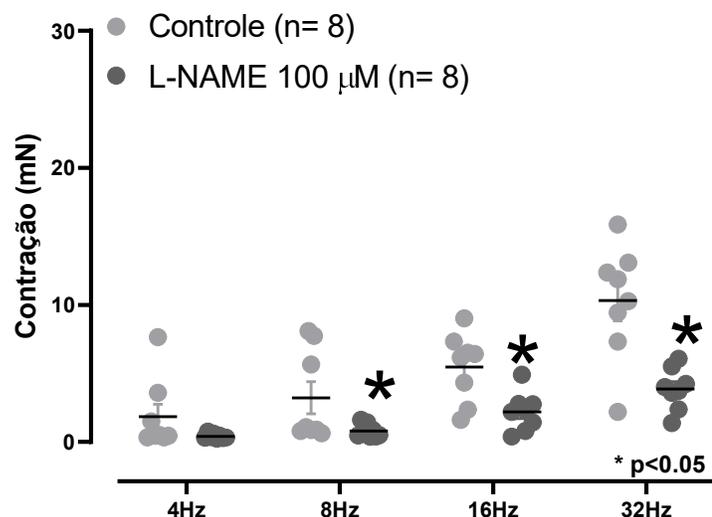


Figura 29 - Efeito do L-NAME nas contrações frequência-dependentes induzidas por estímulo elétrico na vesícula seminal de rato. Gráfico das contrações frequência-dependentes induzidas por estímulo elétrico (60v, 0.1ms) em 4, 8, 16 e 32Hz, comparando o controle com a pré-incubação de L-NAME 100µM em vesícula seminal de rato. O conjunto de vesículas seminais de cada animal forneceu duas tiras de tecido para experimentação, sendo utilizadas uma para controle e outra a pré-incubação. Dados expressos como média \pm erro padrão da média de contração (mN) induzida por cada frequência aplicada. Análise através do teste T de Student não pareado monocaudal entre o controle e tratado de cada frequência. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo. Valores dispostos na tabela 8.

Tabela 7 - A resposta máxima (EMAX) das curvas de contração induzidas por estímulo elétrico em vesícula seminal de rato na presença e ausência de L-NAME.

Estímulo elétrico (60v)	E_{MAX} (mN)	p	n
4Hz			
Controle	1.848 \pm 0.917		8
L-NAME 100µM	0.414 \pm 0.063	0.0705	8
8Hz			
Controle	3.216 \pm 1.180		8
L-NAME 100µM	0.788 \pm 0.169	0.0305*	8
16Hz			

Controle	5.466 ± 0.891		8
L-NAME 100µM	2.197 ± 0.495	0.0032*	8
32Hz			
Controle	10.302 ± 1.472		8
L-NAME 100µM	3.864 ± 0.537	0.0005*	8

E_{MAX} (mN) é o efeito máximo de contração produzido pelo estímulo elétrico em sua respectiva frequência (Hz). N representa o número de animais utilizados no estudo, sendo que cada animal contribuiu com um conjunto de vesículas seminais de duas tiras de tecido para experimentação. Uma tira foi utilizada para controle e a outra para a pré-incubação do L-NAME 100µM. Dados expressos como média ± erro padrão da média de contração (mN) induzida por cada frequência aplicada. Análise através do teste T de Student não pareado monocaudal entre o controle e tratado de cada frequência. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

4.12. EFEITO DO EPITÉLIO NAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR ESTÍMULO ELÉTRICO NA VESÍCULA SEMINAL DE RATO

O epitélio colunar simples reveste a vesícula seminal e as células glandulares presentes nesse epitélio são responsáveis por secretar substâncias importantes para os espermatozoides, como frutose, citrato e prostaglandinas. A remoção do epitélio na vesícula seminal de rato não apresentou efeito significativo sobre o E_{max} das contrações induzidas por estímulo elétrico (60v, 0.1ms) em 4 e 8Hz ($p=0.1350$ e $p=0.0948$, respectivamente), porém significativa em 16 e 32Hz ($p=0.0148^*$ e $p=0.0051^*$, respectivamente), demonstrando a importância dessa camada celular nas contrações deste tecido. Gráfico disposto na figura 30 e os valores E_{MAX} , N e p na tabela 8.

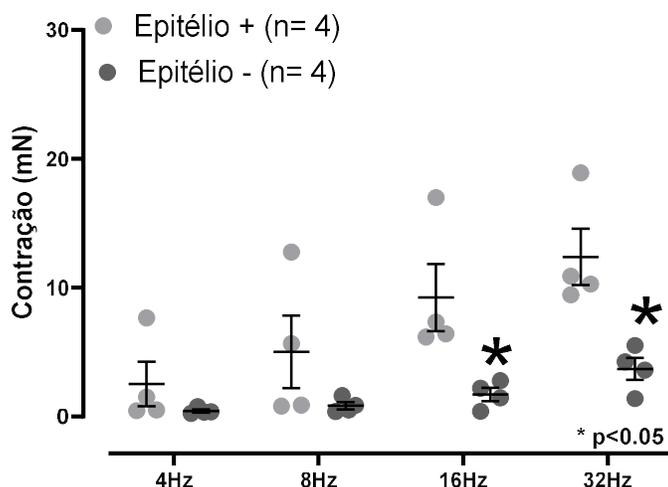


Figura 30 - Efeito do epitélio nas contrações induzidas por estímulo elétrico na vesícula seminal de rato. Gráfico das contrações frequência-dependentes induzidas por estímulo elétrico (60v, 0.1ms) em 4, 8, 16 e 32Hz, comparando o controle (epitélio positivo) com o tratado (epitélio negativo) em vesícula seminal de rato. O conjunto de vesículas seminais de cada animal forneceu duas tiras de tecido para experimentação, sendo utilizadas uma para controle e outra a remoção do epitélio. Dados expressos como média \pm erro padrão da média de contração (mN) induzida por cada frequência aplicada. Análise através do teste T de Student não pareado monocaudal entre o controle e tratado de cada frequência. $p < 0.05$ (*) foi considerado significante. Valores dispostos na tabela 9.

Tabela 8 - A resposta máxima (EMAX) das curvas de contração induzidas por estímulo elétrico em vesícula seminal de rato na presença e ausência do epitélio.

Estímulo elétrico (60v)	E_{MAX} (mN)	p	n
4Hz			
Epitélio +	2.518 \pm 1.725		4
Epitélio -	0.418 \pm 0.117	0.1350	4
8Hz			
Epitélio +	5.024 \pm 2.820		4
Epitélio -	0.833 \pm 0.277	0.0948	4
16Hz			
Epitélio +	9.227 \pm 2.602		4

<i>Epitélio -</i>	1.700 ± 0.516	0.0148*	4
32Hz			
<i>Epitélio +</i>	12.380 ± 2.197		4
<i>Epitélio -</i>	3.686 ± 0.862	0.0051*	4

E_{MAX} (mN) é o efeito máximo de contração produzido pelo estímulo elétrico em sua respectiva frequência (Hz). N representa o número de animais utilizados no estudo, sendo que cada animal contribuiu com um conjunto de vesículas seminais de duas tiras de tecido para experimentação. Uma tira foi utilizada para controle e a outra para a remoção do epitélio. $p < 0.05$ (*) foi considerado significativo.

4.13. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TH, PROTEÍNA S100 E CR

Os resultados da imunodeteção de TH e a proteína S100 são demonstrados nas figuras 31 e 32, respectivamente. Os resultados de CR são apresentados nas tabelas 9 e 10. Os resultados indicaram TH e proteína S100 positivas em pequenas fibras nervosas (faixa de 12 a 20 μm de tamanho) dentro da adventícia (a camada de tecido conjuntivo mais externa da vesícula seminal de rato). Múltiplas fibras nervosas delgadas positivas para TH e S100 foram localizadas na camada muscular lisa e no estroma subepitelial (lâmina própria). A TH foi detectada em células epiteliais das mucosas, mais especificamente no seu citoplasma e secreções apicais (com um padrão de coloração granular moderado a intenso). A CR foi detectada apenas em pequenos nervos da adventícia (positividade baixa).

Como esperado, as secções de tecido de controle positivo (cérebro humano) apresentaram uma imunoexpressão intensa e difusa tanto para a proteína S100 como para a CR. As secções de controle negativo (omissão dos anticorpos primários) foram consistentemente desprovidas de qualquer positividade. A reação de fundo inespecífica se apresentou de forma branda e localizada em poucas estruturas vasculares e em algumas células da camada muscular lisa. Tal reação inespecífica não impediu a correta identificação das estruturas nervosas.

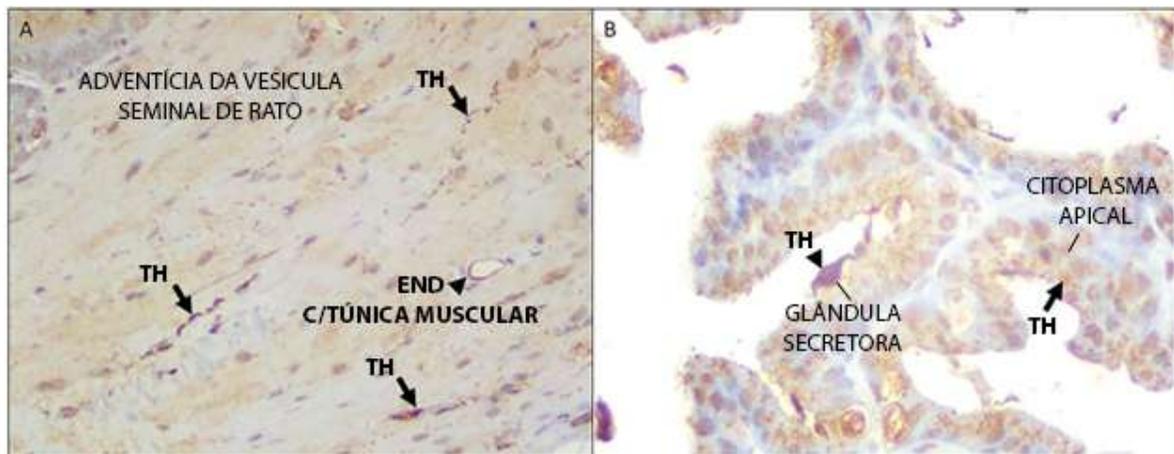


Figura 31 - Detecção imuno-histoquímica da TH em vesícula seminal de rato. A figura 31a ilustra a presença da TH e a imunorreatividade em fibras nervosas delgadas (indicados por setas completas) e o endotélio de pequenos vasos com a túnica muscular (END, indicado por ponta de seta). A figura 31b demonstra a TH e a imunorreatividade observada no citoplasma apical (indicado por seta completa) e nas glândulas secretoras (indicado por ponta de seta) das células epiteliais da vesícula seminal de rato. Imunoperoxidase, ampliação de 400x.

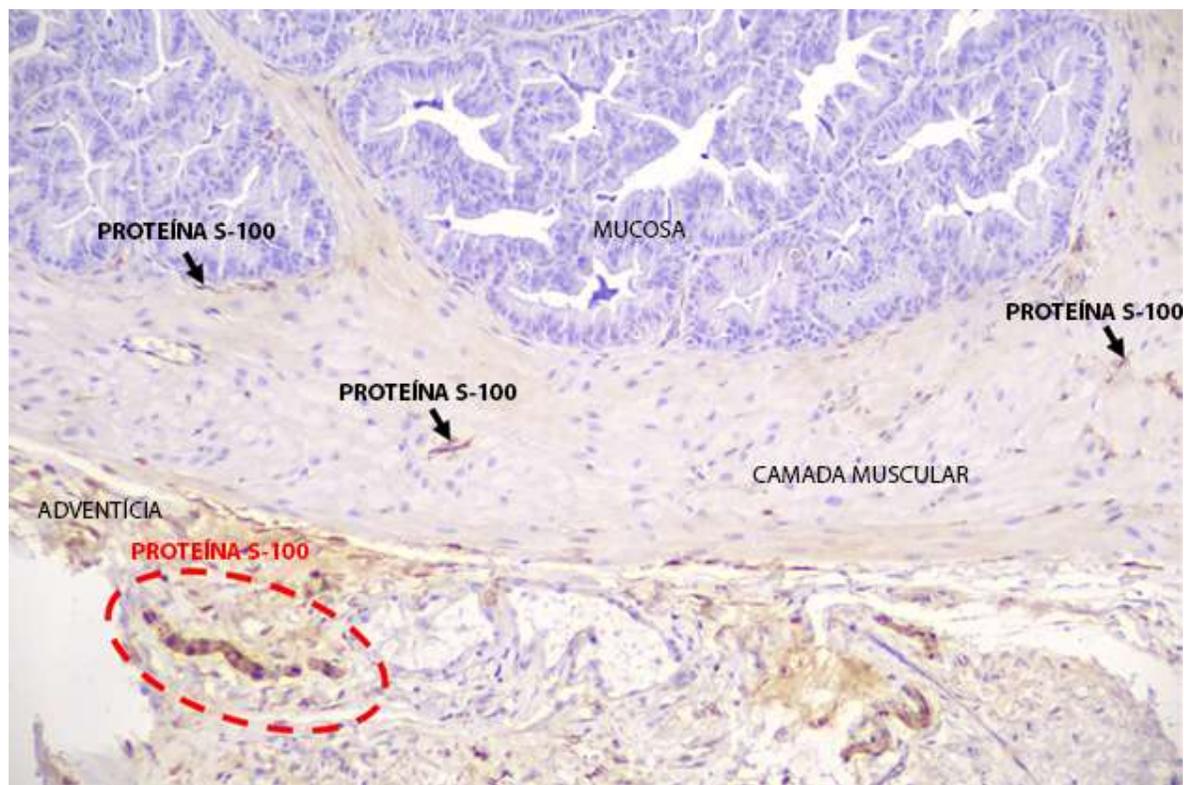


Figura 32 - Detecção imunohistoquímica da proteína S-100 em vesícula seminal de rato. Imunoreatividade para proteína S-100 foi detectada em pequenas fibras neurais (circulado vermelho) na adventícia e em fibras nervosas delicadas da camada muscular e da mucosa (indicado por setas). Imunoperoxidase, ampliação de 200x.

Tabela 9 - Detecção imuno-histoquímica da TH, proteína S-100 e CR nas vesículas seminais de rato.

Amostra	Controle negativo (omissão do anticorpo primário)	Anticorpo (Ac)		
		TH	Proteína S-100	CR
Diluição	Omitido	1:500	Pronto para uso	1:100
Cérebro humano (controle positivo, n=2)	Negativo	Positividade intensa/difusa no neurófilo e em alguns neurônios	Positividade intensa/difusa, no neurófilo.	Positividade intensa/difusa, no neurófilo e em alguns neurônios.
Adventícia da vesícula seminal de rato (n=4)	Negativo	Intensa positividade em fibras nervosas esparsas (variando de 12-20µm de diâmetro), em todas as amostras (4+/4).	Positividade moderada em fibras nervosas esparsas (variando de 12-20µm de diâmetro), em todas as amostras (4+/4).	Positividade muito baixa em fibras nervosas esparsas (variando de 12-20µm de diâmetro), em todas as amostras (4+/4).
Músculo liso da vesícula seminal de rato (n=4)	Negativo	Positividade moderada a intensa em múltiplas fibras nervosas (menos de 6 µm de diâmetro), em todas as amostras (4+/4).	Positividade moderada em fibras nervosas muito raras (menos de 6 µm de diâmetro), em	-

			todas as amostras (4+/4).	
Mucosa e epitélio de vesícula seminal de rato (n= 4)	Negativo	Positividade moderada a intensa no citoplasma apical e secreção de células epiteliais, em todas as amostras (4+/4).	Positividade moderada em fibras nervosas muito raras (menos de 6 µm de diâmetro), em todas as amostras (4+/4).	-

Tabela 10 - Quantificação da intensidade da positividade (IP = 255-MGV) para TH, proteína S-100 e CR em vesícula seminal de rato.

	Controle negativo 1 (omissão de AC primário)	Controle negativo 2 (isótopo controle)	TH	Proteína S100	CR	eNOS
Epitélio	32.51 ± 4	32.15 ± 3	120.76 ± 2	42.63 ± 1	42.58 ± 6	94.24 ± 17
Endotélio	36.67 ± 8	37.60 ± 6	140.18 ± 5	42.72 ± 6	46.29 ± 7	132.90 ± 26
Fibras nervosas	26.25 ± 4	23.26 ± 3	134.03 ± 4	119.54 ± 7	113.90 ± 10	42.88 ± 20

Dados expressos como média ± erro padrão da média dos valores de cinza (MGV). MGV é a média dos valores de cinza (medida usada em processamento de imagem em escala de cinza. Quantifica a intensidade de cinza de todos os pixels de parte ou da imagem completa). IP é a intensidade dos pixels. Existe uma fórmula para calcular a intensidade dos pixels (IP = 255 – MGV). AC é a sigla utilizada para anticorpo. eNOS é a óxido nítrico sintase endotelial.

4.14. RESULTADO DOS EXPERIMENTOS DE FISH

A Imunodeteção de TH na vesícula seminal de rato foi confirmada e validada de forma cruzada utilizando o método de FISH que revelou a expressão de TH mRNA nas mesmas estruturas antes demonstradas nos experimentos imunohistoquímicos (figura 33).

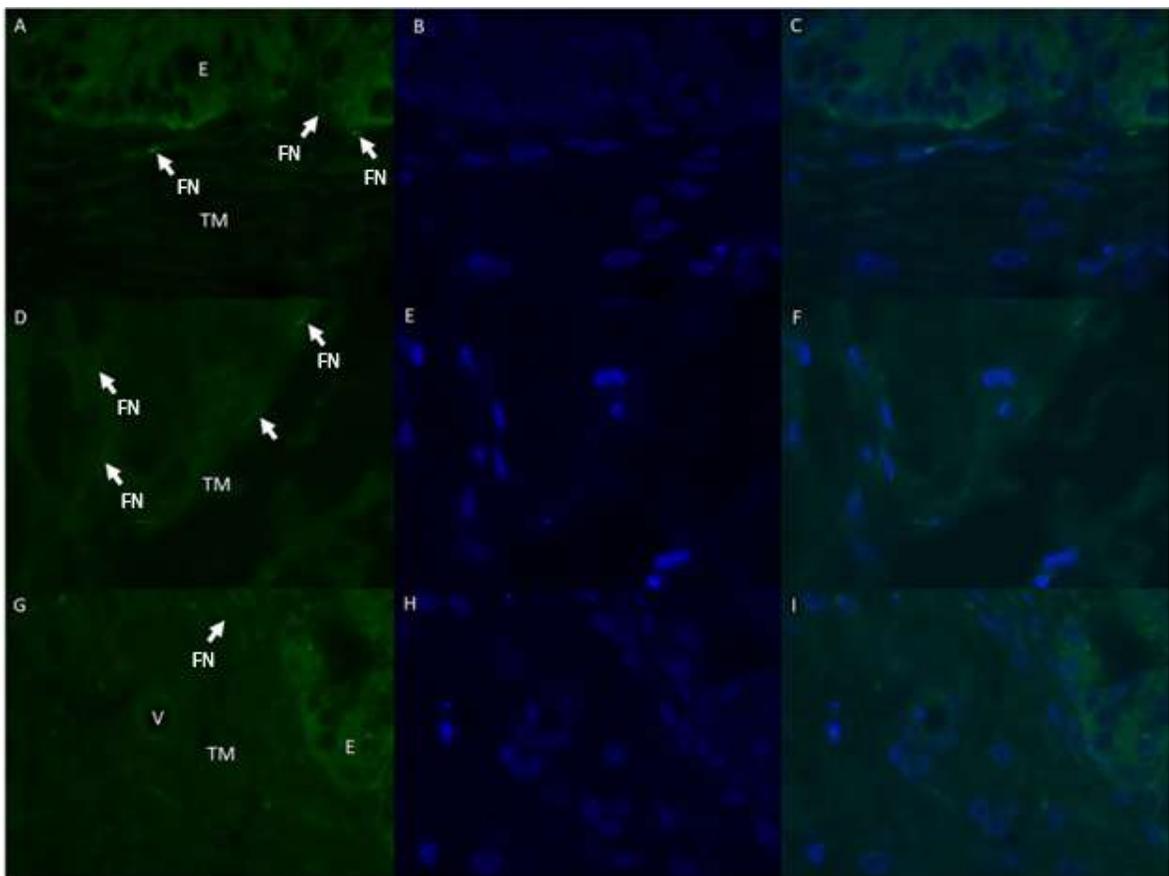


Figura 33 - Expressão de RNA mensageiro de TH em diferentes estruturas histológicas em vesícula seminal de rato. Figuras A e C demonstram a mucosa epitelial (nomeada como E na imagem) e fibras nervosas (nomeadas FN na imagem, indicadas por setas). Figuras D e F demonstram a túnica muscular (nomeada como TM na imagem) e fibras nervosas (indicadas por setas). Figuras G e I demonstram o endotélio vascular (nomeado como V na imagem), fibra nervosa (indicada por seta) e o epitélio. A, D e G demonstram a expressão de RNA mensageiro da TH (em verde, 6-FAM). B, E e H demonstram núcleos celulares (em azul, DAPI). C, F e I sobrepõem a expressão do RNA mensageiro da TH em células epiteliais,

nervos e endotélios, validando a expressão de TH obtida através da imuno-histoquímica, além de demonstrar a autofluorescência no fundo das estruturas, como fibras de colágeno da túnica muscular e estroma. Todas as imagens foram capturadas através de lente objetiva acromática de 100x com óleo de imersão. Ampliação de 1000x.

5. DISCUSSÃO

Os resultados indicam a liberação basal de DA, NA e ADR e, em especial, a 6-ND, que é liberada em maior quantidade na vesícula seminal de rato. A quantidade liberada da catecolamina nitrada atinge significância estatística quando comparada às demais. A liberação basal de 6-ND neste estudo é consistente com os resultados reportados em outros tecidos vasculares e não vasculares, como vasos de cordão umbilical humano [85], vasos poplíteos humano [76], aorta e artéria pulmonar isolada de *Callithrix spp (sagui)* [99], corpo cavernoso isolado de coelho [105], átrio direito de rato [106], ventrículo isolado de rato [80] e ducto deferente de humano [84] e rato [87].

A investigação da influência do NO na liberação basal de 6-ND demonstrou que o uso de L-NAME (inibidor da síntese do óxido nítrico) causa uma queda significativa na quantidade sintetizada e liberada de 6-ND na vesícula seminal de rato, sugerindo uma relação entre a síntese e liberação dessa catecolamina nitrada com a biodisponibilidade do NO. Ainda em vesícula seminal de rato, a diminuição da liberação basal de 6-ND foi acompanhada de uma redução nas forças de contração obtidas através das curvas de contração frequência-dependentes quando na presença de L-NAME, pois as contrações induzidas nos tecidos tratados foram significativamente menos potentes que dos tecidos controle. Tais efeitos também foram relatados em outros tecidos e estudos, como em cordão umbilical humano [85], vasos poplíteos humano [76], átrio direito isolado de rato [106] e ventrículo isolado de rato [80]. A ativação da eNOS (NOS endotelial) é reportada em estudo que observou artérias de maior calibre expostas ao H_2O_2 liberando maiores quantidades de NO que as artérias controle [107]. Desta forma, o presente estudo experimentou influenciar a liberação de NO através da exposição do tecido ao H_2O_2 , resultando no aumento da liberação de 6-ND. A imuno-histoquímica detectou eNOS na vesícula seminal de rato, reforçando a hipótese de que a ativação destas enzimas aumentam a síntese de NO e, conseqüentemente, a síntese de 6-ND. A utilização do GKT137831 (inibidor de peroxidase) resultou no aumento da liberação de 6-ND, sugerindo que a biodisponibilidade de O_2^- influencia a liberação basal desta nitrocatecolamina. Esse resultado reforça o conceito de que a geração de O_2^- pelas

peroxidases [108] diminui a nitração da DA em 6-ND [74], e que as EROs interferem (positivamente na presença de H_2O_2 e negativamente na presença de O_2^-) na síntese e liberação de catecolaminas nitradas. A remoção do epitélio da vesícula seminal de rato resultou tanto na redução da síntese de catecolaminas (e conseqüentemente, das catecolaminas nitradas) quanto nas respostas contráteis induzidas em curvas de contração frequência-dependentes, demonstrando a importância do epitélio na síntese e liberação de catecolaminas neste tecido e reforçando a hipótese de que o epitélio contribui para a síntese das catecolaminas.

A liberação basal de 6-ND em coração isolado de rato não demonstrou ser afetada significativamente pela pré-incubação de TTX (bloqueador de canal de sódio voltagem-dependente) [106], pois mesmo na presença desta substância, ocorreu a liberação da 6-ND, indicando a possibilidade da 6-ND pover de uma síntese não neurogênica. Os dados obtidos em vesícula seminal de rato fortalecem essa hipótese, pois observou-se o mesmo fenômeno neste tecido. Além disso, a TTX não alterou significativamente as contrações induzidas por NA, ADR e DA em vesícula seminal de rato (assim como quando a DA e 6-ND foram utilizadas como agentes moduladores pré-incubados junto à TTX). Portanto, a TTX não impediu que as catecolaminas (que não foram sintetizadas e liberadas pelo tecido, mas sim adicionadas na solução de Krebs para interagir com os receptores alvo) interagissem com os receptores alvo. A análise imuno-histoquímica revelou a presença de TH e de proteína S100 na adventícia, músculo liso, mucosa e epitélio da vesícula seminal de rato. A CR foi identificada com baixa imunoexpressão na adventícia da vesícula seminal de rato. Esses dados apontam para a possibilidade de síntese de catecolaminas (detecção da TH), presença de células gliais (detecção da proteína S100) e de diferentes tipos de células neuronais (detecção da CR, porém em menor intensidade que a TH e a proteína S100).

Embora seja a catecolamina de maior liberação na vesícula seminal de rato, a 6-ND (na mesma faixa de dose que as demais catecolaminas, de 10nM a 300 μ M) apresentou contrações concentração-dependentes menos potentes que a DA, NA e ADR. Em átrio direito isolado de rato [106] e em ducto deferente de rato [87], a 6-ND potencializa o efeito das catecolaminas clássicas (como observado na 6-ND pré-incubada nas concentrações de 1nM, 10nM e 100nM nas curvas de contração

concentração-dependentes induzidas pela NA, ADR e DA). A DA também demonstrou potencializar a NA e ADR, porém a NA e a ADR não demonstraram potencializar catecolamina alguma. Esses dados trazem pontos importantes para a investigação da ação moduladora que a 6-ND exerce nas contrações que ocorrem na vesícula seminal de rato, um fator importante para o processo da ejaculação. A ejaculação envolve as etapas de emissão e ejeção (as quais são moduladas tanto pelo sistema nervoso simpático e parassimpático) [109] e, embora seja principalmente associado a catecolaminas clássicas, é possível que esse processo também seja influenciado por catecolaminas nitradas. O efeito exato do sistema nervoso autônomo na ejaculação ainda não foi elucidado e encontrar a 6-ND como a catecolamina mais liberada pelo epitélio da vesícula seminal de rato revela uma via importante das células epiteliais na modulação da resposta autônoma. De fato, a estimulação elétrica provoca contrações frequência-dependente na vesícula seminal de rato, que em frequência menor é bloqueada pela atropina, e em voltagens mais altas a contração é inibida pela prazosina [110].

Essa é a primeira demonstração que as células epiteliais da vesícula seminal de rato liberam as catecolaminas clássicas e a 6-ND. Teria a 6-ND uma via fisiológica nas vesículas seminais? É importante avaliar se essas interações se limitam à vesícula seminal de rato, ou se também ocorrem em vesícula seminal humana, visto que os resultados com ducto deferente humano [84] e de rato [87] demonstraram uma ação similar da 6-ND. Deve-se avaliar se a modulação que a 6-ND derivada do epitélio exerceu sobre as catecolaminas clássicas também ocorre com outros mediadores do sistema nervoso autônomo, como acetilcolina [111] e peptídeo vasoativo do intestino [112]. Vale ressaltar que a DA e a 6-ND derivadas do epitélio estão sendo consideradas como moduladoras do sistema cardiovascular [75].

6. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a 6-ND derivada do epitélio é a catecolamina mais liberada pela vesícula seminal de rato. A síntese e liberação dessa substância

demonstra ser influenciada pela biodisponibilidade de NO e outras EROs (como H₂O₂ e O₂⁻), porém a presença de TTX não influencia. Ela pode atuar como um agente contrátil e também agir como um agente que potencializa as contrações induzidas por DA, NA e ADR neste tecido.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic Systems in Stress : Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev* 2009;89:535-606, p.536, fig 1. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>.
- [2] Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Parker KL. Manual of pharmacology and therapeutics. New York : Mcgraw-Hill Medical; 2008, p103.
- [3] Schulz C, Eisenhofer G, Lehnert H. Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. *Frontiers of hormone research*. 2004 Jan 1;31:1-25.
- [4] Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic Systems in Stress : Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev* 2009;89:535-606, p.539, fig 2. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>.
- [5] Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Parker KL. Manual of pharmacology and therapeutics. New York : Mcgraw-Hill Medical; 2008, p105-109.
- [6] Wimalasena K. Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Medicinal research reviews*. 2011 Jul;31(4):483-519.
- [7] Brunton LL, Dandan RH, Knollmann BC. The Pharmacological Basis of Therapeutics 13th Edition, JF Shanahan & H. Lebowitz, Eds. 2018, p133-136.
- [8] Narahashi T. Pharmacology of tetrodotoxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 2001 Jan 1;20(1):67-84.
- [9] Miyazawa K, Noguchi T. Distribution and origin of tetrodotoxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 2001 Jan 1;20(1):11-33.

- [10] Lorentz MN, Stokes AN, Rößler DC, Lötters S. Tetrodotoxin. *Current Biology*. 2016 Oct 10;26(19):R870-2.
- [11] Lee MJ, Jeong DY, Kim WS, Kim HD, Kim CH, Park WW, Park YH, Kim KS, Kim HM, Kim DS. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus*. *Applied and environmental microbiology*. 2000 Apr 1;66(4):1698-701.
- [12] Bane V, Lehane M, Dikshit M, O’Riordan A, Furey A. Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*. 2014 Feb 21;6(2):693-755.
- [13] Narahashi T. Tetrodotoxin—A brief history—. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2008 May 30;84(5):147-54.
- [14] PubChem, National Center of Biotechnology Information. Composto número 11174599 (PubChem CID). Disponível em: “<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrodotoxin>”. Acesso em fev/2024.
- [15] NASCIMENTO-JÚNIOR, Braz José do. *Anatomia humana sistemática básica*. 2020. Figura p. 211.
- [16] Puppo V, Puppo G. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: Premature ejaculation is not a disease. *Clinical anatomy*, 2016. 29(1), 111-119
- [17] Aumüller G, Riva A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia*, 1992. 24(4), 183-196.
- [18] Al-Zuhair A, Gosling JA, Dixon JS. Observations on the structure and autonomic innervation of the guinea-pig seminal vesicle and ductus deferens. *Journal of anatomy*. 1975 Sep;120(Pt 1):81.

- [19] Giuliano F, Clément P. Physiology of ejaculation: emphasis on serotonergic control. *European urology*. 2005 Sep 1;48(3):408-17.
- [20] Coolen LM, Allard J, Truitt WA, McKenna KE. Central regulation of ejaculation. *Physiology & behavior*. 2004 Nov 15;83(2):203-15.
- [21] Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 1992 Jul 17;257(5068):401-3.
- [22] Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biology of reproduction*. 1995 Mar 1;52(3):485-9.
- [23] Corbin JD. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *International journal of impotence research*. 2004 Jun;16(1):S4-7.
- [24] Clement P, Giuliano F. Physiology and pharmacology of ejaculation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2016 Oct;119:18-25.
- [25] Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology*. 2005 Jul 8;26(4):459-69.
- [26] Ahmadi R, Hajighorbani M, Masaeemanesh MB. In vitro effects of propranolol on human sperm motility. In *International Conference on Earth, Environment and Life sciences* Dec 2014 (pp. 23-24).
- [27] Sharif SI, Gokhale SD, Chandranath SI. Pharmacological characterization of the postjunctional alpha-adrenoceptors of the rat isolated seminal vesicle. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1990 May;341:425-31.
- [28] Flock T, Ravarani CN, Sun D, Venkatakrishnan AJ, Kayikci M, Tate CG, Veprintsev DB, Babu MM. Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Nature*. 2015 Aug 13;524(7564):173-9.

- [29] Breitbart H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY-PARIS-WEGMANN-. 2003 May 1;49(3):321-8.
- [30] Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T, Mikoshiba K. Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1, 4, 5-trisphosphate production. Journal of Biological Chemistry. 2005 Mar 25;280(12):11723-30.
- [31] Kasturi R, Vasulka C, Johnson JD. Ca²⁺, caldesmon, and myosin light chain kinase exchange with calmodulin. Journal of Biological Chemistry. 1993 Apr 15;268(11):7958-64.
- [32] Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. InAnnales d'endocrinologie 2021 Jun 1 (Vol. 82, No. 3-4, pp. 193-197). Elsevier Masson.
- [33] AVELLAR, Maria Christina W.; LÁZARI, Maria Fatima M.; PORTO, Catarina S. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 321-344, 2009.
- [34] Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E. Dopaminergic reward system: a short integrative review. International archives of medicine. 2010 Oct 6;3(1):24.
- [35] Giuliano F, Allard J. Dopamine and male sexual function. European urology. 2001 Jan 18;40(6):601-8.
- [36] Melis, M.R., Sanna, F. and Argiolas, A., 2022. Dopamine, erectile function and male sexual behavior from the past to the present: a review. *Brain Sciences*, 12(7), p.826.

[37] Kirsch P, Kunadia J, Shah S, Agrawal N. Metabolic effects of prolactin and the role of dopamine agonists: A review. *Frontiers in endocrinology*. 2022 Sep 30;13:1002320.

[38] Andersson KE. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. *Pharmacological reviews*. 2011 Dec 1;63(4):811-59.

[39] Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002;17:417-23.

[40] PHILLIPS, Elizabeth; CARPENTER, Christina; OATES, Robert D. Ejaculatory dysfunction. **Urologic Clinics**, v. 41, n. 1, p. 115-128, 2014.

[41] Simonsen U, Comerma-Steffensen S, Andersson KE. Modulation of dopaminergic pathways to treat erectile dysfunction. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2016 Oct;119:63-74.

[42] Lepor H. Alpha blockers for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Reviews in urology*. 2007;9(4):181.

[43] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

[44] PubChem, National Center of Biotechnology Information. Composto número 145068 (PubChem CID). Disponível em: "<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/145068>". Acesso em fev/2024.

[45] WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. N. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. **Nitric oxide**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 1998.

[46] BIAN, Ka; MURAD, Ferid. Nitric oxide (NO)-biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. **Front Biosci**, v. 8, n. 4, p. 264-278, 2003.

[47] Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, Zulli A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Sep 1;93:370-5.

[48] Brunton LL, Dandan RH, Knollmann BC. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 13th Edition, JF Shanahan & H. Lebowitz, Eds. 2018, p46-47.

[49] Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, Maguire MP, Crone JK, Bredt DS, Snyder SH, Chang TS. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biology of reproduction*. 1995 Jan 1;52(1):1-7.

[50] Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990 Jul 31;170(2):843-50.

[51] Kim N, Azadzi KM, Goldstein I, De Tejada IS. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Jul 1;88(1):112-8.

[52] Ehren I, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urological Research*. 1994 Nov;22:287-90.

[53] Iselin CE, Ny L, Larsson B, Schaad NC, Alm P, Graber P, Morel DR, Andersson KE. The nitric oxide synthase/nitric oxide and heme oxygenase/carbon monoxide pathways in the human ureter. *European urology*. 1998 Feb 1;33(2):214-21.

[54] Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, De Vente J. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric

oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience*. 1996 Mar 1;71(2):337-48.

[55] Ückert S, Stanarius A, Stief CG, Wolf G, Jonas U, Machtens S. Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human seminal vesicle: a light and electron microscopical study. *Urological research*. 2003 Aug;31:262-6.

[56] Atlas de Histologia em cores da PUCRS. Adaptado de "Arte e artifício da ciência histológica" de Pio del Rio-Hortega 1993. Disponível em [ediPUCRS](#).

[57] Shintani F, Kinoshita T, Kanba S, Ishikawa T, Suzuki E, Sasakawa N, Kato R, Asai M, Nakaki T. Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain. *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Jun 7;271(23):13561-5.

[58] Daveu C, Servy C, Dendane M, Marin P, Ducrocq C. Oxidation and nitration of catecholamines by nitrogen oxides derived from nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997 Jun 1;1(3):234-43.

[59] Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA. Novel homologs of gp91phox. *Trends in biochemical sciences*. 2000 Oct 1;25(10):459-61.

[60] De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Jul 28;275(30):23227-33.

[61] Nazıroğlu, Mustafa. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical research volume 32*. 2007, p1990-2001.

[62] Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007 Aug 1;43(3):319-31.

[63] Wingler K, Hermans JJ, Schiffers P, Moens AL, Paul M, Schmidt HH. NOX1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress. *British journal of pharmacology*. 2011 Oct;164(3):866-83.

[64] Zeng SY, Yang L, Yan QJ, Gao L, Lu HQ, Yan PK. Nox1/4 dual inhibitor GKT137831 attenuates hypertensive cardiac remodelling associating with the inhibition of ADAM17-dependent proinflammatory cytokines-induced signalling pathways in the rats with abdominal artery constriction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019 Jan 1;109:1907-14.

[65] Green DE, Murphy TC, Kang BY, Kleinhenz JM, Szyndralewicz C, Page P, Sutliff RL, Hart CM. The Nox4 inhibitor GKT137831 attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular cell proliferation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012 Nov;47(5):718-26.

[66] Zheng H, Xu N, Zhang Z, Wang F, Xiao J, Ji X. Setanaxib (GKT137831) ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting the NOX1/NOX4/reactive oxygen species/MAPK pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 2022 Apr 4;13:823975.

[67] Deliyanti D, Wilkinson-Berka JL. Inhibition of NOX1/4 with GKT137831: a potential novel treatment to attenuate neuroglial cell inflammation in the retina. *Journal of neuroinflammation*. 2015 Dec;12:1-3.

[68] PubChem, National Center of Biotechnology Information. Composto número 58496428 (PubChem CID). Disponível em: "<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gkt137831>". Acesso em fev/2024.

[69] Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*. 1973 Jul 15;134(3):707-16.

[70] Chauhan-Puri, Alamjeet Kaur. Hydrogen peroxide regulates a cation channel to control neuroendocrine cell excitability [dissertação de doutorado]. Kingston (Canada): Queen's University; 2021.

[71] Doan TN, Gentry DL, Taylor AA, Elliott SJ. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca^{2+} -flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochemical Journal*. 1994 Jan 1;297(1):209-15.

[72] Roveri A, Coassin M, Maiorino M, Zamburlini A, van Amsterdam FT, Ratti E, Ursini F. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992 Sep 1;297(2):265-70.

[73] PubChem, National Center of Biotechnology Information. Composto número 784 (PubChem CID). Disponível em: "<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-Peroxide>". Acesso em fev/2024.

[74] Britto-Júnior J, Furlaneto R, Lima AT, de Oliveira MG, Severino B, Frecentese F, Fiorino F, Caliendo G, Muscará MN, De Nucci G. GKT137831 and hydrogen peroxide increase the release of 6-nitrodopamine from the human umbilical artery, rat-isolated right atrium, and rat-isolated vas deferens. *Frontiers in Pharmacology*. 2024 Apr 5;15:1348876.

[75] Zatz R, De Nucci G. Endothelium-derived dopamine and 6-nitrodopamine in the cardiovascular system. *Physiology*. 2024 Jan 1;39(1):44-59.

[76] Oliveira LFG, Britto-Júnior J, Lima AT, Moraes MO, Moraes MEA, de Souza VB, Schenka AA, Zakia Monica F, De Nucci G. Release of 6-nitrodopamine from human

popliteal artery and vein. *Life Sci.* 2023 1;326:121801. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121801.

[77] Campos R, Pinheiro DHA, Britto-Júnior J, de Castro HA, Mendes GD, Moraes MO, Moraes MEA, Lopes-Martins RÁB, Antunes NJ, De Nucci G. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from *Chelonoidis carbonaria aortae* in vitro. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021 22;1173:122668. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122668.

[78] Lima AT, Dos Santos EX, Britto-Júnior J, de Souza VB, Schenka AA, Campos R, Moraes MO, Moraes ME, Antunes E, De Nucci G. Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of *Pantherophis guttatus* aortic rings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 2022 Dec 1;262:109471.

[79] Britto-Júnior J, Lima AT, Santos-Xavier JS, Gonzalez P, Mónica FZ, Campos R, Souza VD, Schenka AA, Antunes E, Nucci GD. Relaxation of thoracic aorta and pulmonary artery rings of marmosets (*Callithrix* spp.) by endothelium-derived 6-nitrodopamine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2023 Apr 7;56:e12622.

[80] Britto-Júnior J, Medeiros-Teixeira LR, Lima AT, Dassow LC, Lopes-Martins RÁB, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, Antunes E, De Nucci G. 6-Nitrodopamine Is the Most Potent Endogenous Positive Inotropic Agent in the Isolated Rat Heart. *Life (Basel).* 2023d 4;13:2012. doi: 10.3390/life13102012.

[81] Britto-Júnior J, do Prado GL, Chiavegatto S, Cunha F, Moraes MO, Moraes ME, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G. 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.* 2023 Sep 1;138:26-33.

[82] Júnior, G. Q., Britto-Júnior, J., Magalhaes, T. B., Campos, R., Nyamkondiwa, K. L., Klugh, K. L., ... & De Nucci, G. (2023). 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*, 37(9), e5691.

[83] Britto-Júnior J, Silva SG, Lima AT, Fuguhara V, Andrade LB, Mendes GD, Peterson LW, Chiavegatto S, Antunes E, De Nucci G. The pivotal role of neuronal nitric oxide synthase in the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated vas deferens. *Nitric Oxide*. 2024 Feb 1;143:1-8.

[84] Britto-Júnior J, da Silva-Filho WP, Amorim AC, Campos R, Moraes MO, Moraes ME, Fregonesi A, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G. 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility. *Andrology*. 2022 Nov;10(8):1540-7.

[85] Britto-Júnior J, Coelho-Silva WC, Murari GF, Serpellone Nash CE, Mónica FZ, Antunes E, De Nucci G. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci*. 2021b 1;276:119425. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119425.

[86] Campos R, Jacintho FF, Britto-Júnior J, Mónica FZ, Justo AF, Pupo AS, Moreno RA, de Souza VB, Schenka AA, Antunes E, De Nucci G. Endothelium modulates electrical field stimulation-induced contractions of *Chelonoidis carbonaria* aortic rings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020 Jul 1;233:108763.

[87] Britto-Junior J, Ximenes L, Ribeiro A, Fregonesi A, Campos R, de Almeida Kiguti LR, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G. 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. *European Journal of Pharmacology*. 2021 Nov 15;911:174544.

[88] Britto-Junior J, Ribeiro A, Ximenes L, Lima AT, Jacintho FF, Fregonesi A, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G. Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens. *European Journal of Pharmacology*. 2022 Jan 15;915:174716.

[89] Britto-Júnior J, Guimarães RA, Oliveira DL, Lima AT, Quirino Junior G, de Oliveira Stocco GA, Salgado Uramoto EH, Fregonesi A, Antunes E, De Nucci G. Alpha1-adrenergic blockers selectively antagonize the contractions induced by 6-nitrodopamine in the human vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2023 Nov 1:1-2.

[90] Lima, A. T., Amorim, A. C., Britto-Junior, J., Campitelli, R. R., Fregonesi, A., Monica, F. Z., ... & De Nucci, G. (2022). 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*, 395(10), 1257-1268.

[91] Blier P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *European Neuropsychopharmacology*. 2003. 13(2), 57-66

[92] HISASUE SI, Furuya R, Itoh N, Kobayashi K, Furuya S, Tsukamoto T. Ejaculatory disorder caused by alpha-1 adrenoceptor antagonists is not retrograde ejaculation but a loss of seminal emission. *International journal of urology*. 2006 Oct;13(10):1311-6.

[93] Montero RF, Riemann D, Berger M. Antidepressant and antimanic drugs. In *The pharmacology of sleep* 1995 (pp. 465-490). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

[94] Segraves RT, Balon R. Antidepressant-induced sexual dysfunction in men. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014 Jun 1;121:132-7.

[95] Höfner K, Claes H, De Reijke TM, Folkestad B, Speakman MJ. Tamsulosin 0.4 mg once daily: effect on sexual function in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction. *European urology*. 1999 Sep 2;36(4):335-41.

[96] Giuliano F, Hellstrom WJ. The pharmacological treatment of premature ejaculation. *BJU international*. 2008 Sep;102(6):668-75.

[97] Waldinger MD. Premature ejaculation: definition and drug treatment. *Drugs*. 2007 Mar;67:547-68.

[98] Palumbo A, Napolitano A, Carraturo A, Russo GL, d'Ischia M. Oxidative conversion of 6-nitrocatecholamines to nitrosating products: a possible contributory factor in nitric oxide and catecholamine neurotoxicity associated with oxidative stress and acidosis. *Chemical Research in Toxicology*. 2001 Sep 17;14(9):1296-305.

[99] Britto-Júnior J, Lima AT, Santos-Xavier JS, Gonzalez P, Mónica FZ, Campos R, Souza VB, Schenka AA, Antunes E, Nucci G. Relaxation of thoracic aorta and pulmonary artery rings of marmosets (*Callithrix* spp.) by endothelium-derived 6-nitrodopamine. *Braz J Med Biol Res*. 2023b 7;56:e12622. doi: 10.1590/1414-431X2023e12622.

[100] Palumbo A, Napolitano A, Barone P, d'Ischia M. 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*. 1999 Dec 20;12(12):1213-22.

[101] Britto-Júnior J, Uramoto EH, Lima AT, Ribeiro LF, de Souza VB, Schenka AA, de Almeida Magalhães JC, Antunes E, Fregonesi A, De Nucci G. Epithelium-derived 6-nitrodopamine modulates noradrenaline-induced contractions in human seminal vesicles. *Life Sciences*. 2024 May 6:122695.

[102] Andersen ML, De Souza RL, Sebben A, Augusta M, Rodrigues C, Machado R, ... Júnior R. Normativas do CONCEA para a produção, manutenção ou utilização animal em atividades de ensino ou pesquisa científica. Leis, Decretos, Portarias, Resoluções Normativas e Orientações técnicas. 2016. 3;26.

[103] Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2020 Sep;40(9):1769-77.

[104] Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992 20:298-303. doi: 10.1161/01.hyp.20.3.298.

[105] Lima AT, Britto-Júnior J, Moraes MO, Moraes MEA, Fregonesi A, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G. 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of the rabbit corpus cavernosum relaxation. *Andrology*. 2023, 29; 13585. doi: 10.1111/andr.13585.

[106] Britto-Júnior J, de Oliveira MG, Dos Reis Gati C, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, Mónica FZ, Antunes E, De Nucci G. 6-NitroDopamine is an endogenous modulator of rat heart chronotropism. *Life Sci*. 2022c. 15;307:120879. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120879.

[107] Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev*. 2019. 1;99:311-379. doi: 10.1152/physrev.00036.2017.

[108] Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid Redox Signal*. 2015 10;23:406-27. doi: 10.1089/ars.2013.5814.

[109] Hsieh JT, Kuo YC, Chang HC, Liu SP, Chen JH, Tsai VF. The role of sympathetic and parasympathetic nerve systems on the smooth muscle of rat seminal vesicles - experimental results and speculation for physiological implication on ejaculation. *Andrology*. 2014; 2(1):59-64. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00146.x.

[110] Gokhale SD, Bashir AA, Chandranath SI. Functional responses of the rat isolated seminal vesicle to electrical field stimulation: a pharmacological analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23(1):22-9. doi: 10.1111/j.1440-1681.1996.tb03057.x.

[111] Hamamura M, Maróstica E, de Avellar MC, Porto CS. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the rat seminal vesicle. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 9;247(1-2):192-8. doi: 10.1016/j.mce.2006.01.004.

[112] Guijarro LG, Rodriguez-Pena MS, Prieto JC. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in rat seminal vesicle. *Am J Physiol*. 1991;260(2 Pt 1):E286-91. doi: 10.1152/ajpendo.1991.260.2.E286.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação do perfil metabólico de animais tratados cronicamente com nitro-catecolaminas**, registrada com o nº **6172-1/2023**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Gilberto De Nucci e José Britto Júnior, Antônio Tiago Silva, Gilberto Quirino dos Santos Júnior**, 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 **19/04/2023**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/04/2023 a 20/03/2027
Vigência da autorização para manipulação animal:	19/04/2023 a 20/03/2027
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / WISTAR
No. de animais:	20
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	20 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / WISTAR
No. de animais:	40
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	40 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / WISTAR
No. de animais:	40
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	40 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / WISTAR
No. de animais:	40
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	40 Machos

Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / Wistar
No. de animais:	40
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	40 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / Wistar
No. de animais:	40
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	40 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / Wistar
No. de animais:	40
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	40 Machos
Origem:	CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação biológica em animais de laboratório
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, **20 de abril de 2023**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Eduardo Villaverde Haszler
Secretário Executivo

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 **EDUARDO VILLAVERDE HASZLER, SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CEUA/UNICAMP**, em 20/04/2023, às 10:02 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 22/04/2023, às 19:32 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:
1652AB8C 28E54C01 9813AA47 FD864116





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da ação fisiológica de nitrocatecolaminas e novas catecolaminas em ratos Wistar tratados cronicamente com L-NAME**, registrada com o nº **6320-1/2023**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Gilberto De Nucci e Vivian Fughara de Lima, José Britto Júnior**, 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 **20/09/2023**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/11/2023 a 30/09/2027
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/09/2023 a 30/09/2027
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30

Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas

Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	10.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Origem:	Centro Multidisciplinar para Investigação biológica em animais de laboratório
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, **27 de novembro de 2023.**

 Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
 Presidente da CEUA/Unicamp

 Eduardo Villaverde Haszler
 Secretário Executivo

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 **LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 27/11/2023, às 19:00 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO VILLAVERDE HASZLER, SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CEUA/UNICAMP**, em 27/11/2023, às 14:31 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:
217716F3 7B0F46DE AC640B0D 354CEFC7





Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp



CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que os projetos de pesquisa intitulados **“Avaliação do perfil metabólico de animais tratados cronicamente com nitro-catecolaminas”** e **“Avaliação da ação fisiológica de nitrocatecolaminas e novas catecolaminas em ratos Winstar tratados cronicamente com L-NAME”**; protocolos CEUA/UNICAMP nº. 6172-1/2023 e 6320-1/2023 respectivamente, de responsabilidade do Prof. Dr. Gilberto de Nucci e executores José Brito Junior e Vivian Fukuhara obtiveram aprovação para inclusão dos novos executores: **Rafael de Moraes Campos** e **Gabriel Augusto de Oliveira Stocco**.

Este documento é válido apenas se apresentado junto aos certificados emitidos originalmente pela CEUA/UNICAMP.

Campinas, 12 de dezembro de 2023.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente da CEUA/Unicamp

Eduardo Villaverde Haszler
Secretário executivo da CEUA/Unicamp

CEUA/UNICAMP
Rua Monteiro Lobato, 255
13083-862 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
https://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_principal

Documento assinado eletronicamente por **LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 12/12/2023, às 11:55 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO VILLAVERDE HASZLER, SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CEUA/UNICAMP**, em 12/12/2023, às 11:16 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:
6F4884B3 01AA4FC8 89B6685C 408026DE





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **GABRIEL AUGUSTO DE OLIVEIRA STOCCO** 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 20 horas.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 03 agosto 2022.

A handwritten signature in blue ink that reads "Wagner José Fávaro".

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Assistente Doutor
Presidente da CEUA/UNICAMP