

Liberação basal de 6-cianodopamina de ducto deferente isolado de rato e seu papel na contratilidade do tecido

Palavras-Chave: FISILOGIA, DUCTO DEFERENTE, BIOLOGIA MOLECULAR

Autores/as:

Caroline Fernanda Sanches Dal Pozzo, Departamento de Farmacologia, FCM-UNICAMP

José Britto-Júnior, Departamento de Farmacologia, FCM-UNICAMP

João Felipe Agostini Badin, FCM-UNICAMP

Prof. Dr. Gilberto de Nucci (orientador) Departamento de Farmacologia, FCM-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O ducto deferente dos ratos é composto por camadas adventícia, muscular e mucosa, funcionando como um canal que conecta o epidídimo ao ducto ejaculatório. Estudos anteriores identificaram uma rede densa de varicosidades catecolaminérgicas no ducto deferente, com adenosina 5'-trifosfato (ATP) e noradrenalina como principais co-transmissores. Além desses mediadores clássicos, o ducto deferente de humanos, ratos e camundongos libera 6-nitrodopamina (6-ND), uma catecolamina que desempenha um papel significativo como regulador endógeno da contratilidade do ducto deferente (SANTICCIOLI, 1986; BURNSTOCK 1995; ANTON 1977). A 6-ND aumenta marcadamente as contrações induzidas por catecolaminas clássicas, como dopamina, noradrenalina e adrenalina. Recentemente, a 6-cianodopamina (6-CYD) foi identificada como uma nova catecolamina endógena em corações de coelhos isolados, mas sua atividade biológica no ducto deferente ainda não foi elucidada (BRITTO-JÚNIOR 2024; BRITTO JÚNIOR 2023, BRITTO JÚNIOR, 2023). Este estudo investiga a liberação basal de 6-CYD do ducto deferente isolado de ratos e seu efeito na contratilidade desse tecido.

METODOLOGIA:

Ratos Wistar machos adultos foram utilizados, mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro, com acesso ad libitum a água e ração. Após a eutanásia com isoflurano, os ductos deferentes foram excisados e imersos em solução de Krebs-Henseleit (KHS), mantida a 37°C e oxigenada continuamente. Os ductos deferentes isolados foram incubados por 30 minutos.

A liberação basal de 6-cianodopamina (6-CYD) e outras catecolaminas foi quantificada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). Foram realizadas curvas de resposta-concentração para noradrenalina, adrenalina e dopamina na ausência e presença de 6-CYD, utilizando banhos de órgãos e transdutores de força isométrica para medir a contratilidade dos tecidos. A viabilidade do tecido foi avaliada com 10 µM de noradrenalina.

Curvas de resposta-concentração também foram conduzidas em tecidos pré-tratados com tetrodotoxina para investigar o efeito na liberação de catecolaminas e na contratilidade induzida por noradrenalina, adrenalina e dopamina. Estimulações elétricas de campo (EFS) foram realizadas para avaliar as contrações dependentes de frequência em tecidos pré-incubados com 6-CYD.

A expressão de tirosina hidroxilase e da proteína S100 foi avaliada por imunohistoquímica para identificar a origem das catecolaminas. Os dados foram analisados estatisticamente, com valores de pEC50 e Emax representando a média \pm erro padrão da média (S.E.M.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Liberação Basal de 6-Cianodopamina e 6-Nitrodopamina do Ducto Deferente Isolado de Rato

A análise por LC-MS/MS revelou que o ducto deferente isolado de rato liberou quantidades significativas de 6-CYD (Figura 1A) e 6-ND (Figura 1B). A liberação de 6-cianodopamina não foi afetada pela tetrodotoxina (30 min, 1 μ M), enquanto a liberação de 6-nitrodopamina foi virtualmente abolida pela mesma (Figura 1B).

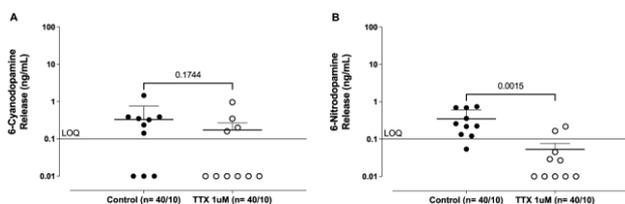


Figura 1. Liberação basal de 6-cianodopamina (painel A) e 6-nitrodopamina (painel B) de vasos deferentes isolados de ratos, com e sem incubação com tetrodotoxina 1 μ M.

Efeito da 6-Cianodopamina nas Contrações do RIEVD Induzidas por Noradrenalina, Adrenalina e Dopamina

A 6-CYD apresentou efeitos potenciadores distintos sobre as contrações induzidas por noradrenalina, adrenalina e dopamina no ducto deferente isolado. A noradrenalina induziu contrações dependentes da concentração, e a pré-incubação com 6-CYD a 1 nM aumentou significativamente os valores de Emax sem causar um deslocamento da curva de concentração-resposta, enquanto concentrações de 10 e 100 nM provocaram deslocamentos marcantes para a esquerda, causando diminuição significativa de pEC50 (Figuras 2A-D).

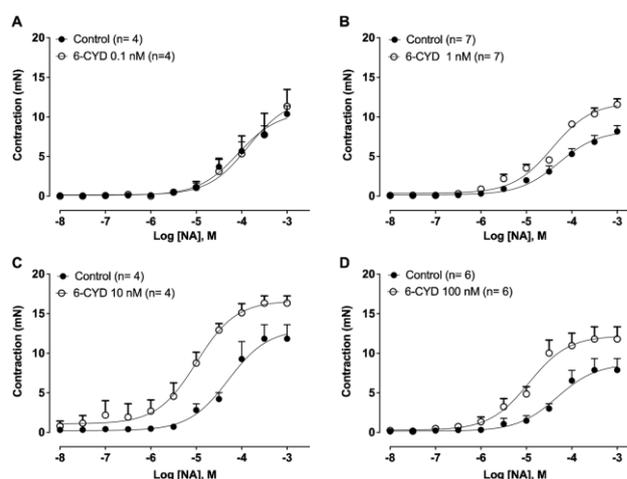


Figura 2. Efeito da 6-cianodopamina (6-CYD) nas contrações dependentes da concentração de tiras de ducto deferente epididimário isolado de rato (RIEVD) induzidas por noradrenalina (NA).

A adrenalina também causou contrações dependentes da concentração. A pré-incubação com 6-CYD a 1 nM não alterou significativamente os valores de Emax ou pEC50, enquanto a 6-CYD a 10 e 100 nM provocou deslocamentos significativos para a esquerda nas curvas de resposta-concentração, reduzindo o valor de pEC50, embora os valores de Emax permanecessem inalterados.

A dopamina também induziu contrações dependentes de concentração no tecido. A pré-incubação com 6-CYD a 1 e 10 nM não alterou os valores de Emax u

pEC50, enquanto 6-CYD a 100 nM provocou deslocamentos significativos para a esquerda nas curvas de resposta-concentração e aumentou os valores de

Tabela 1. A potência (pEC50) e as respostas máximas (Emax) de noradrenalina, adrenalina, dopamina e 6-nitrodopamina (6-ND) nos vasos deferentes epididimais isolados de ratos na ausência (controle) e presença de 6-cianodopamina (6-CYD)

Catecolamina	Condição	pEC50 (log[M])	P-valor (pEC50)	Emax (mN)	P-valor (Emax)	n
Noradrenalina	Controle	3.98 ± 0.18	-	10.37 ± 1.02	-	4
	6-CYD (100 pM)	3.94 ± 0.13	0.7319	11.54 ± 2.13	0.7954	4
	Controle	4.27 ± 0.19	-	8.16 ± 0.74	-	7
	6-CYD (1 nM)	4.52 ± 0.14	0.4527	11.57 ± 0.72	0.0026	7
	Controle	4.26 ± 0.08	-	11.83 ± 1.78	-	4
	6-CYD (10 nM)	5.06 ± 0.19	0.0188	16.83 ± 0.87	0.0451	4
	Controle	4.48 ± 0.18	-	7.88 ± 1.44	-	6
	6-CYD (100 nM)	5.00 ± 0.18	0.0110	11.80 ± 1.55	0.0048	6
Adrenalina	Controle	4.77 ± 0.15	-	12.76 ± 0.72	-	4
	6-CYD (1 nM)	4.69 ± 0.26	0.5503	13.20 ± 1.37	0.7850	4
	Controle	4.65 ± 0.10	-	11.80 ± 0.63	-	6
	6-CYD (10 nM)	5.12 ± 0.17	0.0440	12.99 ± 1.40	0.4598	6
	Controle	4.06 ± 0.25	-	9.17 ± 1.80	-	4
	6-CYD (100 nM)	5.05 ± 0.18	0.0211	9.39 ± 0.95	0.9187	4
Dopamina	Controle	3.85 ± 0.27	-	13.17 ± 0.51	-	4
	6-CYD (1 nM)	3.80 ± 0.18	0.1186	14.49 ± 0.50	0.1186	4
	Controle	3.75 ± 0.17	-	10.91 ± 1.18	-	4
	6-CYD (10 nM)	4.24 ± 0.08	0.0446	11.01 ± 0.17	0.9371	4
	Controle	3.94 ± 0.22	-	11.46 ± 0.66	-	4
	6-CYD (100 nM)	4.46 ± 0.08	0.0492	14.31 ± 0.58	0.0091	4
6-ND	Controle	3.84 ± 0.06	-	13.43 ± 2.64	-	4
	6-CYD (100 nM)	3.55 ± 0.12	0.0761	13.18 ± 1.10	0.9353	4

Emax. Os valores de pEC50, Emax, número de tiras utilizadas e p-valores são apresentados na Tabela 2.

Efeito da Tetrodotoxina na Potenciação pelas Contrações Induzidas por Noradrenalina, Adrenalina e Dopamina

Nos tecidos pré-tratados com tetrodotoxina (1 µM, 30 min), 6-CYD a 100 nM induziu deslocamentos significativos para a

esquerda nas curvas de resposta-concentração à noradrenalina (Figura 8A) e adrenalina (Figura 8B), mas não aumentou as contrações induzidas por dopamina (Figura 8C). Os valores de pEC50, Emax, número de tiras utilizadas e p-valores são apresentados na Tabela 2.

Efeito da Co-incubação de 6-CYD e 6-ND nas Contrações Induzidas por Catecolaminas

Tabela 2. A potência (pEC50) e as respostas máximas (Emax) de noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e dopamina (DA) na presença ou não de 6-cianodopamina (6-CYD, 100 nM) em preparações de ducto deferente epididimal isolado de rato pré-tratadas com tetrodotoxina (1 μ M, 30 min).

Catecolamina	pEC50 (log[M])	P-value (pEC50)	Emax (mN)	P-value (Emax)	n
NA	3.48		11.27		6
NA+6-CYD (100 nM)	3.92	0.0001	11.83	0.2740	6
ADR	4.49		13.30		6
ADR+6-CYD (100 nM)	4.81	0.0318	13.65	0.3706	6
DA	3.55		9.89		4
DA+6-CYD (100 nM)	3.49	0.6731	12.14	0.4316	4

Tabela 3. A potência (pEC50) e as respostas máximas (Emax) da noradrenalina, adrenalina e dopamina no ducto deferente epididimário de rato isolado na ausência (controle) e presença da co-incubação de 6-cianodopamina (6-CYD) e 6-nitrodopamina (6-ND). Nas curvas de concentração-resposta para noradrenalina, a incubação prévia com tetrodotoxina (TTX, 1 μ M, 30 min) antes da co-incubação com 6-CYD e 6-ND também foi realizada.

Catecolamina	pEC50 (log[M])	P-value (pEC50)	Emax (mN)	P-value (Emax)	n
6-ND 10 pM	5.21		10.19		4
6-ND 10 pM + 6-CYD 100 pM	5.97	0.006	16.88	0.0140	4
TTX 1 μ M + 6-ND 10 pM	4.76		6.20		6
TTX 1 μ M + 6-ND 10 pM + 6-CYD 100 pM	5.36	0.0386	10.48	0.0237	6
6-ND 10 pM	4.47		11.24		4
6-ND 10 pM + 6-CYD 100 pM	4.52	0.8811	14.54	0.3104	4
6-ND 10 pM	5.53		10.79		4
6-ND 10 pM + 6-CYD 100 pM	5.39	0.3502	8.33	0.1234	4

A co-incubação dos tecidos com 6-CYD (100 pM) e 6-ND causou deslocamentos significativos para a esquerda nas curvas de concentração-resposta à noradrenalina e aumentou seus valores de Emax. Nos tiras pré-tratados com tetrodotoxina, a co-incubação com 6-CYD (100 pM) e 6-ND (100 pM) também causou um deslocamento significativo para a esquerda e aumentou os valores de Emax para noradrenalina. A co-incubação com 6-CYD e 6-ND não afetou as respostas contráteis à adrenalina e dopamina. Os valores de pEC50, Emax, número de tiras utilizadas e p-valores são apresentados na Tabela 4.

Análises Imuno-histoquímicas

A imuno-histoquímica revelou a presença de tirosina hidroxilase no citoplasma das células epiteliais da mucosa e nas fibras nervosas do RIEVD (Figuras 10A-D). A proteína S100 foi observada em estruturas neurais da lâmina própria, túnica média e adventícia (Figuras 11A-D).

DISCUSSÃO:

Os resultados indicam que o ducto deferente epididimário de rato (RIEVD) libera basalmente 6-cianodopamina (6-CYD). Em contraste com a 6-nitrodopamina (6-ND), a liberação de 6-CYD não foi afetada pela tetrodotoxina, sugerindo uma origem epitelial. A presença de tirosina hidroxilase

no epitélio do ducto deferente apoia esta hipótese.

A 6-CYD não induziu contrações significativas no RIEVD sozinha, mas potencializou contrações induzidas por noradrenalina, adrenalina e dopamina. Concentrações de 6-CYD a 10 e 100 nM deslocaram as curvas de resposta-contração para a esquerda, aumentando os valores de Emax para noradrenalina, adrenalina e dopamina. A potencialização das contrações por 6-CYD pode envolver mecanismos de liberação e recaptção de noradrenalina, bem como aumento da sensibilidade ao cálcio do aparato contrátil.

A sinergia entre 6-CYD e catecolaminas é distinta da de 6-ND, que foi abolida pela tetrodotoxina e não mostrou seletividade em concentrações mais baixas. O efeito sinérgico de 6-CYD parece ser dependente da concentração, enquanto 6-ND não demonstrou essa característica.

A co-incubação de 6-CYD e 6-ND resultou em um sinergismo notável nas contrações induzidas por noradrenalina, destacando a possibilidade de diferentes mecanismos/receptores envolvidos. A identificação de 6-CYD como um modulador endógeno da contratilidade do ducto deferente sugere que o epitélio pode regular a contratilidade do músculo liso, semelhante ao papel do endotélio na reatividade vascular.

A descoberta das ciano-catecolaminas, como 6-CYD, expande o conhecimento sobre a modulação da contratilidade do ducto deferente. Embora 6-CYD seja o primeiro mediador endógeno conhecido a conter um grupo cianeto, seu papel fisiológico parece ser modulador e potencializador da atividade das catecolaminas clássicas.

Os dados sugerem que a 6-CYD pode aumentar a liberação de noradrenalina por mecanismos exocíticos e não exocíticos. A presença de tirosina hidroxilase no epitélio do ducto deferente apoia a hipótese de que o epitélio pode ser uma fonte de produção de 6-CYD, adicionando uma nova dimensão à compreensão da regulação da contratilidade do ducto deferente.

BIBLIOGRAFIA

Santicioli, P., Maggi, C. A., Giuliani, S., Meli, A. (1986). Development of a specific and sensitive radioimmunoassay for the determination of substance P in biological fluids. *Journal of Neurochemistry*, v. 47, n. 2, p. 345-350, 1986.

Burnstock, G. (1995). Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 46, n. 4, p. 365-384, 1995.

Anton, P. G., McGrath, J. C. (1977). Further evidence for adrenergic transmission in the human vas deferens. *Journal of Physiology*, v. 273, n. 1, p. 45-55, 1977. DOI: 10.1113/jphysiol.1977.sp012080.

Britto-Júnior, J., Nacário Silva, S. G., Lima, A. T., Fuguhara, V., Andrade, L. B., Mendes, G. D., Peterson, L. W., Chiavegatto, S., Antunes, E., De Nucci, G. (2024b). The role of beta-adrenergic receptors in the contractile response of the vas deferens to 6-nitrodopamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 378, p. 451-460, 2024.

Britto-Júnior, J., Lima, A. T., Campos, R., Gião, A. A., Mendes, G. D., Ferreira-Novaes Silva, L. P., Fregonesi, A., Pupo, A. S., Antunes, E., De Nucci, G. (2023a). 6-Nitrodopamine potentiates contractions of rat isolated vas deferens induced by noradrenaline, adrenaline, dopamine and electric field stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 396, n. 10, p. 2555-2570, 2023. DOI: 10.1007/s00210-023-02478-6.

Júnior, G. Q., Britto-Júnior, J., Magalhães, T. B., Campos, R., Nyamkondiwa, K. L., Klugh, K. L., Peterson, L. W., Corvino, A., Sparaco, R., Frecentese, F., Caliendo, G., 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*, v. 37, n. 9, p. e5691, 2023. DOI: 10.1002/bmc.5691.