



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**KARINE LIMA SILVA**

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS AMINAS-TRAÇO  $\beta$ -FENILETILAMINA E  
OCTOPAMINA EM CANAL DEFERENTE ISOLADO DE RATOS**

**FORTALEZA**

**2025**

KARINE LIMA SILVA

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS AMINAS-TRAÇO  $\beta$ -FENILETILAMINA E  
OCTOPAMINA EM CANAL DEFERENTE ISOLADO DE RATOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S58a Silva, Karine Lima.  
Avaliação farmacológica das aminas-traço b-feniletilamina e octopamina em canal deferente isolado de ratos / Karine Lima Silva. – 2025.  
90 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.
1. Aminas Biogênicas. 2. Ducto Deferente . 3. Receptores Adrenérgicos Alfa. 4. Receptores Associados a Traços de Amina. I. Título.

CDD 615.1

---

KARINE LIMA SILVA

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS AMINAS-TRAÇO  $\beta$ -FENILETILAMINA E  
OCTOPAMINA EM CANAL DEFERENTE ISOLADO DE RATOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 30/01/2025

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr Pedro Jorge Caldas Magalhães (orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco José Batista de Lima Júnior  
Centro Universitário FACISA (UNIFACISA)

---

Prof. Dr. Marco Antônio de Freitas Clementino  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Teresinha Silva de Brito  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas infinitas bênçãos ao longo da construção desse trabalho e por ter me permitido chegar até aqui.

Ao meu orientador, prof. Dr. Pedro Magalhães, por ter acreditado no potencial desse trabalho e por ter me guiado tão bem durante esses anos, ensinando, inclusive, lições de bicicleta. Agradeço imensamente pela sua dedicação em extrair o melhor dos seus alunos e por acreditar no nosso potencial.

À banca examinadora, pela gentileza em ceder parte de seu precioso tempo para discutir e sugerir melhoras para a versão final do presente trabalho.

Ao prof. Dr. Armênio Aguiar, por sempre ter me incentivado com o tema do presente trabalho, ofertando materiais complementares para meus estudos e cafés especiais para tornar a jornada do doutorado mais tranquila.

Ao prof. Dr. Alexandre Havt e ao prof. Dr. Marco Clementino, por terem cedido o espaço e os equipamentos do laboratório de Toxinologia Molecular para a execução dos experimentos de biologia molecular do presente trabalho.

À minha avó, Maria Pereira, (*in memoriam*), por ter sido meu exemplo de luta e persistência. E, acima de tudo, por todo o amor incondicional oferecido durante esses anos em que tive o privilégio de compartilhar a existência com ela.

À minha mãe, Regina, por sempre ter priorizado a nossa educação, minha e de meus irmãos, mesmo em tempos difíceis.

Aos meus irmãos, Karen e Paulo, por serem meu apoio e refúgio emocional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu companheiro de vida, Andres, por acreditar indubitavelmente na minha capacidade e por ter me dado todo o suporte emocional necessário ao longo da escrita deste trabalho.

Aos meus companheiros do LAFARMULI: Kalinne, Daniel, Manu e Karen, pelo excelente tempo que tivemos juntos. Obrigada por todos os ensinamentos e momentos maravilhosos que tivemos vivendo e praticando ciência. Um agradecimento especial à minha fiel dupla de laboratório, Kalinne, que dividiu os momentos finais desta saga, com organização de aulas, montagem de experimentos, trocas de ideias científicas, organização de congresso, e, além de tudo, relatos da vida cotidiana.

Aos queridos alunos de iniciação científica do LAFARMULI, em especial: Gabriel, Eduarda e Nicole. Muito obrigada pela paciência, pela persistência e pela dedicação em também oferecerem resultados para o presente trabalho. Vocês foram peças fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Muito obrigada!

Aos alunos do laboratório de Toxinologia Molecular, em especial Marcus Queiroga, pela ajuda na execução dos experimentos de biologia molecular.

Aos meus queridos amigos: Davi, Tâmara, Jessilane, Edglê, Virgínia, Geisane e Roberto, por serem luz na minha vida e por fazerem tudo ter mais sentido através do amor proporcionado pela amizade de vocês.

Às duas psicólogas que tive ao longo desses anos, Rafaelly e Jéssica. Obrigada por terem realizado um trabalho incrível no meu desenvolvimento pessoal, fortalecendo a convicção de que eu seria capaz de alcançar tudo que desejava, inclusive a conclusão do presente trabalho.

Aos funcionários do Centro de Biomedicina: Haroldo, Cláudia, Marcílio e Valdenir, pela gentileza, disponibilidade e pelos momentos de risos e descontração.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”

(Carl Sagan)

## RESUMO

As aminas-traço (AT) são encontradas em todo o sistema nervoso central em concentrações na faixa de 0,1 – 100 ng/g de tecido. Em 2001, Borowsky et al identificaram a superfamília dos receptores associados às aminas-traço (TAAR), com vários sendo expressos em regiões específicas do sistema nervoso central e tecidos periféricos, dentre eles, o sistema reprodutor masculino. Os mecanismos que regulam o comportamento contrátil do canal deferente são de interesse como alvos para drogas destinadas ao controle da ejaculação, com a possibilidade de as AT exercerem funções importantes em vias de sinalização moleculares desse tecido. O objetivo do presente trabalho foi avaliar e caracterizar os efeitos farmacológicos de duas AT,  $\beta$ -feniletilamina ( $\beta$ -FEA) e octopamina, sobre a contratilidade do canal deferente e suas vias de sinalização. Os experimentos de contratilidade muscular foram registrados em um sistema de aquisição de dados. Foi utilizado RT-PCR para avaliar a expressão gênica de TAAR e receptores adrenérgicos e Western Blotting para avaliar a expressão proteica de TAAR. Mediante a construção de curva concentração-efeito sobre o tônus basal do tecido isolado, a  $\beta$ -FEA e a octopamina foram capazes de gerar contração muscular dependente de concentração, também com alteração da frequência e da amplitude das contrações fásicas geradas e com resposta mais acentuada no segmento epididimal (EP) do canal deferente isolado. Em experimentos de estimulação do campo elétrico (EFS) não foram observadas respostas significativas da contratilidade do tecido em presença de  $\beta$ -FEA ou octopamina. Mediante pré-contração induzida pela fenilefrina (phe), clássico agonista  $\alpha$ -adrenérgico, foi observado que a octopamina ( $> 100 \mu\text{M}$ ) potencializou a resposta contraturante gerada pelo agonista, efeito inexistente presença da  $\beta$ -FEA. Em presença dos antagonistas adrenérgicos prazosin e fentolamina (phent), a resposta contraturante das AT foi significativamente reduzida. Como a resposta observada nos experimentos com as AT foi excitatória, utilizou-se o EPPTB ( $50 \mu\text{M}$ ), antagonista TAAR1, de maneira indireta em presença de phent, porém não foi observada diminuição do bloqueio adrenérgico na presença do EPPTB. Em presença de pré-contrações induzidas por diferentes concentrações de  $\text{K}^+$  extracelular (40, 60, 80 e 120 mM), tanto a  $\beta$ -FEA como a octopamina foram capazes de potencializar a resposta contrátil quando a pré-contração era gerada por 40 mM de  $\text{K}^+$ , efeito também demonstrado para a nafazolina (NFZ). Em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$ , a resposta contraturante da octopamina foi bloqueada pela nifedipina, um bloqueador de canais de  $\text{Ca}^{+2}$ . Contudo, na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e em meio contendo  $\text{Ba}^{2+}$  a resposta contrátil da octopamina foi significativamente reduzida. Foi observado que a NFZ, agonista adrenérgico e potencial agonista TAAR4, de maneira semelhante as AT, possui ação contraturante dependente de concentração mais evidente no segmento EP. Mediante técnicas de biologia molecular, foi encontrado expressão gênica dos receptores TAAR1 e TAAR4 no canal deferente de rato menor do que no testículo. Contudo, a expressão proteica desses receptores no canal deferente foi comparável à expressão no testículo.  $\beta$ -FEA e octopamina produzem efeito contrátil em canal deferente isolado de ratos, efeito mais acentuado no segmento EP, que provavelmente está relacionado a interação com receptores adrenérgicos.

**Palavras-chave:** Aminas Biogênicas; Ducto Deferente; Receptores Adrenérgicos Alfa; Receptores Associados a Traços de Amina.

## ABSTRACT

### PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF TRACE AMINES $\beta$ -PHENYLETHYLAMINE AND OCTOPAMINE ON ISOLATED RAT VAS DEFERENS

Trace amines (TA) are found throughout the central nervous system at concentrations ranging from 0.1–100 ng/g tissue. Borowsky et al (2001) identified the superfamily of trace amine-associated receptors (TAAR), with several being expressed in specific regions of the central nervous system and peripheral tissues, including the male reproductive system. The mechanisms that regulate the contractile behavior of the vas deferens are of interest as targets for drugs designed to control ejaculation, with the possibility of TA playing important roles in molecular signaling pathways in this tissue. The aim of the present study was to evaluate and characterize the pharmacological effects of two trace amines,  $\beta$ -FEA and octopamine, on the contractility of the vas deferens and its signaling pathways. Muscle contractility experiments were recorded on a data acquisition system. RT-PCR was used to evaluate the gene expression of TAAR and adrenergic receptors and Western Blotting was used to evaluate the protein expression of TAAR. By constructing a concentration-effect curve on the basal tone of the isolated tissue,  $\beta$ -FEA and octopamine were able to generate concentration-dependent muscle contraction, also with changes in the frequency and amplitude of the phasic contractions generated and with a more pronounced response in the epididymal segment (EP) of the isolated vas deferens. In electric field stimulation (EFS) experiments, no significant tissue contractility responses were observed in the presence of  $\beta$ -FEA or octopamine. Through pre-contraction induced by phenylephrine (phe), a classic  $\alpha$ -adrenergic agonist, it was observed that octopamine ( $> 100 \mu\text{M}$ ) potentiated the contractile response generated by the agonist, an effect that was non-existent in the presence of  $\beta$ -FEA. In the presence of the adrenergic antagonist prazosin and phentolamine (phent), the AT contractile response was significantly reduced. As the response observed in the experiments with AT was excitatory, EPPTB ( $50 \mu\text{M}$ ), a TAAR1 antagonist, was used indirectly in the presence of phent, however, no decrease in adrenergic blockade was observed in the presence of EPPTB. In the presence of pre-contractions induced by different concentrations of extracellular  $\text{K}^+$  (40, 60, 80 and 120 mM), both  $\beta$ -FEA and octopamine were able to potentiate the contractile response when the pre-contraction was generated by 40 mM  $\text{K}^+$ , an effect also demonstrated for naphazoline (NFZ). In medium containing  $\text{Ca}^{2+}$ , the contractile response of octopamine was blocked by nifedipine, a  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker. However, in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  and in medium containing  $\text{Ba}^{2+}$  the contractile response of octopamine was significantly reduced. It was observed that NFZ, an adrenergic agonist and potential TAAR4 agonist, similarly to AT, has a concentration-dependent contracting action that is more evident in the EP segment. Using molecular biology techniques, gene expression of TAAR1 and TAAR4 receptors was found to be smaller in the rat vas deferens than in the testis. However, the protein expression of these receptors in the vas deferens was comparable to the expression in the testis.  $\beta$ -FEA and octopamine produce a contractile effect in the isolated vas deferens of rats, with a more pronounced effect in the EP segment, which is probably related to the interaction with adrenergic receptors.

**Keywords:** Adrenergic alpha Receptors; Biogenic Amines; Trace Amine-Associated Receptors; Vas Deferens.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Aminas-traço (AT) clássicas .....	17
<b>Figura 02</b> - Camadas musculares do canal deferente .....	23
<b>Figura 03</b> - Esquema do mecanismo contrátil do canal deferente .....	25
<b>Figura 04</b> - Esquema representativo do sistema para registro de contratilidade <i>in vitro</i> .....	32
<b>Figura 05</b> - Representação da montagem do canal deferente em sistema para banho de órgãos isolados .....	33
<b>Figura 06</b> - Traçados experimentais da $\beta$ -FEA e da octopamina em canal deferente .....	40
<b>Figura 07</b> - Efeitos da $\beta$ -FEA e da octopamina sobre o tônus basal em canal deferente de ratos .....	41
<b>Figura 08</b> - Comparação dos efeitos da $\beta$ -FEA e da octopamina nas contrações de segmentos epididimais (EP) e prostáticos (PR) de canal deferente de rato ...	43
<b>Figura 09</b> - Formato da resposta contrátil causada por estimulação elétrica de campo em canal deferente de rato .....	45
<b>Figura 10</b> - Efeitos da $\beta$ -FEA nas fases da contração induzida por campo elétrico e na frequência e amplitude pico a pico das contrações rítmicas de canal deferente de rato .....	46
<b>Figura 11</b> - Efeitos da octopamina nas fases da contração induzida por campo elétrico e na frequência e amplitude pico a pico das contrações rítmicas de canal deferente de rato .....	47
<b>Figura 12</b> - Efeito relaxante do agonista TAAR1 (RO5263397) em canal deferente contraído com 80 mM KCl .....	48
<b>Figura 13</b> - Efeitos da $\beta$ -FEA e da octopamina nas contrações induzidas por agonista adrenérgico (5 $\mu$ M) em canal deferente de rato .....	49
<b>Figura 14</b> - Ação dos receptores adrenérgicos $\alpha$ -1A nas contrações induzidas por phe, $\beta$ -FEA e octopamina nos segmentos EP e PR de canal deferente de rato .....	51
<b>Figura 15</b> - Efeito inibitório da fentolamina (10 $\mu$ M) sobre as contrações induzidas por $\beta$ -FEA e phe em canal deferente de rato .....	52
<b>Figura 16</b> - Curva concentração-efeito da fentolamina (1 a 30 $\mu$ M) à fase estacionária da contração induzida por phe, $\beta$ -FEA ou octopamina em canal deferente	

de rato .....	53
<b>Figura 17</b> - Efeitos inibitórios da fentolamina (Phent) adicionada sozinha ou em combinação com EPPTB (50 $\mu$ M) sobre a contração induzida por $\beta$ -FEA (800 $\mu$ M) ou octopamina (800 $\mu$ M) em canal deferente de rato .....	54
<b>Figura 18</b> - Ações da $\beta$ -FEA em canal deferente em meio a diferentes concentrações de $K^+$ extracelular .....	56
<b>Figura 19</b> - Efeito da adição de concentrações crescentes de aminas traço ( $\beta$ -FEA e octopamina) e da fenilefrina no platô da contração induzida por diferentes concentrações de KCl em canal deferente de rato .....	57
<b>Figura 20</b> - Efeito da nifedipina na resposta contrátil induzida por octopamina em canal deferente de rato mantido em meio extracelular contendo $Ca^{2+}$ .....	58
<b>Figura 21</b> - Efeito da nifedipina na resposta contrátil induzida por octopamina em canal deferente de rato mantido em meio extracelular contendo $Ba^{2+}$ como substituto ao $Ca^{2+}$ .....	59
<b>Figura 22</b> - Efeitos contráteis da NFZ sobre o tônus basal em canal deferente de ratos .....	60
<b>Figura 23</b> - Efeito da adição de concentrações crescentes de NFZ no platô da contração induzida por diferentes concentrações de KCl em canal deferente de rato .....	61
<b>Figura 24</b> - Ação do antagonista $\alpha$ -adrenérgico não-seletivo sobre as contrações induzidas por NFZ em canal deferente de rato .....	63
<b>Figura 25</b> - Efeito do antagonista adrenérgico $\alpha$ -1A sobre as contrações induzidas por NFZ em canal deferente de rato .....	64
<b>Figura 26</b> - Efeito do EPPTB (50 $\mu$ M) sobre as contrações induzidas por NFZ em canal deferente de rato .....	65
<b>Figura 27</b> - Expressão gênica dos TAAR1 e TAAR4 em segmentos EP e PR de canal deferente e testículo isolado de ratos .....	66
<b>Figura 28</b> - Comparação da expressão gênica dos TAAR1 e TAAR4 nos segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos .....	67
<b>Figura 29</b> - Expressão gênica dos receptores Adra1a e Adra1d em segmentos EP e PR de canal deferente e testículo isolado de ratos .....	68
<b>Figura 30</b> - Avaliação da expressão proteica dos receptores TAAR1 e TAAR4 em segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos por meio da técnica	

de Western Blotting .....	69
---------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Expressão de TAARs em diferentes órgãos de ratos .....	21
<b>Tabela 2</b> – Sequência de <i>primers</i> utilizados na RT-PCR .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
AADC	L-aminoácido aromático descarboxilase
AC	Adenilato cyclase
Adra1a	Receptor adrenérgico alfa 1A
Adra1d	Receptores adrenérgico alfa 1D
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AT	Aminas-traço
ATP	Trifosfato de adenosina
BaCl <sub>2</sub>	Cloreto de bário
β-FEA	β-feniletilamina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPC
EC <sub>50</sub>	Concentração efetiva 50
EFS	Estimulação de campo elétrico
EP	Epididimal
EPM	Erro padrão da média
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GSK-3	Glicogênio sintase quinase-3
MAO	Monoamina oxidase
LAFARMULI	Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso
mRNA	RNA mensageiro
NA	Noradrenalina
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NFZ	Nafazolina
PR	Prostático
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
UFC	Universidade Federal do Ceará
TAARs	Receptores associados às aminas-traços

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
1.1	Aminas-traço .....	17
1.2	Receptores associados às aminas-traços (TAARs) .....	19
1.3	Aspectos fisiológicos e farmacológicos do canal deferente .....	22
1.4	Disfunção contrátil do canal deferente .....	27
2	JUSTIFICATIVA .....	29
3	OBJETIVOS .....	30
3.1	Objetivo geral .....	30
3.2	Objetivos específicos .....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1	Animais .....	31
4.2	Drogas e soluções .....	31
4.3	Contratibilidade in vitro .....	31
4.4	Protocolos experimentais de contratibilidade .....	33
4.4.1	<i>Construção de curvas concentração-efeito sobre a tensão de repouso do tecido</i> .....	33
4.4.2	<i>Avaliação do efeito inibitório de antagonistas farmacológicos</i> .....	34
4.4.3	<i>Construção de curvas concentração-efeito em preparações pré-contraídas com diferentes concentrações de KCl</i> .....	34
4.5	Expressão gênica dos receptores adrenérgicos ( $\alpha 1A$ e $\alpha 1D$ ) e dos receptores TAAR1 e TAAR4 .....	34
4.5.1	<i>Desenho dos primers para RT-PCR</i> .....	34
4.5.2	<i>Extração do RNA total e síntese do cDNA</i> .....	35
4.5.3	<i>Reação de RT-PCR</i> .....	36
4.6	Expressão proteica dos receptores adrenérgicos TAAR1 e TAAR4 por técnica de Western Blotting .....	36
4.7	Análise estatística .....	37
5	RESULTADOS .....	38
5.1	Efeito das aminas-traço $\beta$ -feniletilamina ( $\beta$ -FEA) e octopamina no tônus basal	

de canal deferente isolado de ratos .....	38
5.2 Efeito das aminas-traço $\beta$ -FEA e octopamina no t3nus basal dos segmentos epididimal (EP) e prost3tico (PR) de canal deferente isolado de ratos .....	41
5.3 Avalia33o do efeito das aminas-traço em contra33es induzidas por estimula33o de campo el3trico .....	44
5.4 Avalia33o do agonista TAAR1 (RO-5166017) em canal deferente isolado de ratos .....	47
5.5 Efeito da $\beta$ -FEA e octopamina em prepara33es de canal deferente previamente contra3das por fenilefrina (5 $\mu$ M) .....	49
5.6 Avalia33o do envolvimento de receptores $\alpha$ -adren3rgicos na resposta contr3til obtida nos segmentos EP e PR de $\beta$ -FEA e octopamina .....	50
5.7 Avalia33o do envolvimento de receptores TAAR1 em canal deferente isolado de ratos .....	53
5.8 Avalia33o do efeito da $\beta$ -FEA e octopamina em meio a diferentes concentra33es de $K^+$ extracelular .....	55
5.9 Avalia33o do efeito da nifedipina (10 $\mu$ M) na curva concentra33o-efeito da octopamina (1 – 1000 $\mu$ M) em segmentos EP e PR de canal deferente de ratos .....	57
5.10 Avalia33o da resposta basal da nafazolina (NFZ) em segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos .....	59
5.11 Avalia33o do efeito da NFZ (0.01 – 100 $\mu$ M) na presen3a de diferentes concentra33es de $K^+$ extracelular .....	61
5.12 Avalia33o do envolvimento de receptores $\alpha$ -adren3rgicos na resposta contr3til obtida no segmento EP em presen3a de NFZ .....	62
5.13 Avalia33o do EPPTB (50 $\mu$ M) na curva concentra33o-efeito da NFZ (0.01 – 100 $\mu$ M) .....	64
5.14 Avalia33o da express3o g3nica de receptores TAAR1 e TAAR4 nos segmentos EP e PR de canal deferente .....	65
5.15 Avalia33o da express3o g3nica de receptores adren3rgicos $\alpha$ 1 e $\alpha$ 2 nos segmentos EP e PR de canal deferente .....	67
5.16 Avalia33o da express3o dos receptores TAAR1 e TAAR4 atrav3s de t3cnica de Western Blotting .....	68

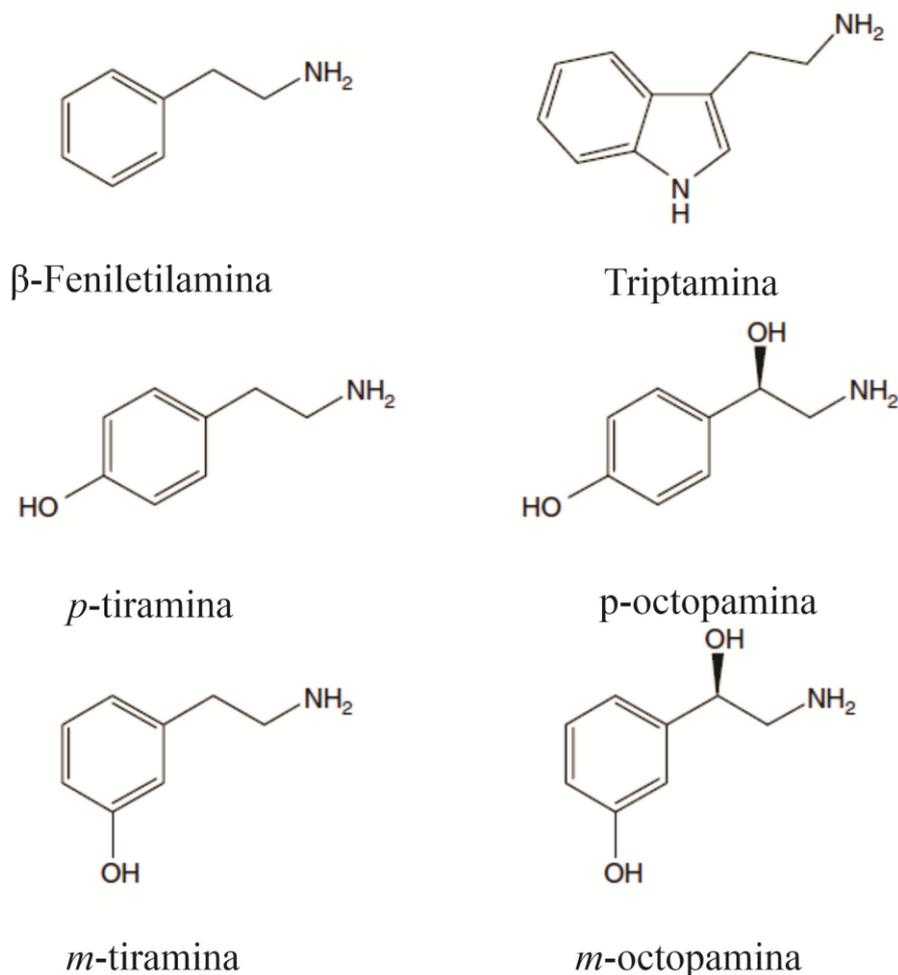
6	DISCUSSÃO .....	70
7	CONCLUSÕES .....	80
	REFERÊNCIAS .....	81
	ANEXO A .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aminas-traço

O termo “amina-traço” (AT) refere-se ao grupo estruturalmente relacionado de aminas e seus isômeros: *p*-octopamina, *m*-octopamina, *p*- e *m*-tiramina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina ( $\beta$ -FEA) (BURCHETT; HICKS, 2006). Essas aminas são encontradas em todo o sistema nervoso central (BERRY, 2004) e estão intimamente associadas aos sistemas neurotransmissores de dopamina, noradrenalina e serotonina (PHILIPS et al., 1974; AXELROD; SAAVEDRA, 1977). Por causa dessa semelhança estrutural com as aminas clássicas, os estudos iniciais com essas substâncias foram realizados majoritariamente em tecidos de sistema nervoso, principalmente no cérebro de mamíferos. Durden e Davis (1993) indicaram que os níveis endógenos das AT são centenas de vezes inferiores aos níveis de neurotransmissores clássicos, como dopamina, noraepinefrina e serotonina, com concentrações na faixa de 0.1 – 100 ng/g de tecido.

**Figura 1** – Aminas-traço (AT) clássicas



Fonte: (adaptado de Zucchi et al., 2006 )

A  $\beta$ -FEA é uma amina biogênica de ocorrência natural facilmente encontrada em grãos de cacau e está presente em quantidades residuais em vários alimentos, como chocolate (PASTORE et al., 2005; ZIEGLEDER; STOJACIC, 1992), queijo (BONETTA et al., 2008) e vinho (LANDETE et al., 2005), sendo o mais alto teor relatado em chocolate (PASTORE et al., 2005; ZIEGLEDER; STOJACIC, 1992).

Sendo sintetizada a partir de fenilalanina pela ação da enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (HOLT et al., 2007; RAMSAY; OLIVIERI; HOLT, 2011), a  $\beta$ -FEA é subproduto da biossíntese de catecolaminas tanto no sistema nervoso central como na periferia. É metabolizada pela monoamino-oxidase (MAO) (HUEBERT et al., 1999) e pelas enzimas amino-oxidases primárias (TSUJI et al., 1986). Embora a  $\beta$ -FEA esteja presente na circulação em concentrações nanomolares sob condições fisiológicas normais (BERRY, 2004; UDENFRIEND; COOPER, 1953), seus níveis plasmáticos podem aumentar centenas de vezes em pacientes sob uso de inibidores da enzima monoamino-oxidase (iMAO) (REYNOLDS; RAUSCH; RIEDERER, 1980; SAAVEDRA, 1974).

A octopamina é uma amina-traço hidroxilada que ocorre naturalmente em plantas, insetos, moluscos e outros invertebrados e também em mamíferos. Foi primeiramente detectada no veneno produzido pelas glândulas salivares da espécie *Octopus vulgaris* (ESPAMER, 1948). Estudos indicam a octopamina ser biossintetizada a partir da tiramina, a qual é um metabólito do aminoácido L-tirosina. Os tecidos cerebrais e nervosos constituem os principais locais de síntese em mamíferos, sendo possível a mensuração dos níveis dessa AT no plasma (AXELROD; SAAVEDRA, 1977). A octopamina pode funcionar como um neuromodulador, no entanto, existem controvérsias sobre o papel e a função precisa dessa AT (ZAHID-KHAN; NAWAZ, 2016).

É importante destacar haver diferença com relação ao mecanismo de ação dessas aminas em invertebrados e vertebrados. Em invertebrados, as AT desempenham papéis semelhantes ao sistema adrenérgico dos vertebrados, atuando como neurotransmissores, neuromoduladores e neuro-hormônios, com liberação neuronal sugerida como ocorrendo a partir de vesículas sinápticas de maneira dependente da despolarização celular (ROEDER, 2005; LANGE, 2009).

Já em vertebrados, essas aminas parecem atuar como meros neuromoduladores ao invés de efeitos neurotransmissores do sistema de monoaminas. Berry (2004) descreve o neuromodulador ser uma substância liberada de um neurônio, mas sem causar nenhuma mudança na excitabilidade das células pós-sinápticas na ausência de neurotransmissor. O

neuromodulador liberado age para modificar a ação (aumento ou diminuição) de um neurotransmissor coexistente (BERRY, 2004). Em sua revisão, Berry et al (2004) destaca uma série de trabalhos que trazem evidências fisiológicas que as AT agem como neuromoduladores no SNC de mamíferos.

Tanto em vertebrados quanto em invertebrados, a principal rota sintética das AT é a descarboxilação enzimática de L-aminoácidos precursores (L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina) por ação da enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (GLORIAM et al., 2005). De início, a maioria dos estudos eram realizados em tecidos do sistema nervoso, porém, depois veio a descoberta de que a AADC também está presente em vários outros tipos de células, como em células pulmonares, renais, gastrointestinais e pancreáticas (LAUWERYNS; VAN RANST, 1988; TAKAYANAGI; WATANABE, 1996) também capazes de sintetizar AT. No que diz respeito a degradação, as AT sofrem ação da enzima monoaminoxidase (MAO), assim como os neurotransmissores monoaminérgicos, sendo metabolizadas tanto pela MAO-A quanto pela MAO-B (PHILIPS; BOULTON, 1979; DURDEN; PHILIPS, 1980).

As AT são capazes de se difundirem rapidamente através da bicamada lipídica (BERRY et al., 2013). Henry et al (1988) observou que a taxa de liberação das vesículas pré-sinápticas não aumentava em resposta a despolarização induzida por  $K^+$  (HENRY et al., 1988), indicando que, diferentemente das aminas clássicas, as AT não são armazenadas em vesículas sinápticas e que sua taxa de liberação depende da quantidade disponível no tecido (DYCK., 1989), com o estado de equilíbrio farmacocinético sendo determinado através das taxas de síntese e metabolização (PATERSON et al. 1990.)

Até agora, desconhecemos os transportadores celulares específicos para as AT. Em altas concentrações, essas substâncias podem ser transportadas pelos transportadores específicos de dopamina (LIANG et al., 2009), norepinefrina (NA) (BURGESS; JUSTICE., 1999) e serotonina (RAITERI et al., 1977).

## **1.2 Receptores associados às aminas-traços (TAARs)**

Por muito tempo, pouca atenção foi dada a essa classe de compostos pelo fato delas serem consideradas subprodutos do metabolismo ou apenas compostos sem relevância fisiológica (BERRY, 2004). No entanto, essa perspectiva mudou em 2001, após estudos conduzidos por dois grupos de pesquisa distintos apontarem a existência de uma família de receptores fisiológicos acoplados à proteína G (GPCRs) que pareciam ser ativados especificamente por ação das AT (BOROWSKY et al. 2001; BUNZOW et al. 2001). Em

estudos posteriores, Lindemann et al (2005) propôs a nomenclatura “receptores associados às amins-traço” (TAARs) para essa família de receptores. Em um trabalho também realizado por Lindemann et al (2005) eles concluíram a identificação de todos os membros dessa nova família de GPCR em ratos, camundongos, chimpanzés e humanos, identificando existir nove genes TAAR em humanos, incluindo três pseudogenes; nove genes em chimpanzés, incluindo seis pseudogenes; 19 e 16 em ratos e camundongos, com dois e um sendo pseudogenes, respectivamente (LINDEMANN et al., 2005).

No entanto, no mesmo estudo foi proposto que apenas o TAAR1 e o TAAR4 são ativados por amins-traço, sendo o TAAR1 sensível a todas as amins-traço e o TAAR4 responsivo apenas à  $\beta$ -FEA e a tiramina (e em um grau bem menor quando comparado ao TAAR1) (LINDEMAAN et al., 2005). Tanto nos estudos de Borowsky et al (2001) quanto nos de Bunzow et al (2001), foi descrito que amins clássicas, como: dopamina, noradrenalina e adrenalina, foram ineficazes ou muito menos potentes, em ativar o receptor TAAR1, com valores de  $EC_{50}$  duas ordens de magnitude maiores do que as amins-traço, indicando se o receptor em questão, o TAAR1, realmente específico para as AT (ZUCCHI et al., 2006). Por causa disso, o TAAR1 é o subtipo que tem recebido mais atenção e com mais informações a respeito da caracterização farmacológica da classe (LINDEMANN & HOENER., 2005).

Em respeito à via de sinalização, o TAAR1 é um receptor do tipo acoplado à proteína G $\alpha_s$ , o qual após ativado leva ao acúmulo de AMPc intracelular pela ativação da enzima adenilato ciclase (AC) e de canais de potássio retificadores de entrada (kir) (BOROWSKY et al., 2001; BUNZOW et al., 2001; MILLER et al., 2005; XIE et al., 2007; BRADAIA et al., 2009). PANAS et al (2012) descreveu a ativação do TAAR1 também gerar a fosforilação de PKA e PKC, ocasionando regulação para cima dos fatores de transcrição CREB e NFAT (PANAS et al., 2012). Harmeier et al (2015) descreveu outra via de sinalização para esse receptor independente de proteína G, a qual é uma via dependente de  $\beta$ -arrestina-2 envolvendo a via de sinalização da enzima GSK-3 (glicogênio sintase quinase-3), via importante em muitas ações mediadas pela dopamina (HARMEIER et al., 2015).

Dentre as AT, as que possuem maior afinidade para o receptor TAAR1 são a  $\beta$ -FEA e a tiramina, sendo a  $\beta$ -FEA mais potente, como já foi mencionado (BUNZOW et al., 2001). O TAAR1 também pode ser ativado por moléculas endógenas e exógenas, incluindo a dopamina, noradrenalina, serotonina, anfetamina, metanfetamina, derivados do ergot,



<b>Pulmões</b>	< 10	-	-	< 10	< 10	-	-	21±1	-
<b>Músculos</b>	24±33	-	-	13±2	-	-	-	14±20	-
<b>Baço</b>	< 10	-	-	93±4	-	-	-	12±2	-
<b>Estômago</b>	297±44	-	-	-	-	-	-	13±1	-
<b>Testículos</b>	1802±874	89±19	324±63	230±2	19±1	18±2	<10	763±142	12±1

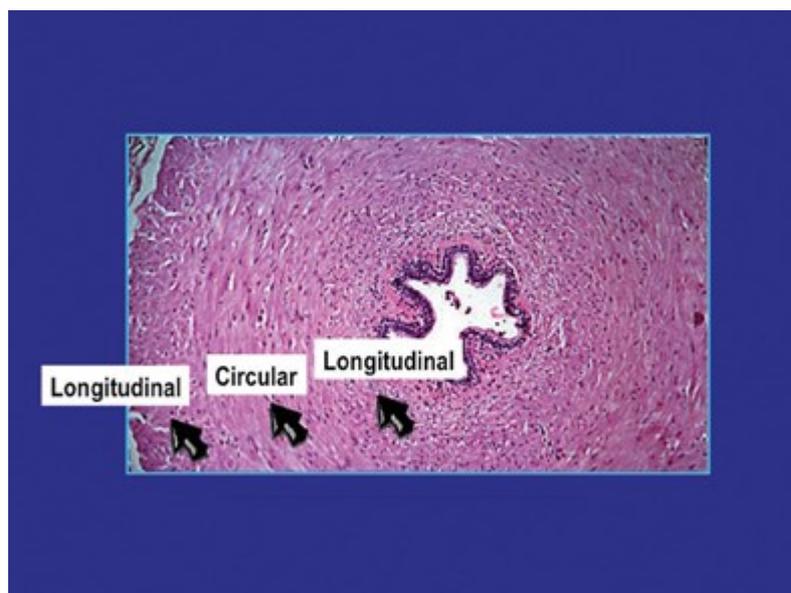
“-” significa “não detectado”. O valor “< 10” indica sinais detectados abaixo da faixa de linearidade do ensaio (10 cópias de cDNA/ µg de RNA total). Fonte: Chiellini et al., (2012)

Um dado que chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa foi a alta expressão gênica dos subtipos TAAR1 e TAAR8 em testículo de ratos e a possível existência desses receptores em outras estruturas relacionadas ao sistema reprodutor masculino.

### 1.3 Aspectos fisiológicos e farmacológicos do canal deferente

O canal deferente é uma estrutura de aspecto tubular constituída por uma camada muscular, uma mucosa interna e uma adventícia externa. A camada de músculo liso, principal parte de interesse do presente trabalho, tem espessura de aproximadamente 1-5 mm e consiste de camada muscular cercada por camadas longitudinais internas e externas (figura 2). A camada circular é mais protuberante e forma espiral bem espessa e bem definida enquanto as camadas longitudinais são formadas por feixes musculares em arranjo helicoidal. As células são acopladas eletricamente, permitindo a propagação do potencial de ação siga rapidamente de uma célula para outra (ELBADAWI & GOODMAN, 1980). O lúmen do canal deferente é revestido por células epiteliais colunares com microvilosidades. O suprimento sanguíneo é proveniente da artéria vesical inferior (DIXON et al., 1998).

**Figura 2** – Camadas musculares do canal deferente



Fonte: (KOSLOV; ANDERSSON, 2013).

A função do canal deferente é conduzir os espermatozoides do epidídimo até a uretra e a contração muscular coordenada é um fator importante para essa condução. Mecanismos adrenérgicos tem um papel fundamental na contração do canal deferente e muitas substâncias são capazes de alterar a contratilidade desse tecido, assim modulando a liberação de neurotransmissores ou modificando o tônus basal das camadas de músculo liso (KOSLOV; ANDERSSON, 2013)

O termo “ejaculação” é utilizado como sinônimo para a ejeção do sêmen, mas, na verdade, a ejaculação compreende duas fases: emissão e expulsão. A emissão, que compreende a ejeção dos espermatozoides na uretra (misturados com os fluidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias), é a primeira fase da ejaculação masculina. Trata-se de um reflexo simpático da medula espinhal (T10-L2): estímulos provenientes da genitália, essencialmente aqueles que refletem o grau de ativação de receptores sensoriais localizados principalmente na glândula do pênis (corpúsculos de Krause-Finger), são integrados no nível espinhal e estimulam a contração peristáltica das glândulas sexuais acessórias. A fase de emissão é iniciada pela contração dos canais deferentes dos testículos (Dickinson, 1949; Giuliano and Clement, 2005; Motofei and Rowland, 2005; Palmer and Stuckey, 2008; Puppò, 2011; Rowland et al., 2010). A expulsão é a segunda fase da ejaculação masculina. A bexiga e a uretra são as principais estruturas envolvidas nessa fase, juntamente com os músculos perineais, importantes para a geração de força necessária para expulsar o sêmen na forma de jato durante a ejaculação (MASTERS & JOHNSON, 1966).

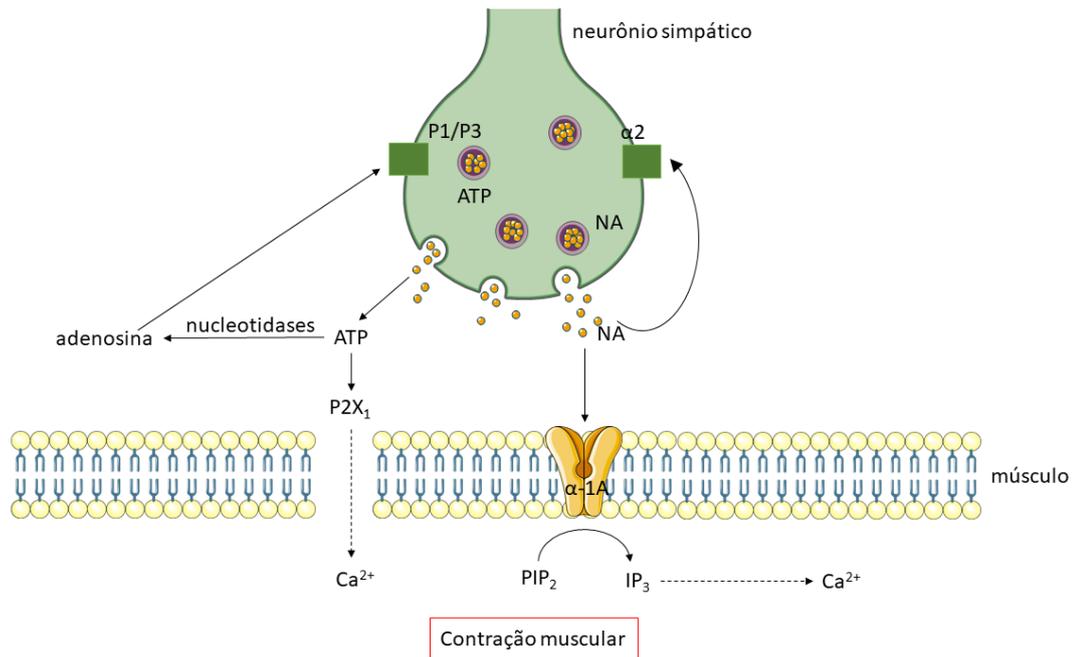
Em relação aos mecanismos efetores autonômicos, os nervos adrenérgicos

compreendem o principal grupo de fibras nervosas que suprem o canal deferente de mamíferos (DIXON et al., 1998). Kaleczyc et al. (1997) demonstraram os nervos adrenérgicos estarem distribuídos na lâmina própria e por todas as camadas circulares e longitudinais de músculo liso, sendo mais numerosos na camada muscular e ocorrendo principalmente ao longo das células musculares lisas (KALECZYC et al., 1997). Estudos demonstraram esses neurônios adrenérgicos poderem utilizar o trifosfato de adenosina (ATP) como um possível cotransmissor juntamente com a noradrenalina (NA) (ALM, 1982).

Também foram identificadas fibras nervosas colinérgicas no canal deferente, porém menos numerosas do que o componente adrenérgico e localizadas principalmente na lâmina própria (KALECZYC et al., 1997). Sjöstrand et al (1965) sugeriram que o principal papel da inervação colinérgica é suprimir a resposta adrenérgica no canal deferente. Existem evidências dos nervos colinérgicos poderem agir nas células epiteliais, sendo responsáveis pela reabsorção de fluidos do lúmen ou pela secreção ativa de certos componentes necessários para a maturação dos espermatozoides (SJÖSTRAND, 1962).

A contração do músculo liso do canal deferente (figura 3) é provocada principalmente por dois neurotransmissores: NA, especialmente através dos receptores  $\alpha 1$ -A (MINNEMAN et al., 1988; HONNER; DOCHERTY, 1999) e ATP, através de receptores purinérgicos P2X<sub>1</sub> (LIANG et al., 2000; MULRYAN et al., 2000). Outras substâncias também podem impactar a atividade contrátil do canal deferente, possivelmente através de receptores localizados no músculo liso (KOSLOV & ANDERSSON., 2013), dentre elas: carbamilcolina, que causa contração muscular através do receptor muscarínico M2 (ELTZE, 1994); vasopressina, que causa contração através de estimulação do receptor V1 (ANDERSSON et al., 1988); receptores adrenérgicos do tipo  $\beta 2$  pré e pós-sinápticos (TODOROV et al., 1991); receptores serotoninérgicos podem causar contração através dos receptores 5-HT (KÖSE et al., 2012).

**Figura 3** – Esquema do mecanismo contrátil do canal deferente



Fonte: adaptado de Westfall & Westfall (2001)

Além dos receptores  $\alpha 1A$ , o canal deferente expressa outros subtipos de receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos. A contração do canal deferente é mediada por múltiplos subtipos de receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos (BUCCIONI et al. 2009). Estes receptores incluem os subtipos  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ , e  $\alpha 1D$ , cada um com características farmacológicas e funcionais distintas (AVELLAR et al. 2009). Estudos sugerem ainda a existência de um subtipo  $\alpha 1L$  (BUCCIONI et al. 2009). O subtipo  $\alpha 1A$  é predominante na contração do músculo liso do canal deferente, embora a presença de isoformas com diferentes afinidades a antagonistas sugira que pode haver uma diversidade maior dentro do subtipo  $\alpha 1A$  (AVELLAR et al. 2009). Os subtipos  $\alpha 1B$  e  $\alpha 1D$  podem formar heterodímeros, com implicações na sua expressão e função. Os receptores  $\alpha 1$  são codificados por três genes separados (ADRA1A, ADRA1B e ADRA1D). A ativação desses receptores leva a cascatas de sinalização intracelular que resultam no aumento do cálcio intracelular e na contração muscular. Os estudos com  $\beta$ -cloroetilaminas indicam poder haver duas populações de receptores  $\alpha 1A$  no canal deferente que podem representar isoformas distintas.

Os nervos adrenérgicos desempenham um papel crucial na contração do canal deferente, liberando noradrenalina (NA) e trifosfato de adenosina (ATP) como cotransmissores (WONG et al. 2024). A liberação desses cotransmissores ocorre a partir de terminações nervosas simpáticas e resulta em resposta contrátil bifásica no músculo liso do

canal deferente (RUAN et al. 2008). O ATP, ao ativar receptores P2X<sub>1</sub>, gera contração inicial rápida e transitória, enquanto a noradrenalina, ao ativar receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, provoca contração mais lenta e sustentada. A ativação dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos também pode potencializar a contração induzida pelo ATP, demonstrando interação sinérgica entre os dois cotransmissores (WONG et al. 2024). Essa cotransmissão é fundamental para a função do canal deferente, e a sua perturbação pode levar a problemas de fertilidade masculina. Estudos mostram que a inibição dos receptores P2X<sub>1</sub> ou  $\alpha$ 1-adrenérgicos reduz a contração do canal deferente. A compreensão da dinâmica da cotransmissão entre NA e ATP é um passo importante para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos para a disfunção ejaculatória.

A ativação dos receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1A no canal deferente leva ao recrutamento dos canais de cálcio do tipo L por meio de uma cascata de sinalização intracelular complexa. Inicialmente, a ligação da noradrenalina (ou outro agonista) ao receptor  $\alpha$ 1A promove a ativação da proteína Gq/11 (Avellar et al. 2009). Essa ativação desencadeia a ativação da fosfolipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ), que catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> induz a liberação de cálcio dos estoques intracelulares do retículo endoplasmático, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). O aumento do cálcio intracelular, juntamente com a ativação da PKC, modula a atividade dos canais de cálcio do tipo L, tornando-os mais propensos a se abrir em resposta à despolarização da membrana celular (CAMPOS et al. 2003; AMOBI et al. 2010). Esse aumento do influxo de cálcio através dos canais tipo L é essencial para atingir o limiar necessário para a contração muscular. Além disso, a ativação da PKC pode fosforilar diretamente os canais de cálcio tipo L, aumentando a sua probabilidade de abertura, e promover a internalização do receptor (AVELLAR et al. 2009). Essa regulação garante a resposta contrátil do músculo liso ser proporcional à estimulação adrenérgica. A interação entre os receptores  $\alpha$ 1A e os canais de cálcio tipo L é crucial para a modulação da contratilidade do canal deferente e a perturbação dessa interação pode resultar em distúrbios na função reprodutiva masculina.

Os canais de cálcio tipo L são essenciais para a contração do canal deferente, sendo responsáveis pelo influxo de íons cálcio que ajudam a manter um nível elevado de concentração de cálcio no citosol. Eles são canais sensíveis à voltagem onde o estímulo leva a um incremento na concentração de cálcio citosólico. Isso desencadeia toda a cascata de reação envolvida na contração muscular (AMOBI et al. 2010). Os agonistas do canal de cálcio tipo L, incluindo o FPL 64176 e o Bay K 8644, podem causar a ativação do canal deferente; contudo,

os antagonistas do canal, como a nifedipina e o metoxiverapamil, causam a inibição desse efeito. Estudos demonstraram que o tônus do músculo liso do canal deferente é altamente dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  vinculante aos canais de cálcio do tipo L. Além disso, a atividade dos canais de cálcio do tipo L pode ser modulada por mecanismos intracelulares, como cascatas de sinalização envolvendo calmodulina. Portanto, esses canais representam um alvo terapêutico importante para regular a função contrátil do canal deferente, sendo que a atividade desses canais pode variar entre as camadas musculares longitudinal e circular.

#### **1.4 Disfunção contrátil do canal deferente**

A disfunção contrátil do canal deferente é clinicamente considerada quando pacientes inférteis com azoospermia apresentam espermatogênese normal confirmada mediante biópsia de testículo, sem espermatozoides observados em exame de urina pós-ejaculação e à exploração escrotal bilateral com indícios de anatomia normal sem sinais de obstrução (TILLEM & MELLINGER, 1999). Em geral, a administração de agentes agonistas adrenérgicos ajuda a restaurar o padrão contrátil do canal deferente nesses pacientes (TIFFANY & GOLDSTEIN, 1985).

A azoospermia é definida como ausência completa de espermatozoides no ejaculado e diagnosticada por pelo menos duas análises de sêmen que não revelam espermatozoides no ejaculado por microscopia de luz de alta potência (WHO, 2010). Existem três categorias de azoospermia: pré-testicular, testicular e pós-testicular. As etiologias pré-testiculares envolvem casos de hipogonadismo hipogonadotrófico. As causas testiculares referem-se à disfunção testicular primária com espermatogênese prejudicada dentro dos testículos. As etiologias pós-testiculares incluem obstruções do trato reprodutivo ao nível dos epidídimos, vasos ou ductos ejaculatórios (KAVOUSSI et al., 2024)

Ao liberar norepinefrina, o sistema nervoso simpático desempenha papel fundamental na emissão seminal. Mecanismos adrenérgicos controlam a contratilidade da cauda do epidídimo, canal deferente, próstata e vesícula seminal por meio da ativação de  $\alpha 1$ -adrenoceptores. A interferência com a função contrátil como, por exemplo, distúrbios metabólicos e medicamentos usados para distúrbios do trato urinário inferior, podem levar à disfunção ejaculatória e, por fim, anejaculação (STEERS, 1994).

Mulryan et al (2000) demonstraram que a fertilidade masculina foi reduzida em 90% em camundongos com deleção do gene do receptor purinérgico P2X1. Os receptores P2X1 são canais de cátions dependentes de ligantes presentes em várias células excitáveis, inclusive

nas células musculares lisas do canal deferente, representando um componente essencial da resposta contrátil do canal deferente à estimulação nervosa simpática, que impulsiona o esperma para o ejaculado (MULRYAN et al., 2000). Apesar de existirem indícios de que os distúrbios relacionados à motilidade do canal deferente estão correlacionados com causas de infertilidade masculina, ainda são escassos os estudos disponíveis na literatura indicando uma correlação direta entre esses fatores.

Os mecanismos que regulam o comportamento contrátil do canal deferente podem, portanto, ser de interesse como alvos para drogas destinadas ao controle da ejaculação. Além disso, esses mecanismos podem ter interesses fisiológicos / farmacológicos em geral, uma vez que o canal deferente isolado provou ser uma das preparações mais úteis para o estudo dos mecanismos fisiológicos básicos e os efeitos de diversas substâncias, tendo sido utilizado para estudar a eletrofisiologia dos miócitos da musculatura lisa e a liberação e inativação de neurotransmissores, receptores e mecanismos mediados por receptores e vias de sinalização.

## 2 JUSTIFICATIVA

A descoberta dos receptores associados às aminas-traço (TAARs) tem permitido a busca da compreensão do papel central das aminas-traço na fisiologia e fisiopatologia em tecidos de diferentes espécies. Diversos estudos têm sido conduzidos para tentar elucidar a provável via de sinalização dessas substâncias e sua potencial correlação com os receptores TAARs.

Koslov & Andersson (2013) citam em sua revisão que existem várias substâncias que podem agir na resposta contrátil do canal deferente, então é provável que ainda existam receptores ainda não identificados nesse tecido ou que os receptores já identificados possuam mais moléculas com potencial de atividade agonista ainda a ser elucidado. Desta maneira, as AT têm se mostrado serem moléculas promissoras a serem estudadas no canal deferente, principalmente depois da descoberta de seus receptores, em 2001, e da presença desses receptores no sistema reprodutor masculino de ratos e camundongos.

Importante ressaltar que o estudo de Chiellini et al. (2012) apontou o testículo como um dos tecidos que mais possuem expressão de receptores TAAR1 e TAAR8, sugerindo a possibilidade da existência de funções importantes para essas estruturas nesses órgãos (CHIELLINI et al., 2012). Estudos anteriores conduzidos no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI) abordaram as vias de sinalização de receptores TAAR em tecidos de trato gastrointestinal de ratos Wistar (BATISTA-LIMA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2021).

Com base no estudo de Chiellini et al. 2012, que apontou o testículo como um dos tecidos que mais possuem expressão de receptores TAAR1 e TAAR8, sugerindo a possibilidade da existência de funções importantes para essas estruturas nesses órgãos (CHIELLINI et al., 2012), o presente trabalho teve como objetivo principal investigar a ação das aminas-traço em tecido de canal deferente isolado de ratos e sua provável interação com receptores TAAR.

A investigação das vias de sinalização das aminas-traço em canal deferente isolado de rato pode ajudar na compreensão dos efeitos dessas substâncias endógenas na modulação das respostas que elas efetuam neste tecido, fato importante quando se leva em consideração a influência dos neurotransmissores em distúrbios associadas ao sistema reprodutor masculino, como disfunção ejaculatória e anejaculação.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar e caracterizar os efeitos farmacológicos da  $\beta$ -FEA e da octopamina e o eventual papel dos TAAR sobre a contratilidade de canal deferente isolado de ratos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar os efeitos das aminas-traço  $\beta$ -FEA e da octopamina sobre a tensão basal do canal deferente isolado de ratos;
- Investigar a participação dos TAARs sobre a resposta farmacológica das aminas-traço no canal deferente;
- Investigar se os efeitos da  $\beta$ -FEA e da octopamina estão relacionados aos mecanismos adrenérgicos do canal deferente;
- Avaliar e quantificar a expressão gênica de TAAR e de receptores adrenérgicos em canal deferente por meio de técnica de RT-PCR;
- Elucidar a expressão proteica dos TAARs em segmentos de canal deferente de ratos utilizando a técnica de Western blotting;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar (200-250g) provenientes do biotério setorial do Porangabussu “Prof. Eduardo Augusto Torres da Silva” (UFC). Os animais foram mantidos sob condições usuais de condicionamento de temperatura ambiente a  $22 \pm 2$  °C, alojados em gaiolas de polipropileno (410 x 340 x 160 mm) em grupos de cinco animais sob ciclo de 12 h claro/12h escuro, com acesso à água e comida ad libitum. Durante o alojamento, a manipulação dos animais consistiu apenas dos procedimentos necessários para troca de ração, água, limpeza e higienização das gaiolas.

Os protocolos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC sob o protocolo de nº 8056290120 (ANEXO A). Os procedimentos referentes à manipulação e eutanásia dos animais estão em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 4.2 Drogas e Soluções

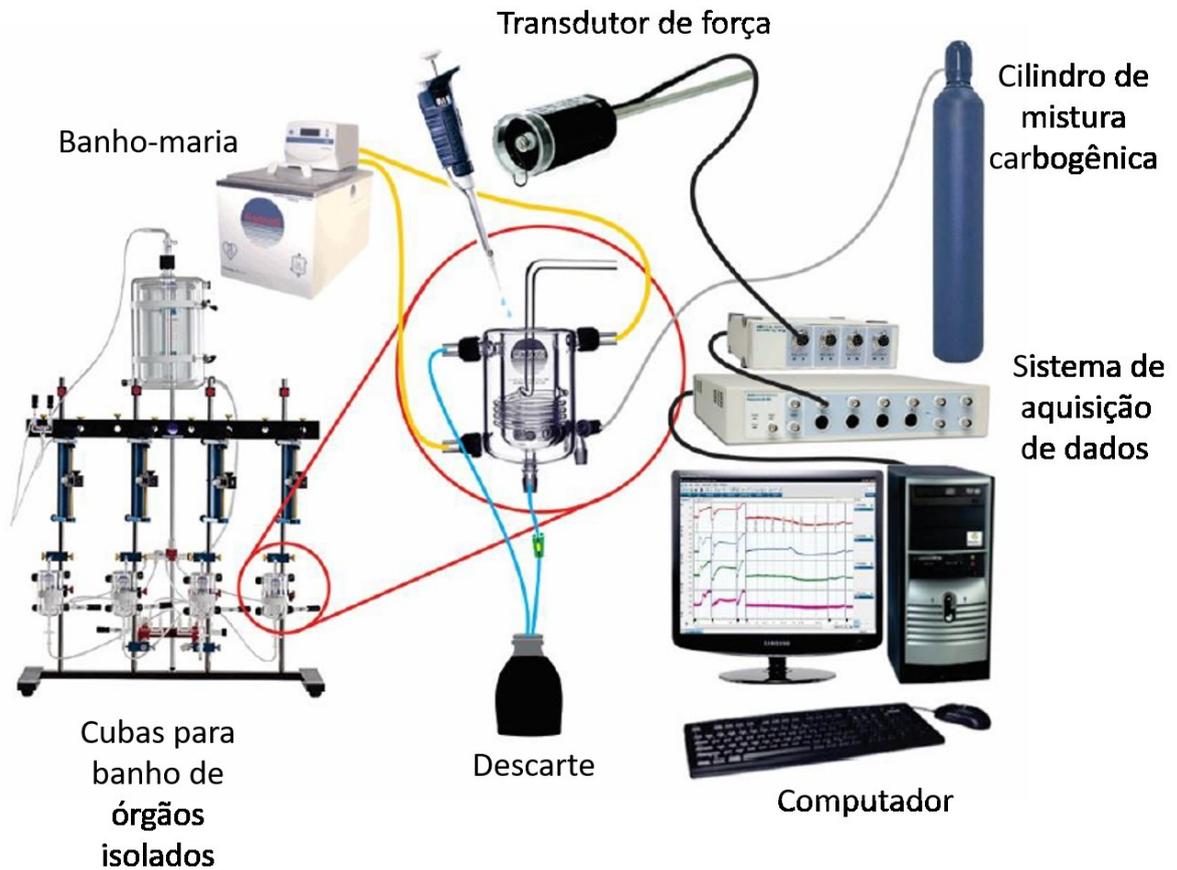
Para os procedimentos *in vitro*, foi utilizada solução de Krebs-Henseleit mantida a 37 °C com a seguinte composição: NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM e Glicose 10 mM. O pH foi ajustado para 7,4 imediatamente antes do início dos experimentos. Naqueles experimentos em que foi necessário um meio livre de cálcio, o CaCl<sub>2</sub> não foi adicionado à solução durante seu preparo e em sua substituição foi utilizado o cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>). Sais e reagentes (todos de grau analítico): 2,2,2-tribromoetanol (CAS 75-80-9), β-feniletilamina (CAS 64-04-0), octopamina (CAS 770-05-8), fenilefrina (CAS 61-76-7), prazosina (CAS 19237-84-4), nafazolina (CAS 550-99-2), fentolamina (CAS 73-05-2), nifedipina (CAS 21829-25-4) e RO-5166017 (CAS 1048346-74-2) foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) ou Merck® (Darmstadt, Alemanha). O EPPTB foi adquirido junto a empresa Tocris Bioscience® (Bristol,UK). A solubilização de cada uma das substâncias seguiu a recomendação do fornecedor.

### 4.3 Contratilidade *in vitro*

Os animais foram eutanasiados mediante uso de anestesia prévia com tribromoetanol (200 mg/kg, i.p.) e, após confirmação de que o animal estava em anestesia profunda mediante teste mecânico de pinçamento de uma das patas e ausência de reflexos, realizou-se exsanguinação pelo rompimento de vasos abdominais após laparotomia mediana.

Imediatamente após a eutanásia, o canal deferente foi cuidadosamente removido e transferido para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit.

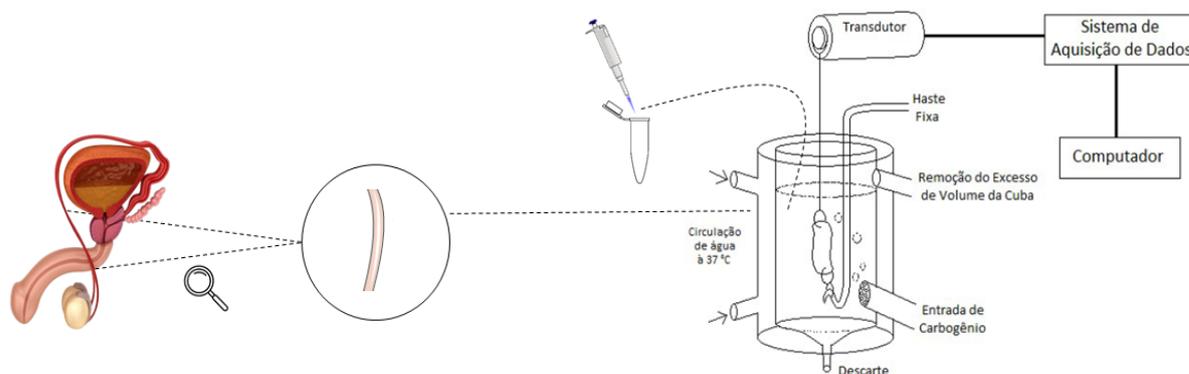
**Figura 4** – Esquema representativo do sistema para registro de contratilidade *in vitro*



Fonte: LAFARMULI

Depois de remover as estruturas adjacentes, o canal deferente, quando necessário, foi dividido em formato longitudinal nos segmentos epididimal e prostático, cada um medindo aproximadamente 1,5 cm. Em seguida, os tecidos foram atados a linhas de algodão pelas duas extremidades (figura 5).

**Figura 5** – Representação da montagem do canal deferente em sistema para banho de órgãos isolados



Fonte: adaptado de LIMA-JÚNIOR (2019)

Os tecidos foram montados em um sistema de banho para órgãos isolados (figura 4), acondicionados em câmaras de capacidade de 5 mL preenchidas por solução de Krebs-Henseleit, as quais eram constantemente aquecidas (37 °C) e aeradas por mistura carbogênica (5% CO<sub>2</sub> em 95% O<sub>2</sub>). Os tecidos amarrados à linha foram presos na extremidade inferior a uma haste fixa na câmara de banho e na extremidade superior a um transdutor de força (MLT0201, AD Instruments, Sydney, Austrália) acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/30, AD Instruments; Figura 4). Eles foram submetidos a uma pré-carga (0,5 g) para o registro isométrico da tensão basal e após um período de equilíbrio de 60 min os protocolos experimentais foram iniciados. Em alguns protocolos, os tecidos foram estimulados eletricamente com o auxílio de um estimulador de campo elétrico (modelo LE12406, Panlab, Espanha).

#### 4.4 Protocolos experimentais de contratilidade

##### 4.4.1 Construção de curvas concentração-efeito sobre a tensão de repouso do tecido

Antes de iniciar os protocolos de construção das curvas concentração-efeito, o canal deferente isolado era submetido a uma estimulação prévia com 80 mM de solução de KCl para avaliar a viabilidade tecidual. Essa contração prévia com o KCl 80 mM também foi utilizada como uma referência no momento das quantificações das respostas farmacológicas obtidas nos protocolos experimentais de contratilidade. Em alguns protocolos, o CaCl<sub>2</sub> da solução de Krebs-Henseleit foi substituído pelo BaCl<sub>2</sub>, porém os protocolos de construção da curva concentração-efeito eram os mesmos.

Após avaliar que o tecido estava responsivo a estimulação com o KCl 80 mM, a amina-traço de referência era adicionada à solução fisiológica presente na cuba de banho de órgãos. Nos protocolos do presente trabalho, as concentrações das curvas concentração-efeito eram adicionadas de maneira cumulativa, onde uma concentração era adicionada na presença da concentração anterior.

#### ***4.4.2 Avaliação do efeito inibitório de antagonistas farmacológicos***

Nos protocolos em que o objetivo era avaliar a ação de alguma das aminas-traços testadas frente a um antagonista farmacológico específico, o protocolo poderia ser desenvolvido de duas maneiras: adicionando primeiro o antagonista em uma concentração única e depois de 5 minutos era iniciada a construção da curva concentração-efeito da amina-traço na presença do antagonista. Outra maneira de desenvolver esse protocolo era estimulando o tecido com 800  $\mu$ M de  $\beta$ -FEA ou octopamina e em seguida era construída a curva concentração-efeito do antagonista farmacológico. Dessa maneira foi possível avaliar o efeito das aminas-traço em presença de antagonistas específicos.

#### ***4.4.3 Construção de curvas concentração-efeito em preparações pré-contraídas com diferentes concentrações de KCl***

Nestes protocolos, o canal deferente era submetido previamente a um estímulo com KCl na concentração de 40, 60, 80 ou 120 mM. Após o tecido atingir o platô da contração foi construída a curva concentração-efeito com concentrações cumulativas de  $\beta$ -FEA, octopamina (1 – 1000  $\mu$ M) ou NFZ (0,01 – 100  $\mu$ M).

### **4.5 Expressão gênica dos receptores adrenérgicos Adra1a e Adra1d e dos receptores TAAR1 e TAAR4**

#### ***4.5.1 Desenho dos primers para rt-PCR***

Para o desenho de primers foi utilizada a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para adquirir as sequências dos genes de interesse (Adra1a, Adra1d, TAAR1 e TAAR4) no formato FASTA. Em seguida, foi realizado o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) das sequências para avaliar a compatibilidade do alinhamento da sequência nucleotídica dos genes com o organismo de interesse. Após a análise de compatibilidade, as sequências foram compiladas em um arquivo de texto no formato FASTA.

Para desenho dos pares de primers a serem usados nas reações de qPCR para os genes Adra1a, Adra1d, TAAR1 e TAAR4 foi utilizado o software OligoPerfect Primer Designer

(ThermoFisher Scientific™).

**Tabela 2** – Sequência de *primers* utilizados na RT-PCR

Gene	Sequência
TAAR 1 (NM_134328.1)	S: ATGGCCGTTGTCGACTTTCT AS: TCGGGTTGAAGGCAGAGTTC
TAAR4 (NM_175583.1)	S: GGTCTATCGAGTCGTGCTGG AS: CAAAGTCTTGGTGGCCTTGC
Adra1a (NM_017191.2)	S: TAAGGCCATTCTGCTTGGGG AS: ACCAGAATGATGGCCAGTGG
Adra1d (NM_024483.2)	S: TGCCTCCATCCTTAGCCTCT AS: GAACCAGCACAGGACGAAGA

Desenho de primers obtidos a partir do uso da sequência consenso dos genes realizado no OligoPerfect Primer Designer. Fonte: próprio autor (2025)

#### 4.5.2 Extração do RNA total e síntese do cDNA

Após os ratos serem anestesiados e eutanasiados, foi realizada a extração dos testículos e canais deferentes. Os tecidos foram transferidos para microtubos de 2,0 mL e macerados com auxílio de bisturi. Em seguida, foram armazenados em ultrafreezer a -80°C.

As amostras foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Realizou-se um homogenato dos canais deferentes isolados de ratos, onde cada tecido foi posto em contato com uma esfera de metal e congelada em -80°C por 3 minutos. A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies). Após a finalização do processo de extração, 1µL de RNA total de cada amostra foi dosado pelo Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com a finalidade de verificar qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

O RNA total isolado armazenado a -80°C seguiu para a síntese de cDNA através do iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad®, Califórnia, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O protocolo da reação incluiu 1,0 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), 200 ng/µL de RNA extraído das amostras e completou-se o volume total até 20µL com água livre de nuclease. O protocolo padrão no termociclador iCycler® (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos) foi 25°C por 5 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min. O cDNA

sintetizado foi armazenado em freezer -20 °C até a amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

#### **4.5.3 Reação de RT-PCR**

O preparo dos reagentes foi realizado com um volume total da reação de 15 µL, compostos de 7,5 µL de GoTaq™ qPCR Master Mix (Promega™), 2,4 µL de primers senso e anti-senso (0,8 µM), 2 µL de amostra e 0,7 µL de água livre de RNase e DNase. As microplacas foram seladas e centrifugadas para serem inseridas no termociclador em Tempo Real. No termociclador, as faixas de temperaturas e o tempo de cada processo foram configurados para a desnaturação ocorrer a 95°C durante 2 minutos para ativação da enzima. Em seguida foram realizados ciclos de amplificação (45 ciclos), que correspondiam às ações de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento/extensão nas temperaturas de 60°C ou 65°C por 1 minuto. A seguir, foi realizado a curva de fusão (dissociação), onde era executado um incremento de temperatura (0,05°C a cada 5 segundos) entre as temperaturas de 60°C a 95°C.

#### **4.6 Expressão proteica dos receptores adrenérgicos TAAR1 e TAAR4 por técnica de Western Blotting**

A investigação da expressão proteica dos receptores TAAR1 e TAAR4 foi realizada por meio da técnica de Western Blotting. Após removidos dos animais, os segmentos epididimal e prostático de canal deferente e os testículos foram transferidos imediatamente para microtubos de 2 mL para serem triturados com auxílio de bisturi. Em seguida os tecidos foram pesados e congelados para posterior análise.

Para extração de proteínas, todos os segmentos de tecidos microtubos foram macerados e lisados usando tampão de RIPA (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton 1%) suplementado com Inibidor de Protease (Cat.#P8340; Sigma St Louis, MO), na proporção 1 uL de inibidor de protease:100 uL de RIPA. Em seguida, as amostras foram levadas ao vórtex por 30 segundos a cada 10 min, durante 30 min, e posteriormente centrifugadas (17 min, 13000 rpm, 4 °C). Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para um novo microtubo devidamente identificado. A concentração total de proteínas de cada amostra foi medida usando o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e os volumes foram ajustados para padronizarmos em 30 µg a quantidade de proteínas em cada amostra.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) utilizando tampão de corrida (Tris 0,25 M; glicina 1,92 M; SDS 0,1%) e depois transferidas para uma membrana PVDF (Cat.#1620177; BioRad) a 120 V por 2 h em tampão de transferência (Tris 0,25 M; glicina 1,92 M; metanol 20%). A fim de diminuir a ligação dos anticorpos a proteínas inespecíficas, as membranas foram imersas em uma solução bloqueadora de leite em pó desnatado 5% sob agitação, à temperatura ambiente por 90 min. Após decorrido esse tempo, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem TBS-T (Tris-NaCl, 1% Tween 20) e posteriormente incubadas sob refrigeração a 4 °C overnight com os seguintes anticorpos primários: TAAR1 (Cat. # PA1-41477; diluição 1:1000; Thermo Fisher Scientific) e TAAR4 (Cat.#NBP3-10140; diluição 1:1000; Novus Biologicals). O anticorpo primário  $\beta$ -actina (Cat.#A5441; diluição 1:1000; Sigma St Louis, MO) foi utilizado como proteína de referência. Após período overnight de incubação, seguiu-se com o protocolo de lavagens com tampão de lavagem TBS-T e então as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado com HRP específico (Cat.#31460; diluição 1:1000; Thermo Fisher Scientific) em temperatura ambiente por 1 h, sob agitação e proteção da luz. Decorrido o tempo, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e seguiu-se para a etapa final de revelação utilizando reagente composto por peróxido e luminol/intensificador (Clarity™ Western ECL Substrate; Cat.# 1705062; Bio-Rad Laboratories), sendo a captura das imagens feitas no sistema ChemiDoc XRS (BioRad®, EUA). As quantificações das imagens obtidas foram feitas usando o software Image Lab (BioRad®), e os resultados foram apresentados como intensidade da banda da proteína específica normalizada pelo nível de expressão da proteína de referência ( $\beta$ -actina).

#### **4.7 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) com a representação do número de observações experimentais (n). Para comparação entre os grupos foram utilizadas análise de variância (ANOVA) seguida de teste de múltipla comparação apropriadamente indicado, sendo considerado significância estatística quando probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de experimentos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito das aminas-traço $\beta$ -FEA e octopamina no tônus basal de canal deferente isolado de ratos

Após a montagem dos tecidos dentro do sistema para banho de órgãos isolados e período de estabiliza o adequado (60 min), as prepara es foram pré-contraídas pelo aumento da concentra o extracelular de  $K^+$  para 80 mM, sendo este protocolo repetido por duas vezes para avaliar a viabilidade tecidual.

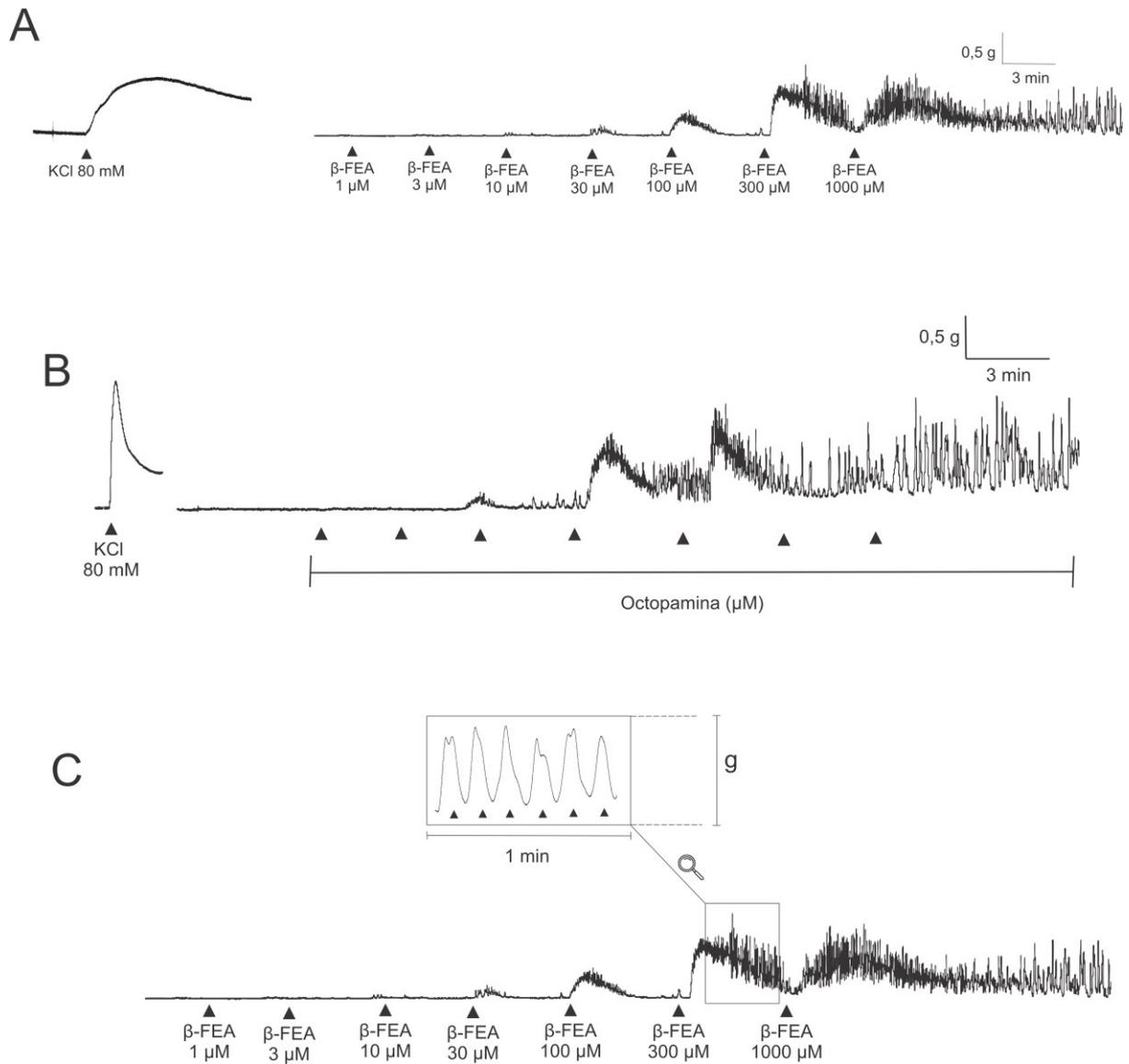
Com o objetivo de avaliar as respostas exercidas pela a o das aminas-traço no canal deferente, foram construídas curvas cumulativas de  $\beta$ -FEA e octopamina (1-1000  $\mu$ M) em prepara es isoladas mantidas inicialmente sob tônus basal. Particularidade desse tecido   a ocorrência de contra es rítmicas. Portanto, foram analisadas, além da tensão isométrica, a frequência e a amplitude das contra es f sicas. A figura 6 (A-D) mostra os traçados experimentais extraídos dos experimentos de constru o da curva concentra o-efeito de ambas as AT.

A adi o cumulativa de  $\beta$ -FEA (1 – 1000  $\mu$ M) ou octopamina (1-1000  $\mu$ M) induziu respostas teciduais contráteis, como   mostrado na figura 7. Para a  $\beta$ -FEA, o efeito contrátil foi significativo na concentra o de 1000  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey), sendo equivalente a  $50,9 \pm 4,53\%$  de uma contra o prévia com  $K^+$  80 mM (figura 7A; n=4). Para a octopamina, o efeito foi significativo a partir da concentra o 30  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey), sendo a contra o equivalente a  $15,6 \pm 4,8\%$  da contra o prévia com  $K^+$  80 mM (figura 7A; n=7). Quando o efeito contraturante das aminas-traço foi comparado entre si (figura 7A), foi observado que a octopamina   mais potente que a  $\beta$ -FEA em incitar respostas excitatórias no canal deferente (figura 7A), sendo essa diferença significativa nas concentra es de 30, 100 e 300  $\mu$ M ( $P < 0,05$  *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

A figura 7B apresenta o resultado da curva cumulativa de  $\beta$ -FEA (1 – 1000  $\mu$ M) e octopamina (1-1000  $\mu$ M) na frequência das contra es f sicas do canal deferente. As duas aminas-traço demonstraram aumento da frequência das contra es f sicas do tecido, com a  $\beta$ -FEA tendo efeito excitatório significativo a partir da concentra o de 1000  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey) (figura 7B; n=4) e a octopamina nas concentra es de 30, 100 e 1000  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey) (figura 7B, n=7). A octopamina foi capaz de evocar um aumento mais acentuado das contra es f sicas quando comparada com a  $\beta$ -FEA (figura 7B), com efeito significativo nas concentra es de 10, 30, 100 e 1000  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey).

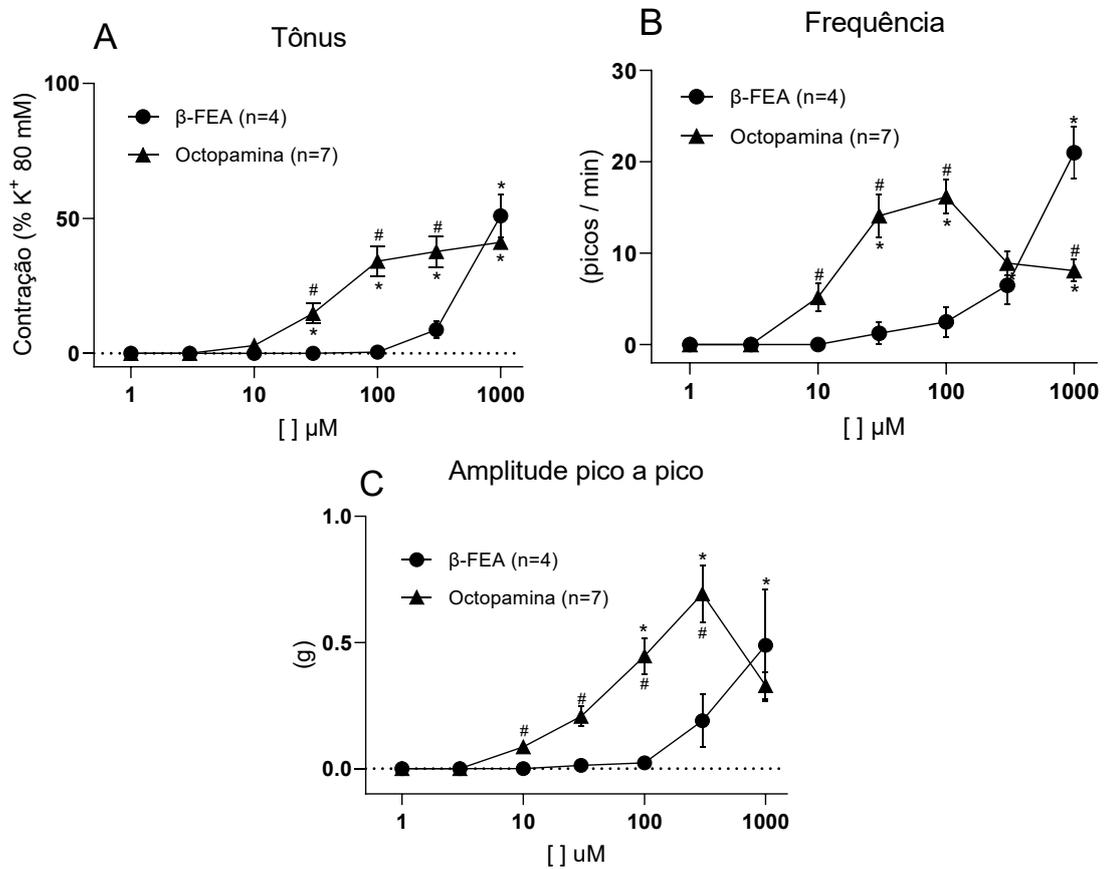
A figura 7C apresenta o resultado da curva cumulativa de  $\beta$ -FEA (n=4) (1 – 1000  $\mu$ M) e octopamina (n=7) (1-1000  $\mu$ M) sobre a amplitude pico a pico das contrações fásicas do canal deferente. A octopamina gerou aumento na amplitude dos picos nas concentrações de 100, 300 e 1000  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way ANOVA*, teste de Tukey). A  $\beta$ -FEA apresentou o mesmo efeito na concentração de 1000  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way ANOVA*, teste de Tukey). Quando comparado o efeito das duas AT sobre a capacidade de aumentar a amplitude dos picos das contrações fásicas, a octopamina também demonstrou maior efeito quando comparada à  $\beta$ -FEA, com efeito significativo nas concentrações de 10, 30, 100 e 300  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way ANOVA*, teste de Tukey) (figura 7C).

**Figura 6** – Traçados experimentais da  $\beta$ -FEA e da octopamina em canal deferente



(A-C) Traçados experimentais mostrando as curvas concentração-efeito da  $\beta$ -FEA (1 – 1000  $\mu$ M) (A) e octopamina (1 – 1000  $\mu$ M) (B) adicionadas frente ao tônus basal do canal deferente isolado. (C) Traçados experimentais da  $\beta$ -FEA (1 – 1000  $\mu$ M) demonstrando o aparecimento de contrações fásicas no tecido e a amplitude desses eventos.

**Figura 7** – Efeitos da  $\beta$ -FEA e da octopamina sobre o tônus basal em canal deferente de ratos



(A) Gráfico com os efeitos contraturantes da  $\beta$ -FEA (n=4) e octopamina (n=7) sobre o tônus basal em canal deferente isolado de ratos. As alterações na tensão de repouso foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por 80 mM de KCl. (B) Efeitos da  $\beta$ -FEA e octopamina nas contrações rítmicas do canal deferente. (C) Efeitos da  $\beta$ -FEA e octopamina sobre a amplitude das contrações rítmicas do canal deferente. n= número de experimentos. \*,  $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey. #,  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak

## 5.2 Efeito das aminas-traço $\beta$ -FEA e octopamina no tônus basal dos segmentos epididimal (EP) e prostático (PR) de canal deferente isolado de ratos.

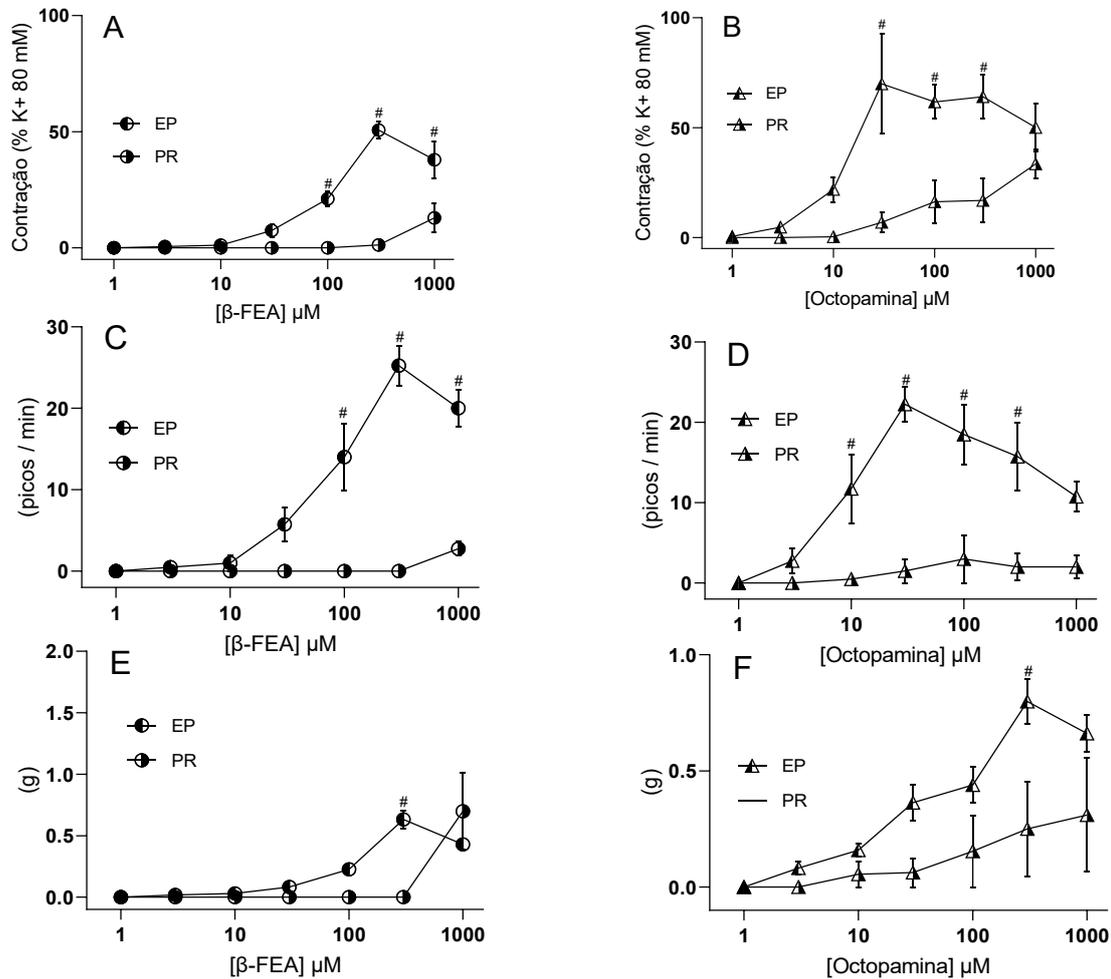
Durante a realização dos experimentos para investigar a ação das aminas-traço  $\beta$ -FEA e octopamina em canal deferente de ratos mantidos em tônus basal, foi observado que existem diferenças de resposta entre os segmentos distintos do tecido isolado., tal como foi observado nos trabalhos de MacDonald & McGrath (1980). Seguindo uma topografia com base no trajeto do canal deferente do epidídimo à próstata, os segmentos isolados mais proximais à próstata pareciam ser menos responsivos ao estímulo do que aqueles montados com os

segmentos mais próximos ao epidídimo. A partir dessa observação, vários protocolos experimentais foram executados com os segmentos identificados com a seguinte nomenclatura em termos das porções anatômicas: a porção epididimal (EP), por causa de sua proximidade do epidídimo, e a porção prostática (PR), por causa de sua proximidade anatômica da próstata e vesícula seminal.

A partir disso, foram construídas curvas concentração-efeito da  $\beta$ -FEA e octopamina (1 – 1000  $\mu$ M) frente ao tônus basal do tecido isolado nas diferentes porções, EP e PR (figura 8A), e novamente foram observadas respostas excitatórias contraturantes tanto em presença de  $\beta$ -FEA quanto de octopamina. Porém, o segmento EP (n=4) do tecido demonstrou perfil contraturante mais potente do que o segmento PR (n=4) em presença das duas amins-traço.

Para a  $\beta$ -FEA, a diferença na potência do efeito contrátil entre os segmentos (EP e PR) foi observada de maneira significativa a partir da concentração de 100  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak) (figura 8A). A  $\beta$ -FEA também causou aumento da frequência das contrações fásicas (figura 8B) de maneira mais acentuada no segmento EP, com diferença significativa em comparação com o segmento PR a partir da concentração de 100  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). A amplitude dos picos gerados nas contrações fásicas (figura 8C) demonstrou diferença significativa entre os diferentes segmentos na concentração de 300  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

**Figura 8** – Comparação dos efeitos da  $\beta$ -FEA e da octopamina nas contrações de segmentos epididimais (EP) e prostáticos (PR) de canal deferente de rato.



(A-B) Gráficos com os valores médios das respostas a concentrações crescentes de  $\beta$ -FEA (1-1000  $\mu$ M) (A) e octopamina (B) frente ao tônus basal nos segmentos EP e PR de canal deferente de ratos. As alterações na tensão de repouso foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por 80 mM de KCl. (C-D) Efeitos da  $\beta$ -FEA e octopamina nas contrações rítmicas do canal deferente em segmentos EP e PR. (E-F) Efeitos da  $\beta$ -FEA e octopamina sobre a amplitude pico a pico das contrações rítmicas dos segmentos EP e PR de canal deferente. #,  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak., EP vs PR.  $\beta$ -FEA (EP, PR; n=4); octopamina (EP, PR; n=4).

Para a octopamina (n=4), o efeito contraturante do segmento EP também foi mais potente em comparação ao segmento PR (figura 8D), com diferença significativa na resposta contrátil nas concentrações de 30, 100 e 300  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). Essa resposta mais potente do segmento EP também foi observada na frequência das

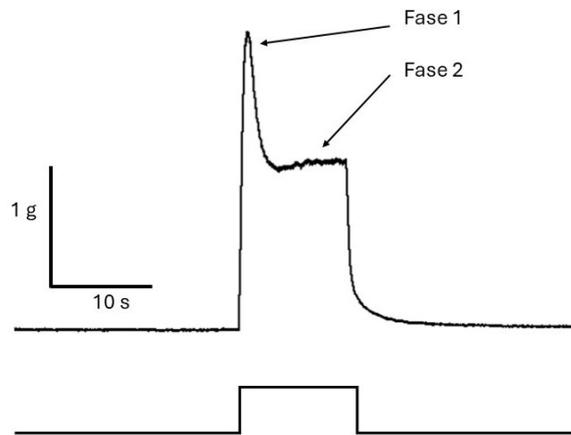
contrações fásicas (figura 8E) para a referida amina-traço, com a porção EP sendo mais responsiva nas concentrações de 10, 30, 100 e 300  $\mu\text{M}$  ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). Em relação a amplitude dos picos gerados nas contrações fásicas (figura 8F), o segmento EP só demonstrou ser mais responsivo do que o PR na concentração de 300  $\mu\text{M}$  ( $P < 0,05$  *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

### **5.3 Avaliação do efeito das AT em contrações induzidas por estimulação de campo elétrico**

Tecidos isolados em banhos de órgão, quando estimulados por ação de campo elétrico (EFS), são capazes de liberar neurotransmissores acumulados em vesículas pré-sinápticas. Para avaliar a ação das AT na estimulação por campo elétrico, foram realizados experimentos com voltagem fixa de 10 V, variando a frequência do estímulo elétrico (1 a 1000 Hz) com duração de 10s, em segmentos longitudinais de canal deferente na ausência (controle) e na presença da adição prévia de 300  $\mu\text{M}$ , faixa de concentração escolhida por ser capaz de exercer estímulo excitatório significativo para as duas AT. Inicialmente, os experimentos foram realizados em segmentos EP e PR separadamente, mas não foram observadas diferenças nas respostas mediadas pela EFS, então os resultados apresentados abaixo representam um *pool* dos segmentos de canal deferente.

Foi observado que a resposta tecidual ao estímulo elétrico ocorria em duas etapas: primeiro, surgimento de um pico de contração seguido de uma rápida e ligeira deflexão no traçado experimental. Posteriormente, a contração do tecido alcançava sua fase sustentada. A estas demos o nome de fase 1 e fase 2, respectivamente (figura 9).

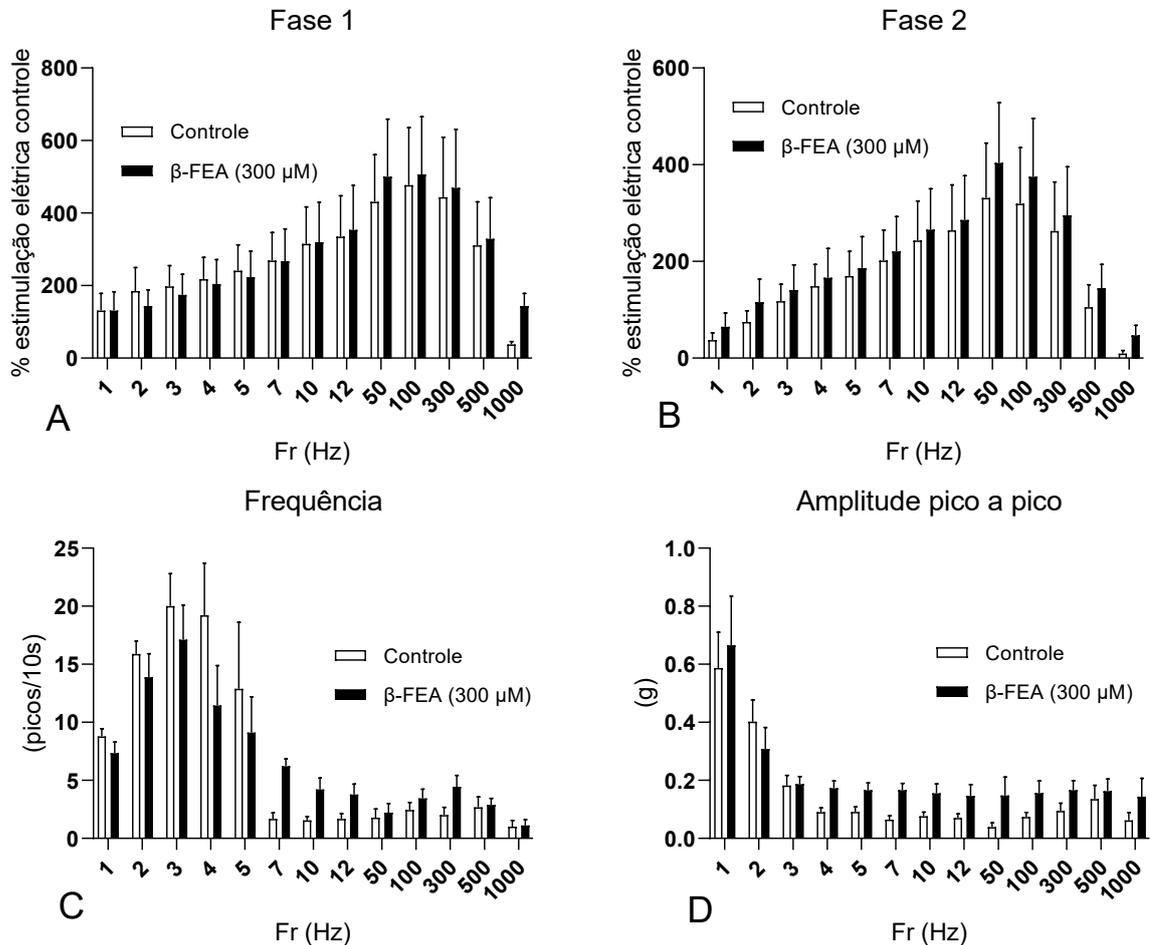
**Figura 9** – Formato da resposta contrátil causada por estimulação elétrica de campo em canal deferente de rato.



Fonte: LAFARMULI

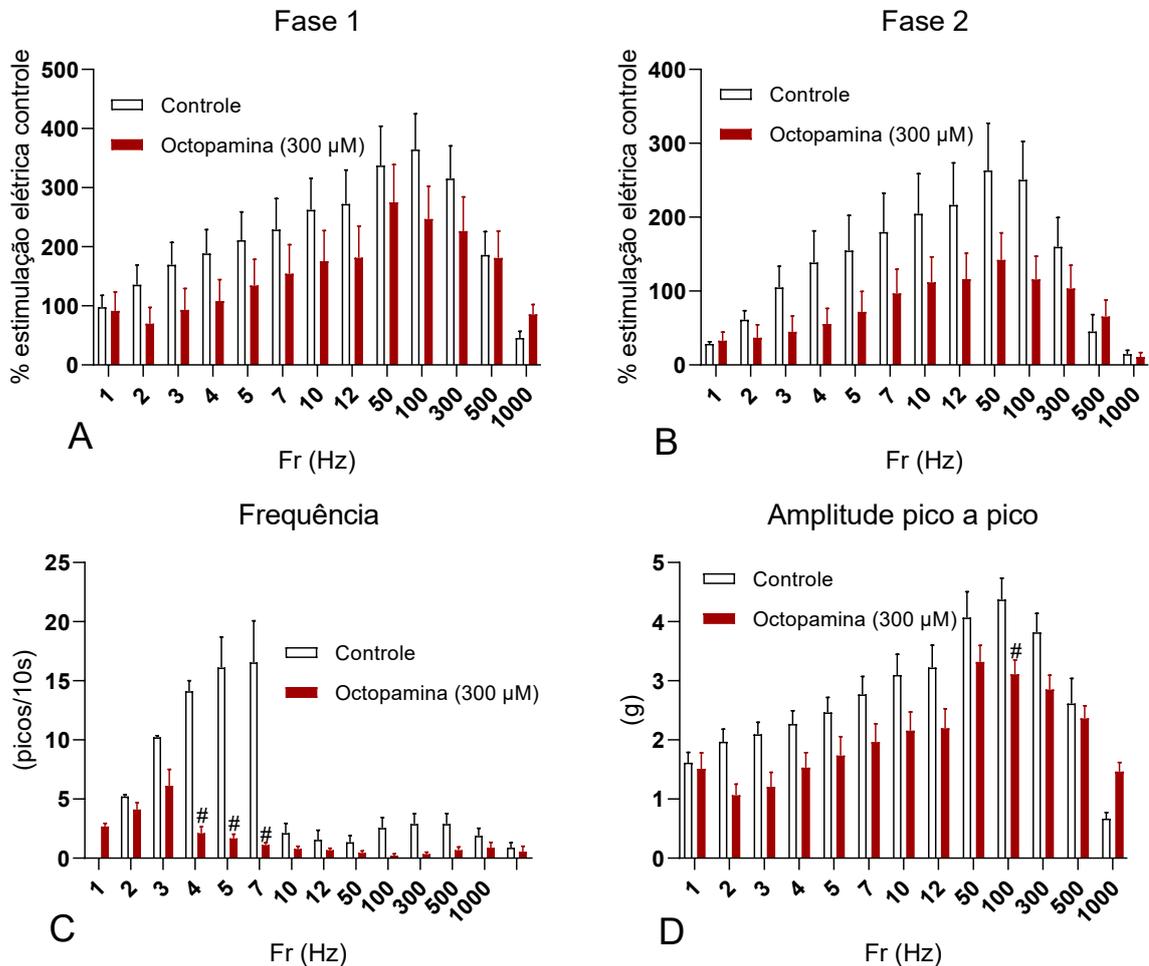
Não foram observadas diferenças significativas na contratilidade mediada pela variação da frequência do estímulo elétrico na presença de 300  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{-FEA}$  ( $n=9$ ) em comparação ao grupo controle ( $n=9$ ) (Figuras 10A e 10B). Para concentração equimolar de octopamina ( $n=9$ ; Figuras 11A e 11B) também não foi observada alteração significativa na magnitude das contrações nas fases 1 ou 2 da contração causada pelo estímulo elétrico. No entanto, foi observado que a octopamina (figura 11C;  $n=9$ ) é capaz de causar diminuição na frequência das contrações rítmicas no intervalo de 4 a 7 Hz ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). Também foi observada diminuição da amplitude pico a pico na frequência de 100 Hz para os experimentos de EFS em presença de 300  $\mu\text{M}$  de octopamina (figura 11D) ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

**Figura 10** – Efeitos da  $\beta$ -FEA nas fases da contração induzida por campo elétrico e na frequência e amplitude pico a pico das contrações rítmicas de canal deferente de rato.



(A-B) Gráficos com resultados da subtração dos picos de contração da fase 1 (A) e fase 2 (B) a cada estimulação por campo elétrico. Os dados estão expressos em percentual da estimulação controle. (C) Efeitos da  $\beta$ -FEA sobre as contrações rítmicas da fase 2 da estimulação por campo elétrico comparados ao grupo controle. (C) Efeitos da  $\beta$ -FEA sobre a amplitude pico a pico das contrações rítmicas geradas na fase 2 da estimulação por campo elétrico. Controle (n=9);  $\beta$ -FEA (300  $\mu$ M) (n=9).

**Figura 11** – Efeitos da octopamina nas fases da contração induzida por campo elétrico e na frequência e amplitude pico a pico das contrações rítmicas de canal deferente de rato.



(A-B) Gráficos com resultados da subtração dos picos de contração da fase 1 (A) e fase 2 (B) a cada estimulação por campo elétrico. Os dados estão expressos em percentual da estimulação controle. (C) Efeitos da octopamina sobre as contrações rítmicas da fase 2 da estimulação por campo elétrico comparados ao grupo controle. (C) Efeitos da octopamina sobre a amplitude pico a pico das contrações rítmicas geradas na fase 2 da estimulação por campo elétrico. #,  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak. Controle (n=9); octopamina (300 μM) (n=9).

#### 5.4 Avaliação do agonista TAAR1 (RO-5166017) em canal deferente isolado de ratos

Uma vez que as aminas-traço demonstraram efeitos próprios no canal deferente, um dos objetivos do presente estudo passou a ser avaliar se há envolvimento de receptores TAAR nas respostas destes tecidos isolados de ratos. Inicialmente, foi avaliada a resposta do RO-5166017, agonista de receptores do subtipo TAAR1. A estimulação do TAAR1 causa ativação da subunidade alfa da proteína G (Gs) e subsequente aumento na concentração de AMPc celular, promovendo relaxamento da musculatura lisa (BOROWSKY et al., 2001;

BUNZOW et al., 2001). Para avaliar a presença e o envolvimento dos receptores TAAR1 em canal deferente isolado de ratos, os tecidos foram pré-contraídos com 80 mM de KCl e no platô da resposta contrátil induzida (100% da contração do KCl 80 mM) foi construída uma curva concentração-efeito (curva controle) (n=7) do agonista TAAR1 (RO-5166017; 1 – 100  $\mu$ M). Também foi construída a curva concentração-efeito do RO-5166017 (1 – 100  $\mu$ M) na presença de 50  $\mu$ M do antagonista TAAR1 (EPPTB), sendo o antagonista adicionado à cuba de banho de órgãos após o estabelecimento do platô da contração induzida por 80 mM de KCl e após 5 minutos era iniciada a construção da curva concentração-efeito do RO-5166017 (1 – 100  $\mu$ M).

Foi observado que o RO-5166017 foi capaz de causar relaxamento na resposta contrátil induzida pelo KCl (80 mM) (figura 12) no intervalo de concentrações entre 30 e 100  $\mu$ M ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, Holm-Sidak). Na concentração de 30  $\mu$ M, o agonista TAAR1 diminuiu para  $87,6 \pm 2,67\%$  ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, Holm-Sidak) a contração do  $K^+$  80 mM. O relaxamento máximo foi obtido com 100  $\mu$ M, concentração que reduziu a contração do  $K^+$  para  $71,9 \pm 2,67\%$  ( $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, Holm-Sidak).

Por outro lado, a adição prévia do antagonista TAAR1, EPPTB (50  $\mu$ M) (figura 12), não alterou o efeito relaxante causado pelo RO-5166017 ( $P > 0,05$ , *two way* ANOVA).

**Figura 12** – Efeito relaxante do agonista TAAR1 (RO5263397) em canal deferente contraído com 80 mM KCl

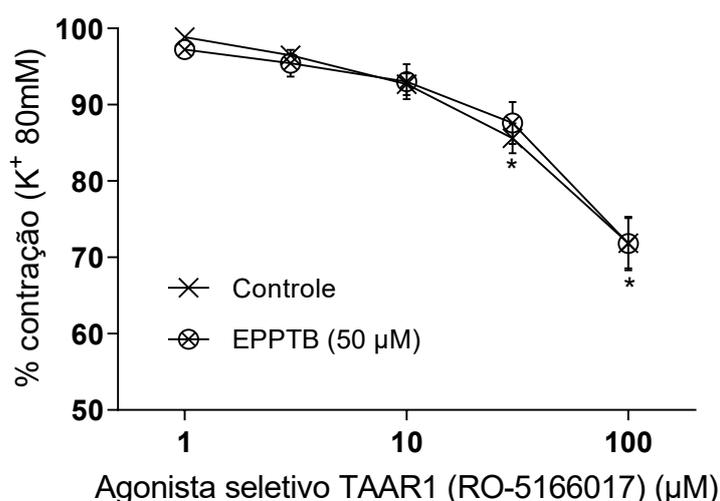


Gráfico da curva concentração-efeito do agonista TAAR1 (RO-5166017) após estabelecimento do platô da contração induzida por KCl 80 mM (100 %) em canal deferente isolado na ausência ou na presença de 50  $\mu$ M de EPPTB, antagonista de receptor TAAR1. \*,  $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey). n=7

### 5.5 Efeito da $\beta$ -FEA e octopamina em preparações de canal deferente previamente contraídas por fenilefrina (5 $\mu$ M)

O envolvimento de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos já é amplamente descrito na participação da resposta contrátil do canal deferente. Para observar qual seria o tipo de resposta recrutada pelas aminas-traço na presença de uma pré-contração com um agonista adrenérgico, foram construídas curvas concentração-efeito de  $\beta$ -FEA e octopamina após o estabelecimento do platô da contração prévia de segmentos do canal deferente na presença de fenilefrina (phe), um clássico agonista adrenérgico.

Tonicamente, as contrações induzidas por phe (5  $\mu$ M) não se configuram em contrações sustentadas em um ponto estacionário, mas em oscilações rítmicas. Considerando a resposta da phe na ausência das aminas-traço como referência, tanto a  $\beta$ -FEA (n=7) como a octopamina (n=7) foram capazes de potencializar esta resposta contrátil induzida pelo agonista adrenérgico (figura 13). Porém, embora o efeito potencializador da  $\beta$ -FEA também tenha sido observado, a octopamina dobrou a magnitude da resposta adrenérgica a partir da concentração 100  $\mu$ M ( $224,34 \pm 48,94\%$ ,  $P < 0,05$ , *two way ANOVA*, teste de Holm-Sidak).

**Figura 13** – Efeitos da  $\beta$ -FEA e da octopamina nas contrações induzidas por agonista adrenérgico (5  $\mu$ M) em canal deferente de rato.

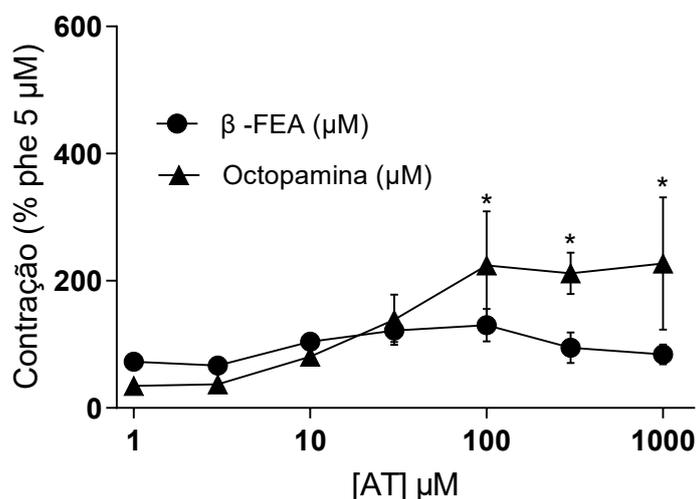


Gráfico dos efeitos da  $\beta$ -FEA e da octopamina em contrações induzidas por phe 5  $\mu$ M. Os dados estão expressos em percentual da estimulação prévia com phe 5  $\mu$ M. \*,  $P < 0,05$ , *two way ANOVA*, teste de Holm-Sidak. n=7

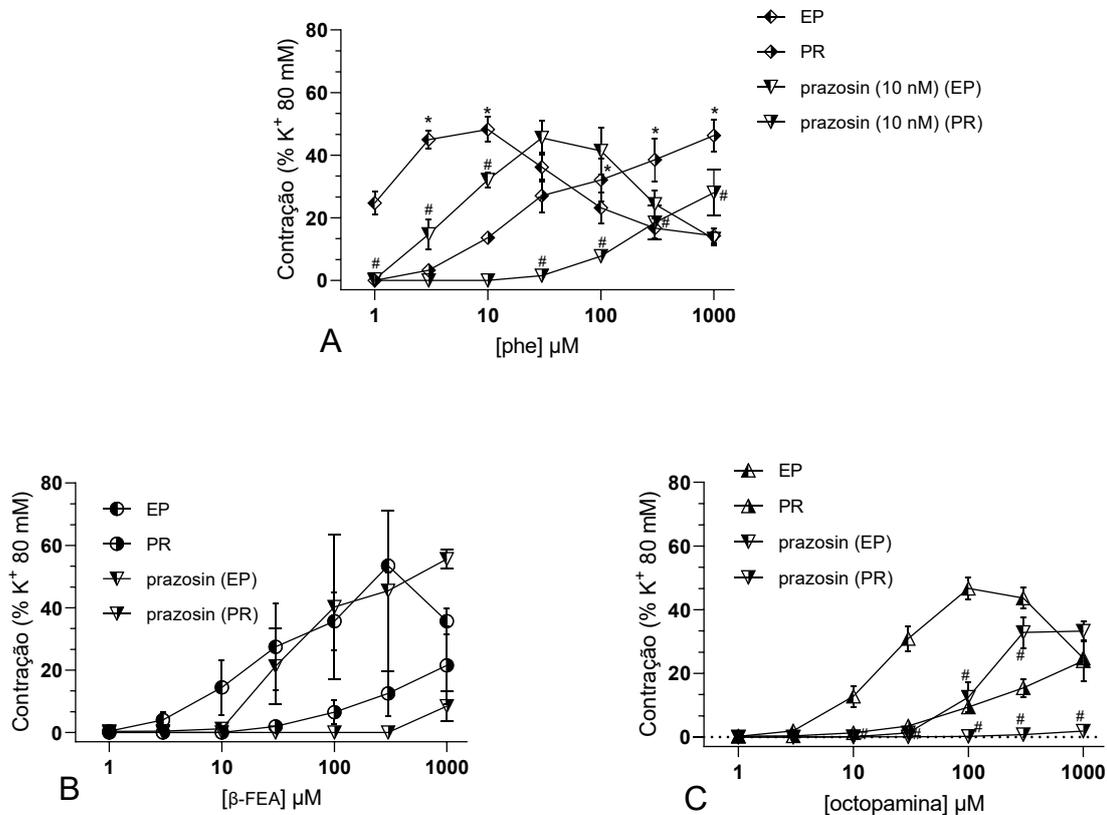
## 5.6 Avaliação do envolvimento de receptores $\alpha$ -adrenérgicos na resposta contrátil obtida nos segmentos EP e PR de $\beta$ -FEA e octopamina

Após verificar o efeito potencializador causado pelas aminas-traço em meio a uma pré-contração com o agonista adrenérgico phe (5  $\mu$ M), foi decidido verificar se há participação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos nos efeitos da  $\beta$ -FEA e octopamina.

Com o intuito de caracterizar a curva concentração-efeito reconhecidamente mediada pelo recrutamento desses receptores, foi construída uma curva de phe (1 – 1000  $\mu$ M) em segmentos EP (n=4) e PR (n=4) de preparações de canal deferente de ratos, com efeito contrátil significativo nas concentrações de 30  $\mu$ M e 10  $\mu$ M (44,9 e 48,22  $\pm$  5,42%, respectivamente, da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey) no segmento EP e a partir da concentração de 30  $\mu$ M no segmento PR (27,6  $\pm$  6,64% da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *one way* ANOVA, teste de Tukey) (figura 14A). Em seguida, foi construída outra curva concentração-efeito da phe (1 – 1000  $\mu$ M) em presença da adição prévia de prazosina (10 nM), antagonista adrenérgico  $\alpha$ -1A (figura 14A). Foi observada redução significativa do efeito contrátil, com resposta significativa nas concentrações de 1, 3 e 10  $\mu$ M para o segmento EP (0,35; 14,7 e 32,1  $\pm$  5,89%, respectivamente, da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak) e a partir da concentração de 30  $\mu$ M no segmento PR (1, 53  $\pm$  5,85% da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

Para avaliar o envolvimento dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos na contração induzida por  $\beta$ -FEA (n=8; figura 14B) e octopamina (n=6; figura 14C) nos segmentos EP e PR, foram construídas curvas concentração-efeito dessas aminas (1 – 1000  $\mu$ M) em presença de prazosina (10 nM), oportunidade em que foi observada redução significativa da resposta contrátil apenas para octopamina nos segmentos de canal deferente. Na presença de prazosina, octopamina (figura 14C) apresentou redução da resposta contraturante nas concentrações de 10, 30, 100 e 300  $\mu$ M para o segmento EP (0,06; 1,34; 12,6 e 32,9  $\pm$  3,94 %, respectivamente, da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak) e o segmento PR apresentou resposta significativa a partir da concentração de 100  $\mu$ M (0,23  $\pm$  2,93% da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

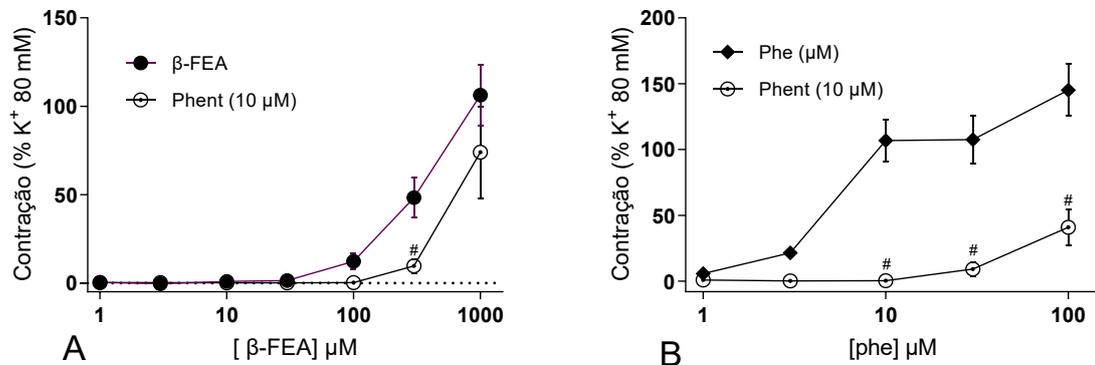
**Figura 14** – Ação dos receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1A nas contrações induzidas por phe,  $\beta$ -FEA e octopamina nos segmentos EP e PR de canal deferente de rato.



(A) Gráficos dos experimentos conduzidos com phe (1 – 1000  $\mu$ M) em segmentos EP e PR de canal deferente isolado na ausência ou presença de 10 nM de prazosina, antagonista de receptor adrenérgico  $\alpha$ -1A. \*,  $P < 0,05$ , *one-way* ANOVA, teste de Tukey, indica efeito contraturante significativo. (B-C) Gráficos dos experimentos em segmentos EP e PR conduzidos com  $\beta$ -FEA ( $n=8$ ) e octopamina ( $n=6$ ) na ausência ou presença de 10 nM de prazosina. #,  $P < 0,05$ , teste de Holm-Sidak, EP vs PR.

Também foi construída uma curva concentração-efeito da  $\beta$ -FEA (1 – 1000  $\mu$ M) em presença de 10  $\mu$ M de fentolamina (figura 15), antagonista  $\alpha$ -adrenérgico não-seletivo. Foi observado que a fentolamina (10  $\mu$ M) foi capaz de diminuir a resposta excitatória induzida pela  $\beta$ -FEA ( $n=8$ ) apenas na concentração de 300  $\mu$ M ( $9,69 \pm 13,31\%$  da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak; figura 15A). Em comparação, na curva da phe (1 – 100  $\mu$ M;  $n=7$ ), a fentolamina (10  $\mu$ M) foi capaz de inibir o efeito excitatório a partir da concentração de 10  $\mu$ M ( $0,34 \pm 26,7\%$ , da contração prévia com KCl 80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak; figura 15B) com manutenção do efeito inibitório até o término da curva da phe.

**Figura 15** – Efeito inibitório da fentolamina (10  $\mu\text{M}$ ) sobre as contrações induzidas por  $\beta$ -FEA e phe em canal deferente de rato.



(A) Gráfico da curva concentração-efeito da  $\beta$ -FEA (1 – 1000  $\mu\text{M}$ ; n=8) em canal deferente isolado na ausência ou presença de fentolamina (10  $\mu\text{M}$ ), antagonista adrenérgico não-seletivo. (B) Gráfico da curva concentração-efeito da phe (1 – 100  $\mu\text{M}$ ; n=7) na ausência ou presença de fentolamina (10  $\mu\text{M}$ ). #,  $P < 0,05$ , two way ANOVA, Holm-Sidak). n=7

Ainda para avaliar o recrutamento de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos na indução da resposta contrátil mediada pelas AT, foi construída uma curva-concentração efeito do antagonista fentolamina (1 – 30  $\mu\text{M}$ ; figura 16) em preparações previamente contraídas por 800  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -FEA (n=9) ou 800  $\mu\text{M}$  octopamina (n=7) (a concentração de 800  $\mu\text{M}$  das AT foi escolhida por ser responsável por apresentar um efeito contraturante efetivo no tecido). A adição de fentolamina foi capaz de induzir relaxamento da contração induzida por ambas as AT. Em sua concentração mais elevada (30  $\mu\text{M}$ ), a fentolamina reduziu significativamente a contração induzida por octopamina ou  $\beta$ -FEA para valores abaixo de 20% da contração controle ( $P < 0,05$ , one way ANOVA, teste de Tukey). Adicionalmente, a curva em resposta à fentolamina foi construída na presença de uma pré-contração induzida por 15  $\mu\text{M}$  fenilefrina (n=9). Foi observado que a fentolamina é capaz de diminuir de maneira significativa o efeito excitatório da fenilefrina em comparação com a resposta máxima mediada pelas aminas-traço a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $P < 0,05$  two-way ANOVA, teste de Tukey) (figura 16).

**Figura 16** – Curva concentração-efeito da fentolamina (1 a 30  $\mu\text{M}$ ) à fase estacionária da contração induzida por phe,  $\beta$ -FEA ou octopamina em canal deferente de rato.

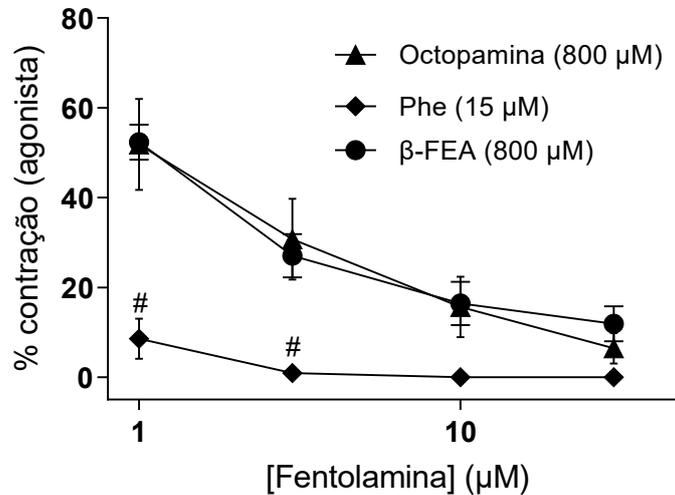


Gráfico representativo da curva concentração-efeito da fentolamina (1 – 30  $\mu\text{M}$ ) à fase estacionária da contração induzida por phe (15  $\mu\text{M}$ ; n=9),  $\beta$ -FEA (800  $\mu\text{M}$ ; n=9) ou octopamina (800  $\mu\text{M}$ ; n=7) em canal deferente de rato. #,  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

### 5.7 Avaliação do envolvimento de receptores TAAR1 em canal deferente isolado de ratos

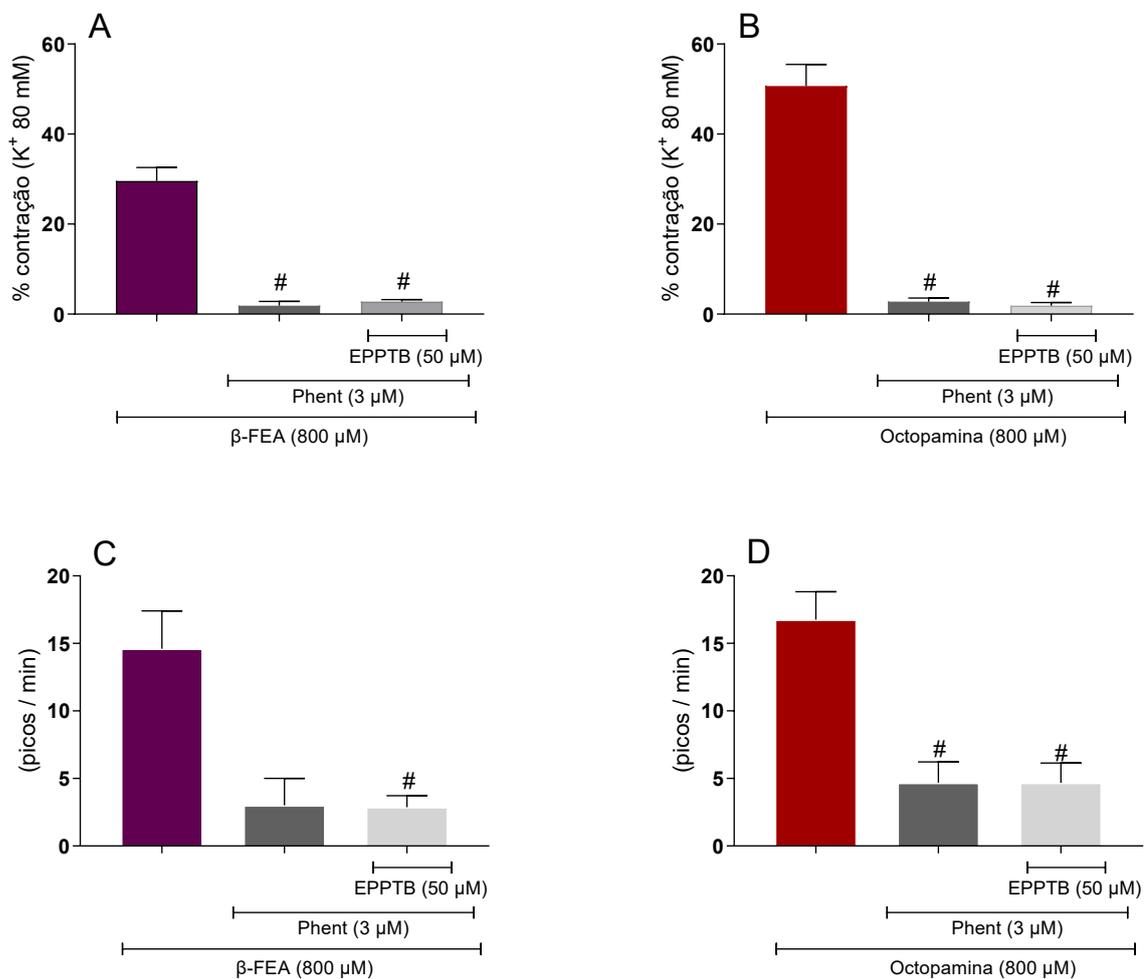
Foi observado que a utilização de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos é capaz de reduzir, ainda que não completamente, a resposta contraturante mediada pelas aminas-traço em canal deferente. Passamos, então a investigar o envolvimento de receptores TAAR na resposta mediada pela  $\beta$ -FEA e pela octopamina. Uma estratégia para avaliar esse mecanismo seria a utilização de antagonistas desses receptores, porém, os mesmos não estão disponíveis no mercado e essa foi uma limitação encontrada no desenvolvimento de alguns protocolos experimentais.

O subtipo de receptor TAAR mais bem descrito para o canal deferente é o TAAR1. O mecanismo de ação atribuído para esse receptor é através da liberação de AMPc, promovendo resposta relaxante no músculo liso (REVEL et al., 2011). Porém, nos protocolos realizados, não foi encontrada resposta relaxante das aminas-traço associadas ao canal deferente, então não faria sentido utilizar um antagonista TAAR1 diretamente sobre a curva concentração-efeito das aminas-traço. Então, decidimos verificar se o bloqueio dos receptores TAAR1 poderia ser revelado após o bloqueio prévio de receptores adrenérgicos. Para isso, foi realizado um protocolo em que o canal deferente foi pré-contraído com 800  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -FEA (n=8) ou octopamina (n=8). Após a contração atingir o platô, foi adicionado 3  $\mu\text{M}$  de fentolamina para obtenção do bloqueio adrenérgico. Após 5 minutos foi adicionado 50  $\mu\text{M}$  de

EPPTB, um antagonista de receptor TAAR1, no platô da resposta contrátil remanescente.

Como pode ser observado na Figura 17, a adição de fentolamina (3  $\mu\text{M}$ ) diminuiu de maneira significativa a contração induzida por 800  $\mu\text{M}$  de ambas as aminas-traço ( $P < 0,05$  *one-way* ANOVA, teste de Tukey). A adição de 50  $\mu\text{M}$  de EPPTB não foi capaz de diminuir a atividade inibitória remanescente causada pelo antagonista adrenérgico (figura 17)

**Figura 17** – Efeitos inibitórios da fentolamina (Phent) adicionada sozinha ou em combinação com EPPTB (50  $\mu\text{M}$ ) sobre a contração induzida por  $\beta$ -FEA (800  $\mu\text{M}$ ) ou octopamina (800  $\mu\text{M}$ ) em canal deferente de rato.



(A-B) Gráficos representativos da adição de phent (3  $\mu\text{M}$ ) à pré-contração induzida por  $\beta$ -FEA (A) ou octopamina (B), seguido da adição de 50  $\mu\text{M}$  de EPPTB, antagonista de receptores TAAR1. (C-D) Efeitos da adição de 3  $\mu\text{M}$  de phent nas contrações rítmicas do canal deferente em presença de  $\beta$ -FEA (C) e octopamina (D). #,  $P < 0,05$ , *one-way* ANOVA, teste de Tukey. n=8.

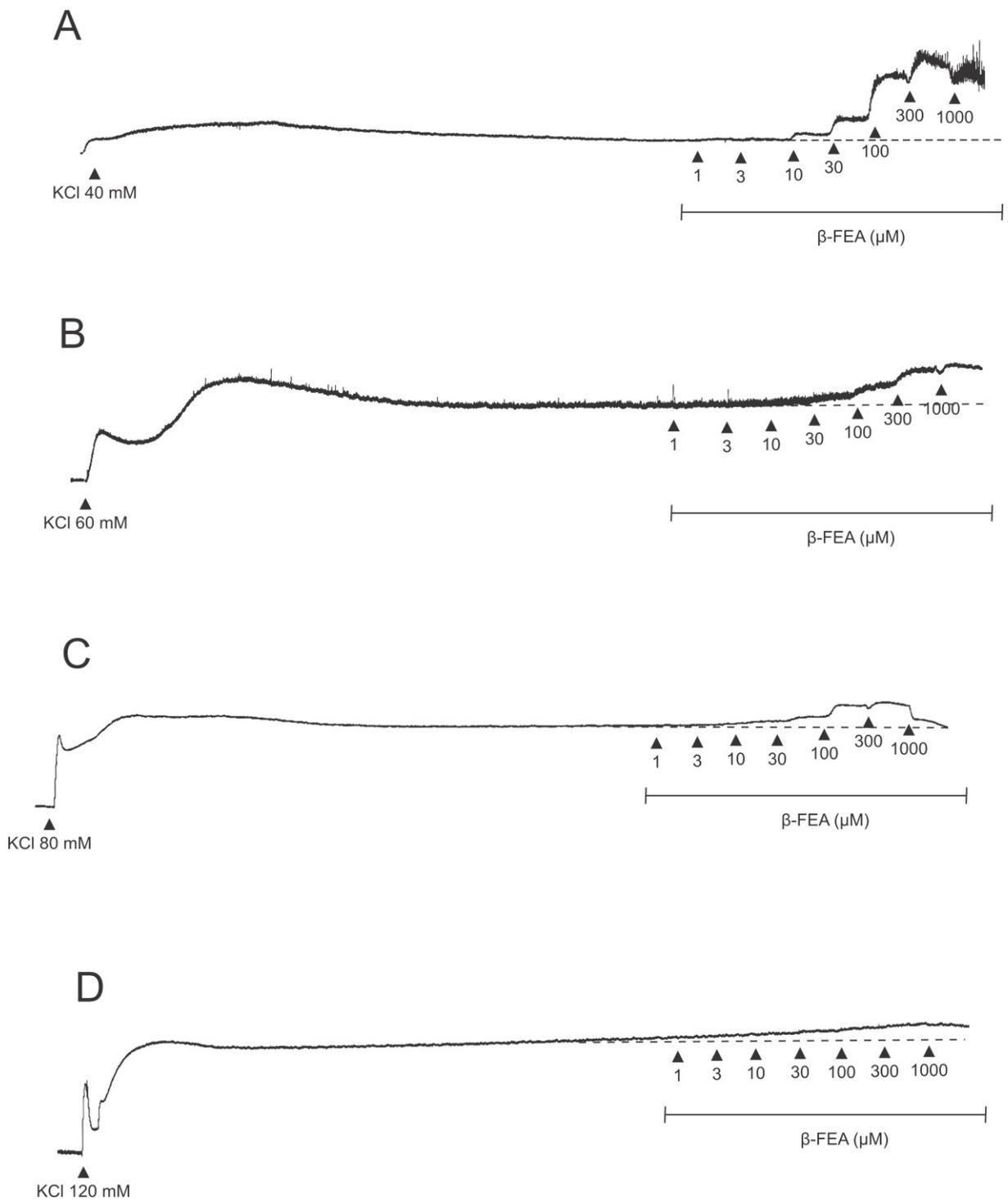
### 5.8 Avaliação do efeito da $\beta$ -FEA e octopamina em meio a diferentes concentrações de $K^+$ extracelular.

Em geral, os experimentos anteriormente descritos avaliaram a resposta das aminas-traço em preparações mantidas em tônus basal, ou seja, as preparações de canal deferente foram mantidas em meio com solução de Krebs-Henseleit contendo  $K^+$  na concentração de 5 mM. Como já descrita, foi observada ação contraturante depende de concentração tanto para a  $\beta$ -FEA quanto para a octopamina. Diante disso, foi decidida a avaliação da dependência de voltagem na resposta dessas substâncias. Para isso, protocolos experimentais foram desenvolvidos na presença de diferentes concentrações de  $K^+$  extracelular. Foram construídas curvas concentração-efeito de  $\beta$ -FEA (1 – 1000  $\mu$ M; n=10) ou octopamina (1 – 1000  $\mu$ M; n=8), adicionadas no platô de uma pré-contracção de  $K^+$ , esta induzida nas concentrações de 40, 60, 80 ou 120 mM.

Ao ser construída a curva concentração-efeito para a  $\beta$ -FEA (figura 19A) sobre uma pré-contracção de  $K^+$  40 mM, foi observado uma potenciação do efeito contraturante causado pelo agente despolarizante, com efeito significativo a partir de 100  $\mu$ M de  $\beta$ -FEA ( $499,1 \pm 42,95\%$  do platô da contracção com  $K^+$  40 mM;  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). No entanto, essa potenciação foi observada apenas na contracção induzida por  $K^+$  40 mM. Para os demais estímulos contráteis induzidos pela presença de  $K^+$  (60, 80 e 120 mM) a curva concentração-efeito em resposta à adição de  $\beta$ -FEA foi sem efeito significativo sobre a contracção induzida pelo alto teor de  $K^+$  ( $P > 0,05$ , *two-way* ANOVA).

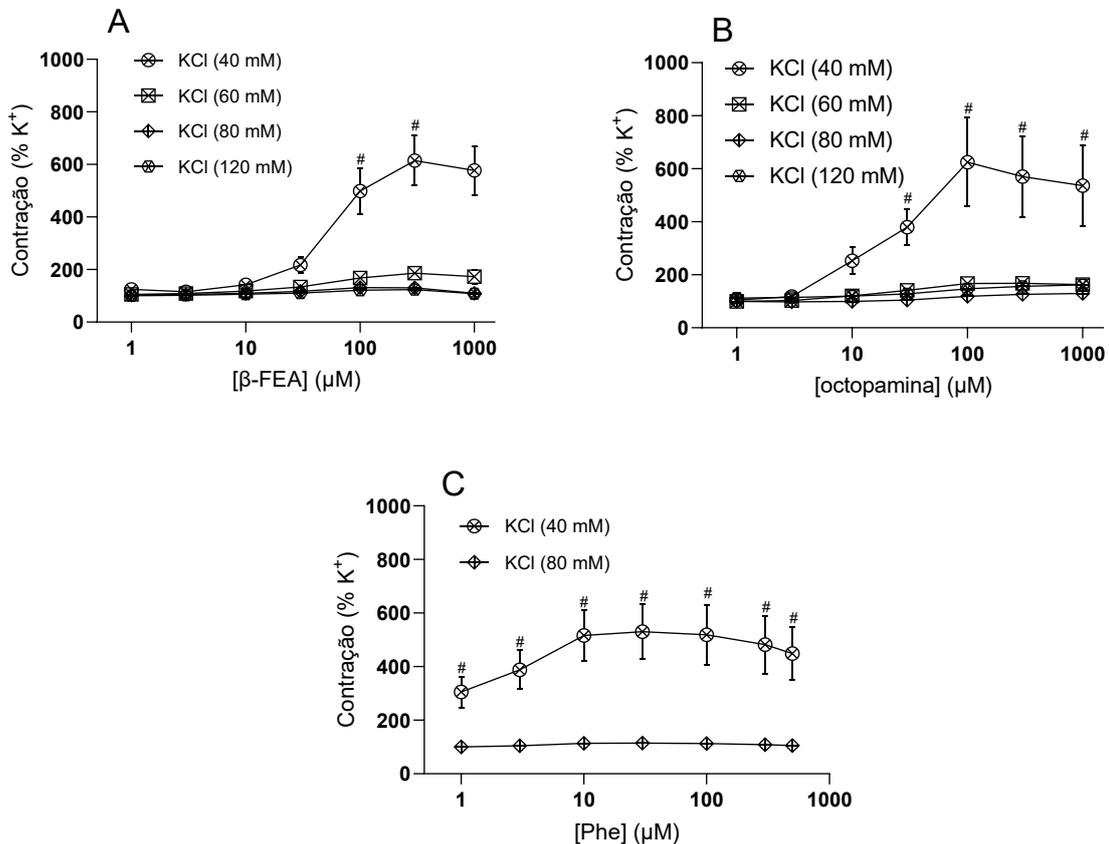
A octopamina (figura 19B) se comportou de maneira semelhante à  $\beta$ -FEA em meio a construção de curvas concentração-efeito frente a uma pré-contracção com diferentes concentrações de  $K^+$  (40, 60, 80 e 120 mM), também demonstrando potenciação da ação contraturante em presença de  $K^+$  40 mM. Porém, para a octopamina, o efeito foi significativo a partir da concentração de 30  $\mu$ M ( $379,7 \pm 54,16\%$  do platô da contracção com  $K^+$  40 mM;  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). Também de maneira semelhante à  $\beta$ -FEA, nas outras concentrações de  $K^+$  (60, 80 e 120 mM) não foram observadas alterações da resposta contrátil potássica. Teste similar foi realizado com a phe (1 – 1000  $\mu$ M; n=10), adicionada no platô da contracção induzida por 40 mM KCl, mas não quando o agente despolarizante foi usado a 80 mM.

**Figura 18** – Ações da  $\beta$ -FEA em canal deferente em meio a diferentes concentrações de  $K^+$  extracelular



Traçados experimentais mostrando o efeito da curva concentração-efeito da  $\beta$ -FEA em meio a diferentes concentrações de  $K^+$  extracelular (A:  $K^+$  40 mM; B:  $K^+$  60 mM; C:  $K^+$  80 mM; D:  $K^+$  120 mM).

**Figura 19** – Efeito da adição de concentrações crescentes de aminas traço ( $\beta$ -FEA e octopamina) e da fenilefrina no platô da contração induzida por diferentes concentrações de KCl em canal deferente de rato.



(A-C) Gráficos representativos da contração induzida por diferentes concentrações de KCl (40, 60, 80 e 120 mM) seguido da construção da curva concentração-efeito (1 – 1000  $\mu$ M) da  $\beta$ -FEA (A), octopamina (B) ou phe (C). #,  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak.  $n=10$ ,  $\beta$ -FEA;  $n=8$ , octopamina;  $n=10$ , phe.

### 5.9 Avaliação do efeito da nifedipina (10 $\mu$ M) na curva concentração-efeito da octopamina (1 – 1000 $\mu$ M) em segmentos EP e PR de canal deferente de ratos

Após observar que as aminas-traço exercem efeito excitatório sobre a pré-contração de  $K^+$ , de maneira acentuada apenas na concentração de 40 mM, e sabendo que essa resposta contrátil é mediada pela abertura de canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem (VOC) devido ao mecanismo despolarizante do  $K^+$  sobre a membrana celular, decidimos avaliar o efeito da nifedipina (10  $\mu$ M), composto bloqueador de VOC, na curva concentração-efeito de octopamina utilizando os segmentos EP e PR de canal deferente isolado.

Para o segmento EP ( $n=10$ ), a octopamina causou efeito contrátil significativamente

mais eficaz que no segmento PR (n=10) (figura 20) a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$  ( $58,7 \pm 12,72\%$  da contração prévia com  $\text{K}^+$  80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). Na presença da nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), o efeito contrátil da octopamina foi significativamente inibido a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$  ( $6,9 \pm 14,8\%$  da contração prévia com  $\text{K}^+$  80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). No segmento PR, a resposta excitatória foi menos eficaz quando comparada ao segmento EP. Ainda assim, na presença da nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), foi observado diminuição do efeito excitatório gerado pela octopamina a partir da concentração de 300  $\mu\text{M}$  ( $4,9 \pm 5,4\%$  da contração prévia com  $\text{K}^+$  80 mM  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

**Figura 20** – Efeito da nifedipina na resposta contrátil induzida por octopamina em canal deferente de rato mantido em meio extracelular contendo  $\text{Ca}^{2+}$ .

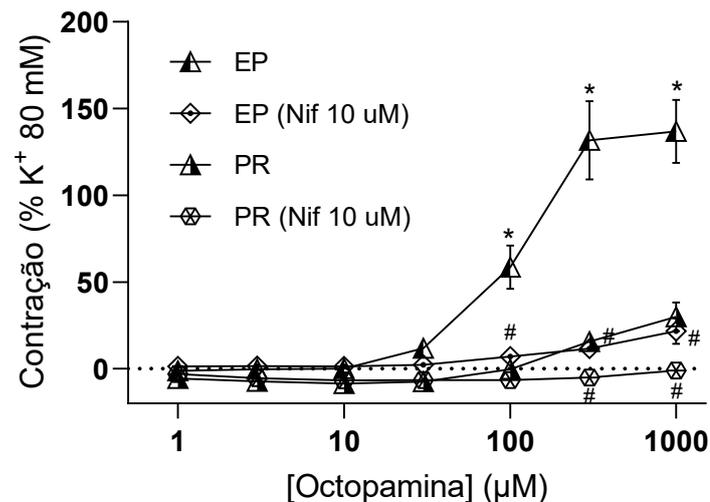


Gráfico representativo do efeito inibitório da nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador VOC, sobre a curva concentração-efeito da octopamina (1-1000  $\mu\text{M}$ ) sobre o tônus dos segmentos EP e PR de canal deferente isolado. \*,  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak, EP vs PR. #,  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak, EP/PR vs nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ). n=10.

O mesmo protocolo experimental foi avaliado em meio a solução de Krebs-Henseleit contendo  $\text{Ba}^{2+}$  em substituição ao  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 21). A intenção da substituição dos íons foi avaliar o envolvimento da abertura de canais VOC na resposta contrátil mediada pela octopamina em canal deferente. Em meio contendo  $\text{Ba}^{2+}$ , a octopamina também foi capaz de induzir resposta contrátil nos segmentos EP e PR do canal deferente isolado de ratos, porém de magnitude inferior quando comparada aos experimentos em meio de solução contendo

$\text{Ca}^{2+}$ . Após a adição de nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), foi observada diminuição da resposta contraturante induzida pela octopamina em ambos os segmentos (EP e PR), com efeito inibitório significativo nas concentrações de 100 e 300  $\mu\text{M}$  no segmento EP ( $0 \pm 0,028$  % da contração prévia induzida pelo  $\text{K}^+$  80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak) e 300 e 1000  $\mu\text{M}$  no segmento PR ( $0 \pm 0,029$  % da contração prévia induzida pelo  $\text{K}^+$  80 mM;  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

**Figura 21** – Efeito da nifedipina na resposta contrátil induzida por octopamina em canal deferente de rato mantido em meio extracelular contendo  $\text{Ba}^{2+}$  como substituto ao  $\text{Ca}^{2+}$ .

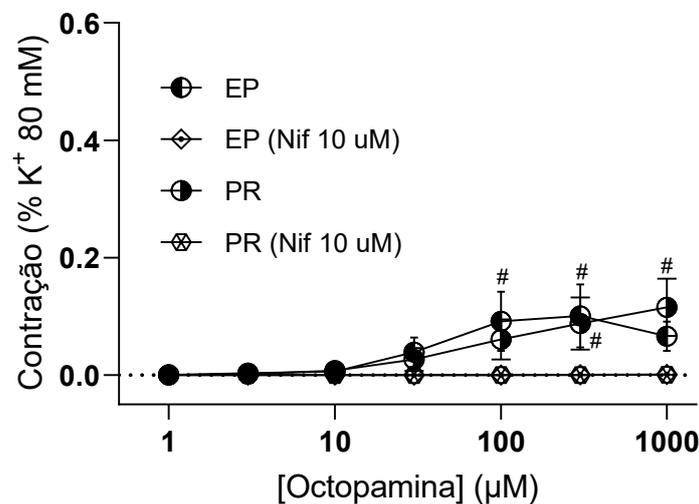


Gráfico representativo da curva concentração-efeito da octopamina (1-1000  $\mu\text{M}$ ) em presença ou ausência de nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ) em segmentos EP e PR de canal deferente isolado. Os experimentos foram realizados em meio extracelular contendo  $\text{Ba}^{2+}$  em substituição ao  $\text{Ca}^{2+}$ . #,  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak.  $n=5$ .

### 5.10 Avaliação da resposta basal da nafazolina (NFZ) em segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos.

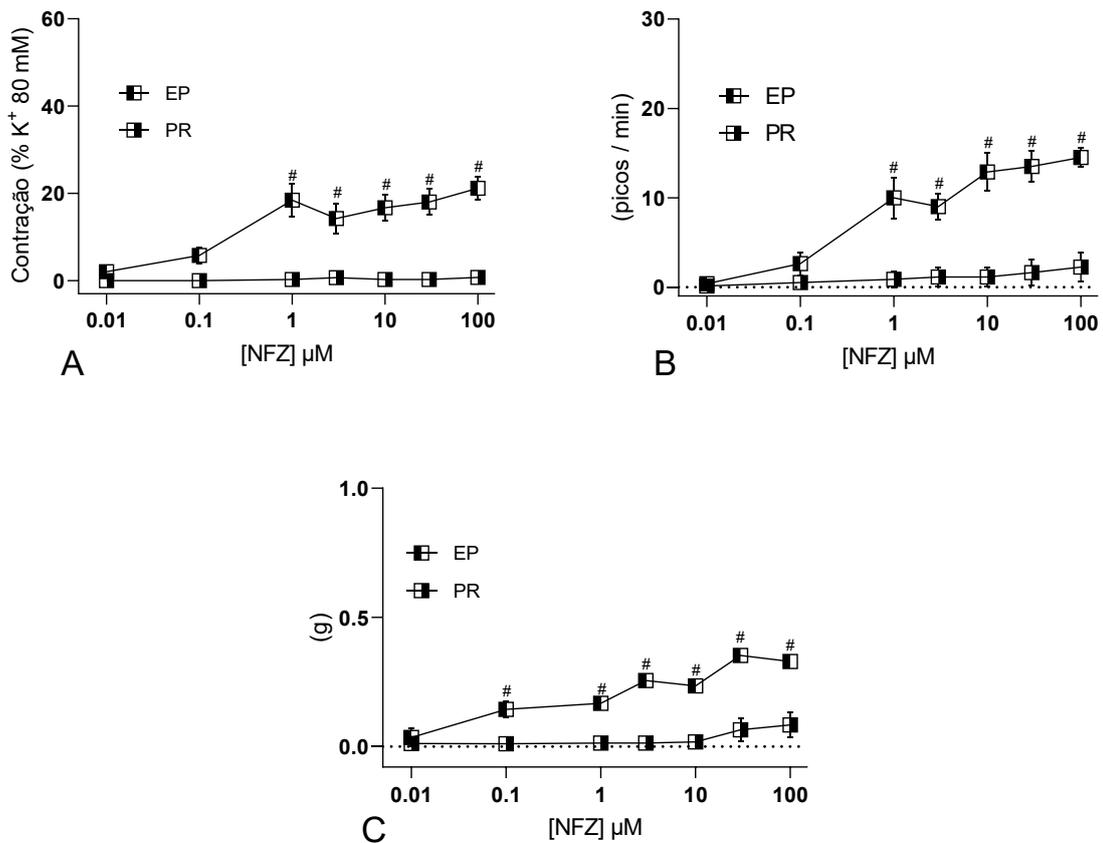
A NFZ, apesar de amplamente utilizada como agonista adrenérgico, tem como alvo farmacológico para a espécie *Rattus norvegicus* o receptor TAAR4 (STÄUBERT *et al.*, 2010). Com a finalidade de avaliar o recrutamento de receptores TAAR4 na resposta dos segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos, foram construídas curvas concentração-efeito de NFZ (0,01 – 100  $\mu\text{M}$ ) frente ao tônus basal do tecido isolado.

O segmento EP ( $n=8$ ) obteve resposta contraturante mais acentuada em comparação a segmento PR ( $n=8$ ) a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $18,4 \pm 2,84\%$  da contração prévia com

$K^+$  80 mM.  $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak, figura 22A). A figura 22B apresenta o resultado da curva cumulativa de NFZ (0,01 – 100  $\mu$ M) na frequência das contrações fásicas do canal deferente isolado de rato. O aumento da frequência das contrações fásicas foi observado apenas no segmento EP, sendo este efeito significativo a partir da concentração de 1  $\mu$ M em comparação ao segmento PR ( $P < 0,05$ , *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

A figura 22C apresenta o resultado da curva cumulativa de NFZ (0,01 – 100  $\mu$ M) sobre a amplitude dos picos das contrações fásicas dos segmentos EP e PR. Essa resposta excitatória também foi observada apenas no segmento EP, sendo este efeito significativo a partir da concentração de 0.1  $\mu$ M em comparação ao segmento PR ( $P < 0,05$  *two way* ANOVA, seguido de teste de Holm-Sidak).

**Figura 22** - Efeitos contráteis da NFZ sobre o tônus basal em canal deferente de ratos



(A) Gráfico com os efeitos contráteis NFZ (0,01 – 100  $\mu$ M) sobre o tônus basal em canal deferente de ratos. As alterações na tensão de repouso foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por 80 mM de KCl. (B) Efeitos da NFZ nas contrações rítmicas do canal deferente. (C) Efeitos da NFZ sobre a

amplitude das contrações rítmicas do canal deferente. #,  $P < 0,05$  EP vs PR, *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak.  $n=8$

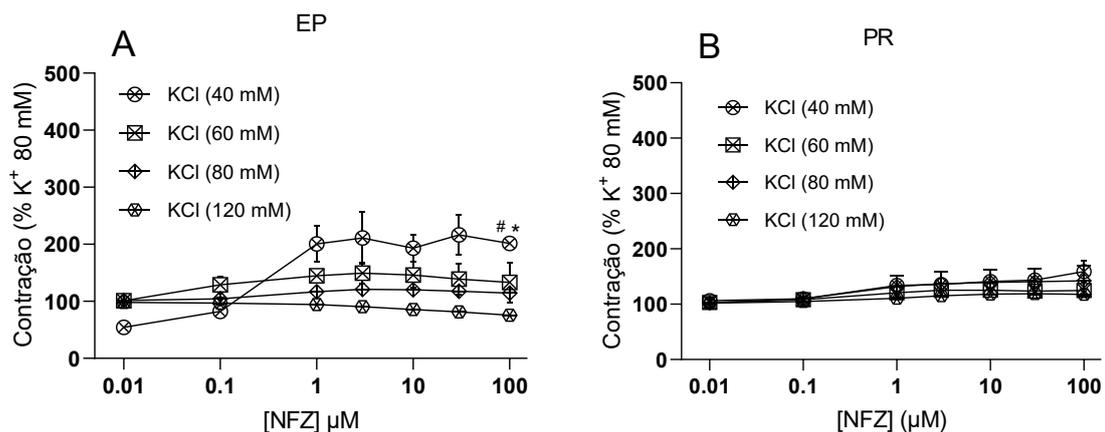
### 5.11 Avaliação do efeito da NFZ (0.01 – 100 $\mu\text{M}$ ) na presença de diferentes concentrações de $\text{K}^+$ extracelular.

De maneira semelhante ao que foi feito com a  $\beta$ -FEA e octopamina, foi decidido avaliar a resposta da NFZ na presença de diferentes concentrações de  $\text{K}^+$  extracelular. Foram construídas curvas concentração-efeito de NFZ (0,01 – 100  $\mu\text{M}$ ), utilizando os segmentos EP e PR, frente a uma pré-contração de  $\text{K}^+$  nas concentrações de 40, 60, 80 e 120 mM.

No segmento PR, figura 23B, foi observada manutenção da resposta contrátil exercida pela pré-contração com as diferentes concentrações de  $\text{K}^+$  extracelular, mas em nenhuma delas foi observada potenciação ou relaxamento da contração pré-estabelecida ( $P > 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak).

No segmento EP, figura 23A, foi observado aumento da atividade contrátil na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de NFZ quando pré-estimulada com  $\text{K}^+$  40 mM em comparação a esse mesmo ponto da curva (100  $\mu\text{M}$ ) quando pré-estimulado com  $\text{K}^+$  80 mM. O mesmo efeito foi observado para essa mesma concentração de NFZ quando estimulado com  $\text{K}^+$  40 mM em comparação a pré-estimulação com  $\text{K}^+$  120 mM.

**Figura 23** - Efeito da adição de concentrações crescentes de NFZ no platô da contração induzida por diferentes concentrações de KCl em canal deferente de rato.



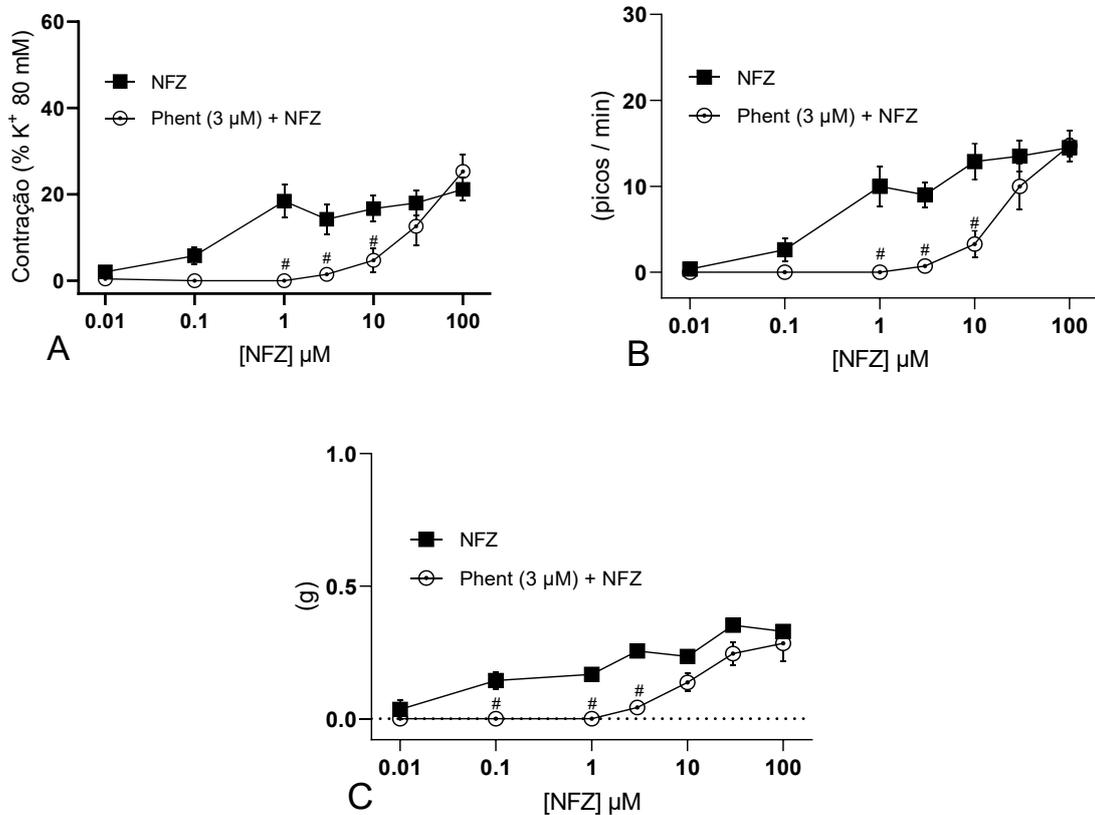
(A-B) Gráficos representativos da contração induzida por diferentes concentrações de KCl (40, 60, 80 e 120 mM) seguido da construção da curva concentração-efeito da NFZ. #,  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak.  $n=4$ . EP: # = 40 vs 80 mM / \* = 40 vs 120 mM

### **5.12 Avaliação do envolvimento de receptores $\alpha$ -adrenérgicos na resposta contrátil obtida no segmento EP em presença de NFZ**

Atualmente não há nenhum antagonista de receptores TAAR4 disponível no mercado. Então não foi possível avaliar o recrutamento desse receptor na resposta contrátil mediada pela NFZ em segmento de canal deferente isolado de ratos. Então, de maneira semelhante ao que foi feito para as aminas-traço ( $\beta$ -FEA e octopamina), decidimos avaliar se a resposta contraturante exercida pela NFZ no segmento EP poderia envolver o recrutamento de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, visto que essa substância também é descrita como agonista desses receptores. Os experimentos descritos a seguir foram realizados apenas no segmento EP pelo fato dele ter sido o único segmento que demonstrou resposta tecidual significativa na presença da NFZ.

Para este protocolo, foi adicionada phent (3  $\mu$ M), antagonista adrenérgico não-seletivo, e após 5 minutos foi iniciada a construção da curva concentração-efeito da NFZ (0,01 – 100  $\mu$ M). A phent (3  $\mu$ M) foi capaz de inibir a resposta contraturante da NFZ nas concentrações de 1, 3 e 10  $\mu$ M (0; 1,48 e 4,8  $\pm$  3,8%, respectivamente, da contração prévia com K<sup>+</sup> 80 mM. P < 0,05 *two way* ANOVA, teste de Holm-Sidak). A partir da concentração de 30  $\mu$ M, o efeito contrátil da NFZ foi capaz de sobrepor a ação inibitória do antagonista adrenérgico (figura 24A).

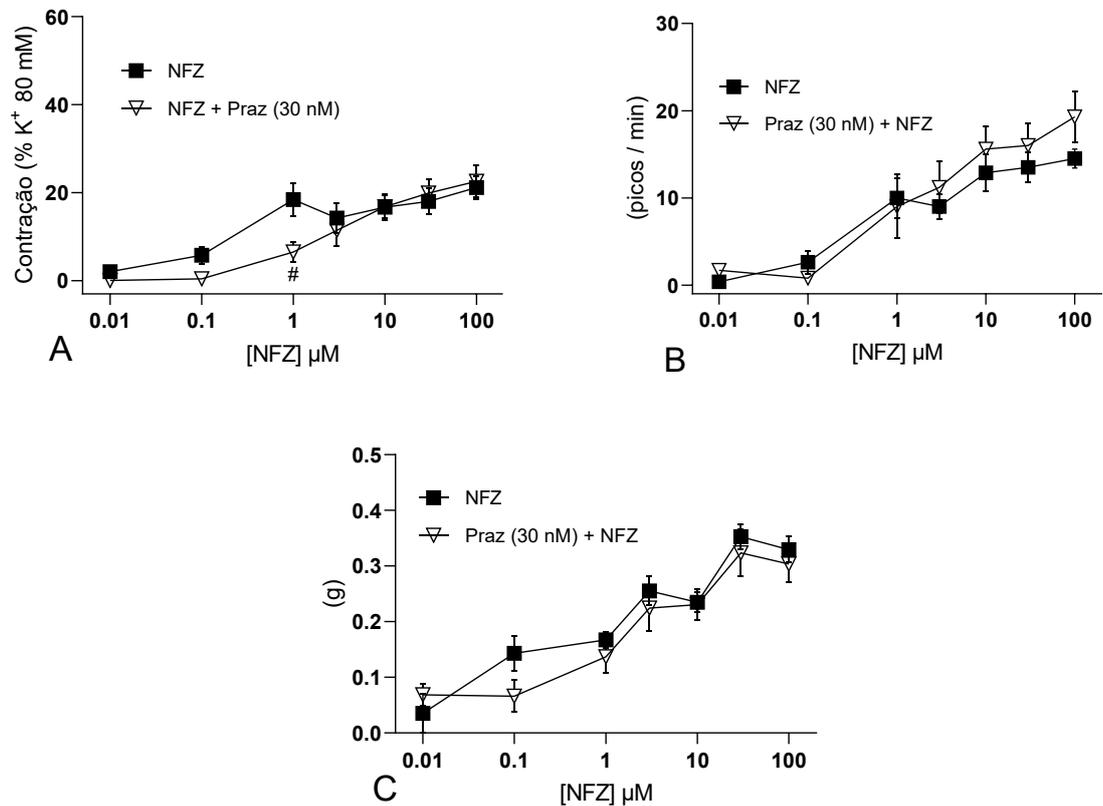
**Figura 24** – Ação do antagonista  $\alpha$ -adrenérgico não-seletivo sobre as contrações induzidas por NFZ em canal deferente de rato



Gráficos dos experimentos conduzidos em segmentos EP de canal deferente isolado na ausência ou presença de 3  $\mu$ M de phent, antagonista não-seletivo de receptores adrenérgicos. (A) Alterações na tensão de repouso. (B) Efeito inibitório da phent sobre as contrações rítmicas exercidas pela NFZ; (C) Efeito inibitório da phent sobre a amplitude das contrações rítmicas do canal deferente. #,  $P < 0,05$ , NFZ vs phent 3  $\mu$ M, *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak,  $n=8$

Também foi feita a curva concentração-efeito da NFZ (0,01 – 100  $\mu$ M) na presença de 30 nM de prazosina ( $n=10$ ), antagonista específico para receptores do subtipo  $\alpha$ -1A (figura 25). Foi observado diminuição do efeito contraturante apenas na concentração de 1  $\mu$ M ( $6,5 \pm 3,9\%$  da contração prévia com  $K^+$  80 mM.  $P < 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak) para este protocolo. Não foram observadas alterações de resposta na frequência das contrações fásicas e nem na amplitude dos picos das contrações fásicas.

**Figura 25** – Efeito do antagonista adrenérgico  $\alpha$ -1A sobre as contrações induzidas por NFZ em canal deferente de rato



Gráficos dos experimentos conduzidos em segmentos EP de canal deferente isolado na ausência ou presença de 30 nM de prazosina, antagonista específico para receptores do subtipo  $\alpha$ 1A. Painel. (A) Efeitos excitatórios da NFZ em presença de prazosina (30 nM). (B) Efeitos da prazosina sobre as contrações rítmicas exercidas pela NFZ. (C) Efeito da prazosina sobre a amplitude das contrações rítmicas do canal deferente. #,  $P > 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak.  $n=10$ .

### 5. 13 Avaliação do EPPTB (50 $\mu$ M) na curva concentração-efeito da NFZ (0.01 – 100 $\mu$ M)

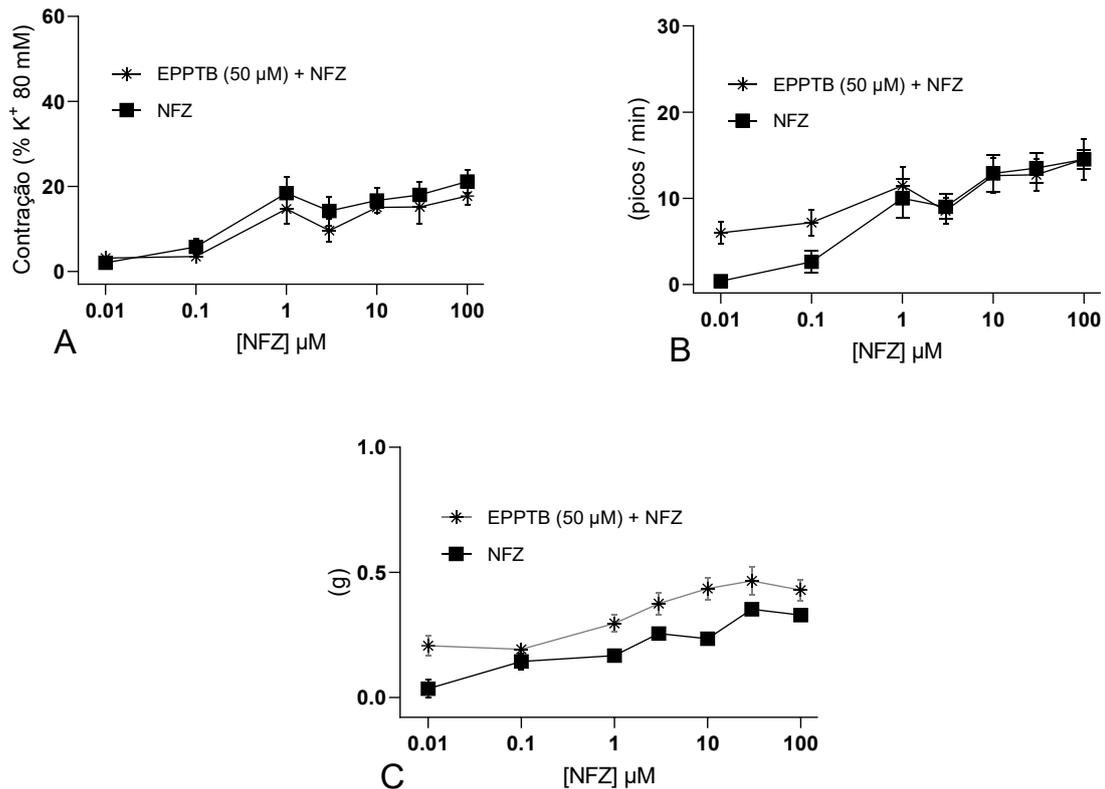
Apesar do EPPTB ser reconhecidamente um antagonista TAAR1, em um estudo realizado utilizando artérias mesentéricas isoladas de ratos, Koh et al (2019) sugeriram a hipótese de que esse antagonista, quando utilizado em concentrações mais altas, pode interagir com outros subtipos de TAAR.

Com o intuito de avaliar qual seria a resposta de um antagonista de receptor TAAR na resposta induzida pela NFZ em canal deferente, foram construídas curvas concentração-efeito da NFZ (0,01 – 100  $\mu$ M) em presença de 50  $\mu$ M de EPPTB ( $n=11$ ).

O EPPTB não foi capaz de inibir a resposta contraturante induzida pela NFZ no

segmento EP em nenhuma concentração da curva concentração-efeito (figura 26A). Também não houve alteração da frequência das contrações fásicas (figura 26B) induzidas pela NFZ e nem na amplitude do pico (figura 26C) dessas contrações.

**Figura 26** – Efeito do EPPTB (50  $\mu\text{M}$ ) sobre as contrações induzidas por NFZ em canal deferente de rato



Gráficos dos experimentos conduzidos em segmentos EP de canal deferente isolado na ausência ou presença de 50  $\mu\text{M}$  de EPPTB, antagonista de receptores TAAR1. (A) Efeitos excitatórios da NFZ em presença de EPPTB. (B) Ausência de efeito inibitório do EPPTB sobre as contrações rítmicas exercidas pela NFZ. (C) Ausência de efeito inibitório do EPPTB sobre a amplitude das contrações rítmicas do canal deferente.  $P > 0,05$ , *two-way* ANOVA, teste de Holm-Sidak.  $n=11$ .

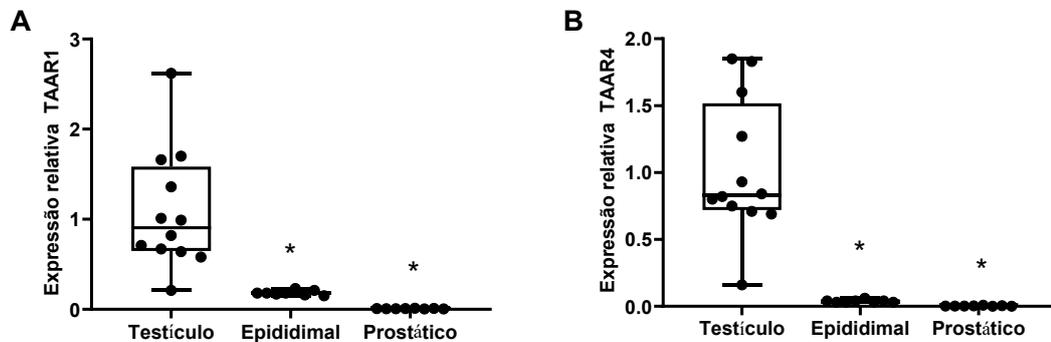
#### 5.14 Avaliação da expressão gênica de receptores TAAR1 e TAAR4 nos segmentos EP e PR de canal deferente

A expressão gênica de receptores TAAR1 e TAAR4 foi verificada através da técnica de RT-PCR. Baseado no estudo de Chiellini et al (2012), o qual aponta o testículo como sendo um dos tecidos com maior expressão de TAAR1, esse tecido foi utilizado como referência na quantificação em referência aos valores encontrados para os segmentos EP e PR de canal

deferente. No estudo de Chiellini et al (2012), a expressão gênica de TAAR4 não foi detectada no testículo de camundongos.

A figura 27A apresenta a expressão gênica de TAAR1 utilizando o testículo como referência e indicando as expressões relativas do gene TAAR1 em relação aos segmentos EP e PR. Foi observado que a expressão do gene no testículo é superior aos valores encontrados para os segmentos do canal deferente ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney). A figura 27B apresenta a expressão gênica de TAAR4, indicando que esse gene também é mais expresso no testículo do que nos segmentos EP e PR ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney).

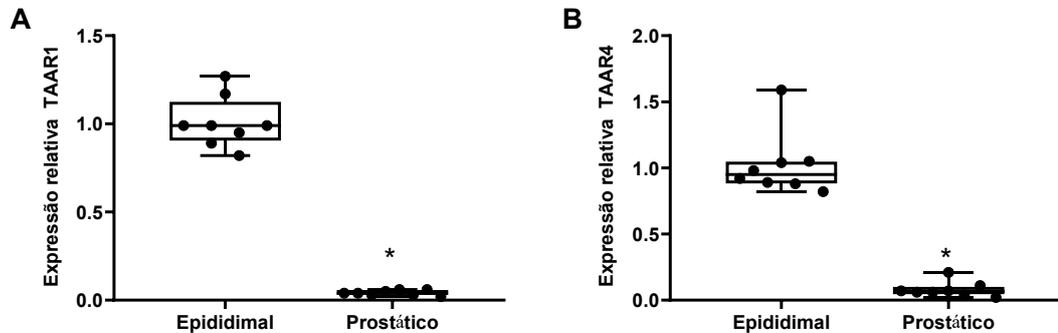
**Figura 27** – Expressão gênica dos TAAR1 e TAAR4 em segmentos EP e PR de canal deferente e testículo isolado de ratos.



Gráficos demonstrativos da expressão gênica dos TAAR1 (painel A) e TAAR4 (painel B), mediante utilização de técnica de RT-PCR, em testículo e canal deferente isolados de ratos. \*,  $P < 0,05$ , em comparação a expressão gênica no testículo, teste de Mann-Whitney.  $n = 12$ , testículo;  $n = 8$ , EP;  $n = 8$ , PR.

A figura 28A mostra a expressão do gene TAAR1 nos segmentos EP e PR separadamente, indicando que o segmento EP possui expressão maior do gene TAAR1 quando comparado ao segmento PR ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney). O mesmo foi observado para o gene TAAR4, como mostra a figura 28B, indicando que esse gene também é mais expresso no segmento EP do que no segmento PR ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney).

**Figura 28** – Comparação da expressão gênica dos TAAR1 e TAAR4 nos segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos.



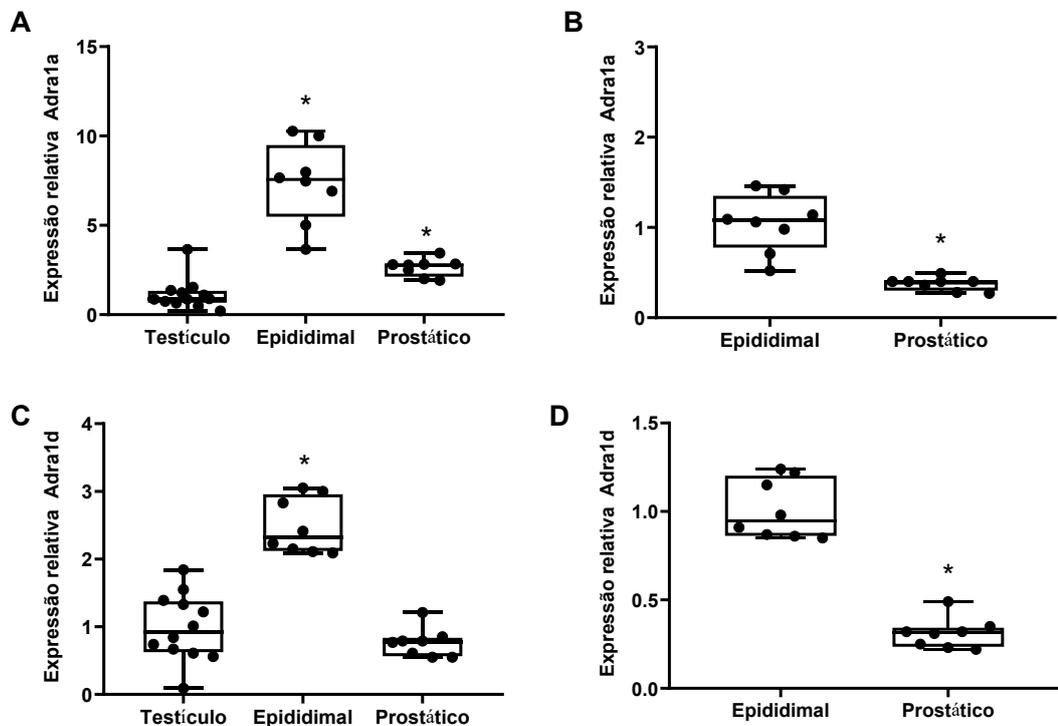
Gráficos comparativos da expressão gênica dos TAAR1 (painel A) e TAAR4 (painel B), mediante utilização de técnica de RT-PCR, nos segmentos EP e PR de canal deferente isolados de ratos. \*,  $P < 0,05$ , EP vs PR, teste de Mann-Whitney. n=8, EP; n=8, PR.

### 5.15 Avaliação da expressão gênica de receptores adrenérgicos $\alpha_{1A}$ e $\alpha_{1D}$ nos segmentos EP e PR de canal deferente

Também foi avaliada a expressão gênica de dois subtipos de receptores adrenérgicos no testículo e canal deferente de ratos. A figura 29A, mostra a expressão do gene *Adra1a* no testículo e nos segmentos EP e PR, indicando que o segmento EP é o que possui maior expressão para esse gene ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney). Quando comparados apenas os segmentos EP e PR, foi demonstrado que o segmento EP possui expressão gênica mais elevada do que o segmento PR ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney, figura 29B).

Para o gene *Adra1d*, a avaliação da expressão gênica em testículo e segmentos EP e PR indicou que o segmento EP é o que possui maior expressão ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney, figura 29C). Quando o segmento EP foi comparado isoladamente com o segmento PR (figura 29D) também foi verificado que este é o que possui maior expressão para o gene *Adra1d* ( $P < 0,05$ , teste de Mann-Whitney).

**Figura 29** – Expressão gênica dos receptores Adra1a e Adra1d em segmentos EP e PR de canal deferente e testículo isolado de ratos.



Gráficos representativos da expressão gênica dos receptores Adra1a em testículo e segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos (painel A). Comparação entre a expressão gênica dos receptores Adra1a nos segmentos EP e PR (painel B). Representação da expressão gênica dos receptores Adra1d em testículo e segmentos EP e PR (painel C). Comparação entre a expressão gênica dos receptores Adra1d nos segmentos EP e PR (painel D). \*,  $P < 0,05$ , EP vs PR, teste de Mann-Whitney.  $n=10$ , testículo;  $n=8$ , EP;  $n=8$ , PR.

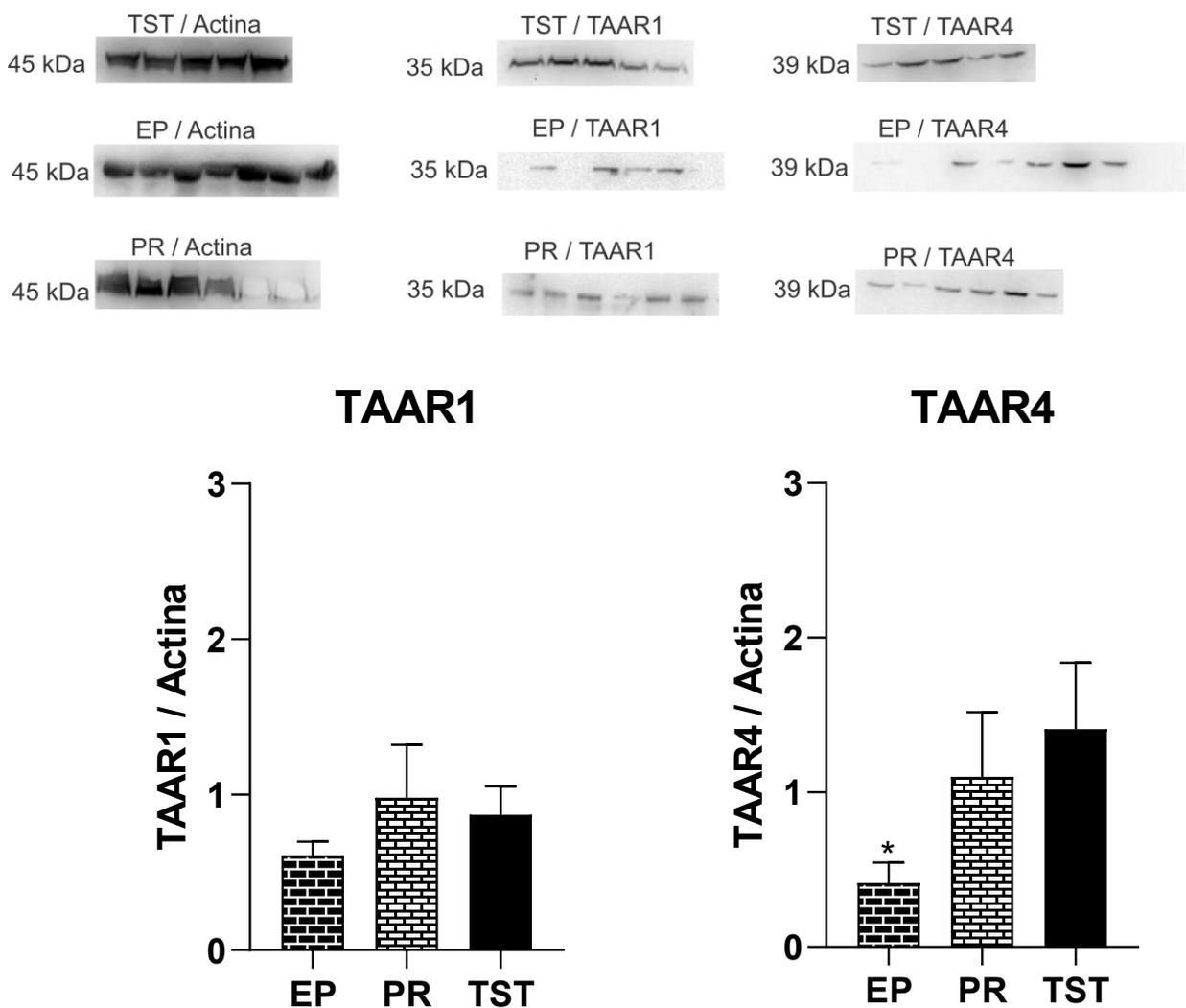
### 5.16 Avaliação da expressão dos receptores TAAR1 e TAAR4 através de técnica de Western Blotting

A técnica de western blotting foi aplicada com a finalidade de avaliar se os receptores TAAR1 e TAAR4 são prontamente expressos nos segmentos EP e PR de canal deferente de ratos. De acordo com Chiellini et al (2012), o TAAR1 é amplamente expresso em testículo, por isso esse tecido foi utilizado como parâmetro de comparação da expressão dos receptores para os segmentos EP e PR. Até o momento, não existem informações a respeito da expressão de TAAR4 no testículo.

A figura 30 indica que os receptores TAAR1 (35 kDa) e TAAR4 (39 kDa) foram detectados e expressos no testículo e nos segmentos EP ( $n=7$ ) e PR ( $n=6$ ). Porém, não foi

observada diferença significativa na expressão dos receptores TAAR1 segmentos EP e PR quando comparados ao testículo ( $P > 0,05$ , *one-way* ANOVA, teste de Dunn). Para o TAAR4, foi observada uma menor expressão proteica do receptor no segmento EP em comparação ao testículo ( $0,41 \pm 7,4$  vs  $1,41 \pm 31,81$ ;  $P < 0,05$ , *one-way* ANOVA, teste de Dunn) e não foi observada diferença significativa entre a expressão nos segmentos EP e PR.

**Figura 30** – Avaliação da expressão proteica dos receptores TAAR1 e TAAR4 em segmentos EP e PR de canal deferente isolado de ratos por meio da técnica de Western Blotting



Gráficos da expressão proteica dos receptores TAAR1 e TAAR4 em segmentos EP e PR de canal deferente de ratos. \*,  $P < 0,05$ , *one-way* ANOVA, teste de Dunn; comparação com o grupo TST.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve os efeitos farmacológicos das amins-traço  $\beta$ -FEA e octopamina em preparações isoladas de canal deferente de rato. Este tecido é classicamente usado para avaliação quantitativa de agentes adrenérgicos. A resposta funcional desse tecido aos agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos consiste em contrações rápidas seguidas por um rápido relaxamento quando o estímulo é removido. Na presente abordagem, a responsividade adrenérgica foi confirmada com uso do agonista adrenérgico fenilefrina, cuja influência foi significativamente inibida por seu antagonista clássico fentolamina.

O interesse pelos efeitos das amins-traço já tem sido evidenciado há décadas na literatura, mas a confirmação da existência de receptores próprios (receptores TAAR) no início dos anos 2000 fez emergir novamente a curiosidade a respeito das funções desses compostos. Localmente, estudos prévios já vinham sendo desenvolvidos com essas moléculas no trato gastrointestinal. Assim, foram descritos efeitos potencialmente mediados por receptores TAARs em tecidos de fundo de estômago e intestino delgado, embora com provável participação de receptores para outras substâncias de importância fisiológica, como a 5-HT (BATISTA-LIMA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2021).

O estudo de Chiellini et al. (2012) apontou o testículo de rato como o tecido com maior expressão de receptores TAAR1 e TAAR8, sugerindo a possibilidade da existência de funções importantes em órgãos relacionados às funções reprodutivas masculinas (CHIELLINI et al., 2012). Além desses receptores, também foram detectadas presenças de TAAR3, TAAR4, TAAR5, TAAR6 e TAAR9, embora em menores quantidades de cópias de cDNA/ $\mu$ g de RNA total (em comparação aos subtipos TAAR1 e TAAR8). Em relação a órgãos do trato genital, alguns relatos dos efeitos de amins como tiramina, octopamina e  $\beta$ -FEA em canal deferente são encontrados na literatura dos anos 1970 e 1980, mas devemos ressaltar o referencial temporal da época, cuja ênfase foi dada à ação desses compostos como agentes simpaticomiméticos, uma vez que os receptores TAAR eram entidades celulares ainda desconhecidas. Em canal deferente, mesmo atualmente, a presença de receptores TAAR ainda é incerta e o presente estudo propôs-se então a investigar a ação das amins-traço  $\beta$ -FEA e octopamina na musculatura lisa do canal deferente de ratos e o envolvimento dos receptores associados às amins-traço no mecanismo de ação dessas substâncias. No presente estudo, também consideramos a potencial interação desses compostos em receptores adrenérgicos.

Em experimentos realizados com o canal deferente sob tônus basal submetido à presença de concentrações crescentes de  $\beta$ -FEA (1-1000  $\mu$ M) e octopamina (1-1000  $\mu$ M), observamos respostas contraturantes dependentes de concentração para ambas as amins-traço.

No entanto, a octopamina apresentou atividade contraturante mais potente quando comparada a  $\beta$ -FEA. Também observamos respostas excitatórias na frequência das contrações rítmicas e na amplitude dos picos dessas contrações. Nossa abordagem difere das anteriormente realizadas por outros pesquisadores, ao enfatizarem as ações desses compostos em contrações causadas por estímulos de campo elétrico (HEDQVIST; VON EULER, 1976; LAFI; LEAKE, 1988; CELUCH; JUORIO, 1988).

Borowsky et al (2001) demonstraram respostas funcionais ao receptor TAAR1 em oócitos de *Xenopus* e em sistemas de células de mamíferos, indicando que a ativação desse receptor leva a estimulação da adenilil ciclase, aumentando os níveis de AMPc através da ativação da proteína Gqs (BOROWSKY et al, 2001). Em músculo liso, o aumento dos níveis de AMPc cursa com relaxamento muscular, perfil oposto aos resultados descritos no presente trabalho quando o canal deferente foi estimulado diretamente com concentrações crescentes de  $\beta$ -FEA e octopamina. De fato, observamos respostas contraturantes em ambos os casos, no entanto, é necessária uma abordagem mais específica em tecidos musculares de mamíferos para afirmar de fato qual via de sinalização está sendo ativada em presença dessas moléculas.

As aminas-traço são amplamente descritas como agentes simpatomiméticos de ação indireta, sendo capazes de promover o efluxo de noradrenalina das vesículas sinápticas de neurônios simpáticos, possibilitando sua interação com receptores adrenérgicos (SCHÖNFELD; TRENDELENBURG, 1989). Dixon et al (1998), afirmou que nervos adrenérgicos são os mais comuns entre os grupos de fibras nervosas que suprem os canais deferentes de mamíferos. (DIXON et al., 1998). Quanto aos receptores adrenérgicos, Honner & Dochert (1999) descreveram que a resposta contrátil mediada pela noradrenalina é exercida principalmente pela ativação de receptores adrenérgicos do subtipo  $\alpha$ -1A (HONNER; DOCHERT, 1999).

Antes de avaliarmos de maneira mais minuciosa o envolvimento de receptores adrenérgicos na contração mediada pelas aminas-traço estudadas, resolvemos avaliar o perfil de resposta da octopamina e da  $\beta$ -FEA frente à estimulação por campo elétrico (EFS) no canal deferente. Essa estimulação produziu uma resposta contrátil bifásica, onde a primeira fase, denominada fase 1, era rápida e reversível, sendo seguida pela fase 2, representada por uma contração tônica sustentada. A presença de  $\beta$ -FEA e octopamina, ambas na concentração de 800  $\mu$ M, não produziu resposta significativa na tensão isométrica do tecido frente a estimulação de campo elétrico. Observamos respostas inibitórias na presença de octopamina na frequência dos picos gerados na fase 2 quando a frequência de estimulação foi de 1, 4, 5 e 7 Hz. Tais resultados diferem dos estudos de Hedqvist e Von Euler (1976), quando estes

mostraram uma ação inibitória da estimulação elétrica de campo causada pela  $\beta$ -FEA. Entretanto, tal diferença pode ser atribuída à diferença entre espécies, pois o estudo citado foi realizado em canal deferente de cobaias. Por outro lado, o estudo de Lafi e Leake (1988) evidenciou que a desnervação autonômica tecidual não interfere com os efeitos da octopamina em canal deferente de rato, suportando a ideia de que os seus efeitos podem ser pós-sinápticos.

Celuch & Juorio (1988) realizaram experimentos de EFS em segmentos PR de canal deferente de ratos e constataram que a *p*-octopamina, quando adicionada sobre o tecido de maneira não cumulativa, é capaz de potencializar a resposta contraturante gerada pelo estímulo elétrico. Em presença de corinantina, antagonista adrenérgico  $\alpha_1$ , a *p*-octopamina exerceu atividade inibitória sobre a contratilidade do canal deferente, o que levou os autores a acreditarem que com o bloqueio do receptor  $\alpha_1$ , agora ela poderia estar se ligando aos receptores inibitórios  $\alpha_2$ , gerando o estímulo inibitório observado. O estudo de Celuch & Juorio (1988) levanta a hipótese de que a *p*-octopamina parece interagir diretamente em receptores adrenérgicos.

A EFS tem sido usada há muitos anos em preparações de tecidos isolados com o intuito de caracterizar os mediadores liberados pelas terminações nervosas envolvidas na contração ou no relaxamento do músculo liso (BRITTO-JUNIOR, 2020). Por muitos anos, a NA foi proposta como o único neurotransmissor neste órgão, sendo os seus efeitos mediados por sua ação nos receptores adrenérgicos (HIRST & NEILD, 1980). No presente trabalho, a EFS foi utilizada para avaliar se as aminas-traço seriam capazes de gerar resposta farmacológica frente ao tecido isolado, porém não foi observada alteração da resposta excitatória previamente observada na construção da curva concentração-efeito em resposta à  $\beta$ -FEA. Em contraposição, a octopamina inibiu a resposta evocada eletricamente, especialmente em relação à magnitude da fase 2, frequência e amplitude pico a pico das contrações rítmicas teciduais. O estudo de Ibrahim et al. (1985) evidenciou a liberação de *m- e p*-octopamina de terminais autonômicos simpáticos, inclusive em canal deferente de rato. Ainda em experimentos com EFS, Pennefather et al (1974) observaram que a utilização dos antagonistas dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos fenoxibenzamina (0,01  $\mu$ M), fentolamina (10  $\mu$ M) e timoxamina (10  $\mu$ M) foi capaz de bloquear as contrações ou reverter o aumento de contração produzido pela NA e pela tiramina. Essas observações indicam que a densidade de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos excitatórios aparenta ser maior no segmento epididimal do tecido (PENNEFATHER et al., 1974). Assim, embora não tenhamos evidências adicionais, é possível que os efeitos inibitórios observados para a octopamina na EFS possam decorrer de alteração da liberação desse composto de terminais pré-sinápticos ou da ação direta sobre

receptores  $\alpha_2$ , como foi observado por Celuch & Juorio (1988). Tal hipótese, entretanto, necessitaria ser investigada.

Antes de darmos continuidade à investigação de quais receptores poderiam estar envolvidos na resposta contrátil mediada pelas aminas-traço  $\beta$ -FEA e octopamina, percebemos nos primeiros experimentos que a porção EP parecia ser mais responsiva na construção da curva concentração-efeito do que a porção PR. Então, decidimos avaliar a resposta dessas porções em experimentos isolados.

A diferença na resposta contrátil dos segmentos EP e PR frente a estímulos com agonistas adrenérgicos, por exemplo, já foi amplamente discutida em estudos anteriores (EBONG, 1986; MARCUS; AVELLAR, 1997; DEHPOUR et al., 1995). Porém, o mecanismo envolvido na resposta contrátil mediada pelas aminas-traço em ambos os segmentos de canal deferente permanece desconhecido, apesar de existirem resultados que apontam para o provável envolvimento de interação das aminas-traço em receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ). Nos experimentos realizados, o segmento EP demonstrou atividade excitatória superior ao segmento PR.

O foco do trabalho foi avaliar se os TAARRs podem estar envolvidos na resposta farmacológica das aminas-traço em canal deferente. Como já foi descrito anteriormente, a ativação do subtipo TAAR1 leva à estimulação da adenilil ciclase, produzindo relaxamento muscular. Um dos protocolos utilizou a resposta do RO5166017, um composto sintético agonista seletivo TAAR1. Entretanto, as respostas relaxantes foram de pequena magnitude, embora significativas. Deve-se ressaltar, entretanto, que esse teste ocorreu apenas com tecidos sujeitos ao estímulo induzido por KCl, fato que não nos permite generalizar a ineficácia desse composto frente a outros estímulos contráteis. Devemos considerar que o mecanismo de ação inibitória causado pelo acúmulo de AMPc pode envolver hiperpolarização da membrana celular mediada pela abertura de canais de  $K^+$ , mecanismo pouco eficaz se considerarmos que o estímulo induzido pelo KCl é despolarizante. Como já demonstrado por Ribeiro-Filho et al. (2012), a hiperpolarização pela abertura de canais de  $K^+$  é pouco eficaz em induzir efeitos relaxantes em músculo liso vascular. Por outro lado, devemos considerar que o antagonista dos receptores TAAR1, EPPTB, não alterou o discreto efeito relaxante do RO5166017 nas condições experimentais que foi testado, fortalecendo a hipótese de que a  $\beta$ -FEA e a octopamina podem estar interagindo com receptores adrenérgicos.

Devida à ação simpatomimética já descrita para as aminas-traço, decidimos avaliar o provável envolvimento de receptores adrenérgicos na resposta mediada pelas aminas-traço. De acordo com Han et al. (1987) o principal receptor adrenérgico estimulado por agonistas no

canal deferente de ratos é o subtipo  $\alpha$ -1A (HAN et al., 1987). Realizamos experimentos com contração prévia induzida por fenilefrina, clássico agonista adrenérgico. Adicionadas no platô da contração da fenilefrina,  $\beta$ -FEA e, especialmente a octopamina, induziram potenciação na resposta contrátil mediada pela fenilefrina. Para a  $\beta$ -FEA foi observada também potenciação do efeito, porém sem efeito tão evidente quanto a octopamina.

Para dar continuidade à avaliação do envolvimento de receptores adrenérgicos, realizamos protocolos com o prazosin, antagonista adrenérgico mais específico para o receptor  $\alpha$ 1A, em presença da curva concentração-efeito da fenilefrina e das aminas-traço. Observamos que o prazosin é capaz de inibir a resposta excitatória mediada pelas aminas-traço em concentrações menores (até 30  $\mu$ M). Em concentrações maiores, o antagonista não apresentou efeito inibitório. Mas esse mesmo perfil foi observado também na curva da fenilefrina na presença do prazosin, então julgamos que a concentração do antagonista poderia estar baixa. Esse protocolo foi conduzido de acordo com o estudo publicado por Marcus & Avellar (1997).

Para dar continuidade da avaliação do envolvimento de receptores adrenérgicos na resposta excitatória medida pela  $\beta$ -FEA, também realizamos protocolos experimentais com a construção de curvas concentração-efeito em presença de fentolamina (10  $\mu$ M), antagonista adrenérgico não-seletivo. Neste protocolo, a ação inibitória foi avaliada apenas para a  $\beta$ -FEA, visto que o efeito da  $\beta$ -FEA e da octopamina estavam sendo muito semelhantes nos protocolos envolvendo receptores adrenérgicos, optamos por avaliar apenas uma das aminas e como a  $\beta$ -FEA é mais seletiva para os receptores TAAR1 (BOROWSKY et al., 2001), optamos por utilizar apenas ela no protocolo da fentolamina. Observamos que o antagonista adrenérgico bloqueou de maneira significativa a resposta excitatória mediada pela fenilefrina, porém a resposta excitatória exercida pela ação da  $\beta$ -FEA foi bloqueada apenas na concentração de 300  $\mu$ M na curva-concentração efeito da amina-traço, mais alta que aquela necessária para bloquear a fenilefrina nesse mesmo tecido. De qualquer forma, é importante reconhecer que, ao menos parcialmente, as ações da  $\beta$ -FEA podem resultar de ação agonista em receptores  $\alpha$ 1.

Afirmamos que os efeitos decorrem com a expressão de “ao menos parcialmente” em função do protocolo experimental seguinte. Seguindo na investigação do envolvimento de receptores adrenérgicos, construímos curvas concentração-efeito da fentolamina adicionada no platô de contrações prévias causadas por  $\beta$ -FEA, octopamina ou fenilefrina, esta utilizada como um controle positivo. Observamos que a menor concentração de fentolamina é capaz de inibir a contração induzida por fenilefrina para cerca de 10% da resposta controle, enquanto para a octopamina e  $\beta$ -FEA, a mesma concentração de fentolamina reduziu a contração para

apenas pouco mais de 50% da contração controle, sendo as contrações causadas pelas aminas traço mais resistente ao antagonismo da fentolamina. Tais resultados, portanto, depõem contra a possibilidade de considerarmos que estes compostos sejam puramente agonistas adrenérgicos, posto que não faz sentido imaginar que a fentolamina altera sua afinidade pelo receptor  $\alpha$  adrenérgico apenas pela presença dos compostos aminérgicos. Portanto, o efeito inibitório em presença de concentrações crescentes de fentolamina nos leva a acreditar que essas aminas ainda podem estar agindo em outros receptores que não apenas os receptores adrenérgicos.

A estratégia de avaliar o envolvimento de receptores TAAR nas ações de aminas-traço é tarefa complexa devida à escassez de ligantes específicos. Anteriormente, já descrevemos o emprego do agonista RO5166017, quando verificamos sua baixa eficácia inibitória sobre a pré-contração do tecido mediada por 80 mM de KCl. Por outro lado, o único antagonista TAAR disponível no mercado durante a realização do presente estudo foi o EPPTB, sendo ele seletivo para o receptor TAAR1 (STALDER et al., 2011), porém não faria sentido utilizar ele diretamente sobre a curva concentração-efeito das aminas-traço porque a ação descrita para o TAAR1 é a ativação da adenilil ciclase, produzindo efeito inibitório sobre a contração muscular e não foi esse o efeito observado para as aminas-traço no presente trabalho. Então, decidimos avaliar se o antagonista TAAR1 seria capaz de interferir na ação das aminas traço em condição de evidente bloqueio com o antagonista adrenérgico. Para isso, utilizamos uma pré-contração causada pela adição de  $\beta$ -FEA ou octopamina, seguida da adição de fentolamina em concentração capaz de induzir abolição dos efeitos da fenilefrina, conforme experimento descrito nos parágrafos anteriores. Na presença de uma resposta funcional residual das aminas traço, adicionamos o EPPTB. Apesar disso, não observamos alterações das respostas residuais mediadas pelas aminas-traço na presença do EPPTB. Assim, consideramos que a  $\beta$ -FEA e a octopamina parecem agir sobre receptores adrenérgicos, porém, a ação contraturante delas não foi totalmente bloqueada em presença de dois tipos de antagonistas adrenérgicos, sugerindo que elas podem estar agindo em outra via de sinalização, não identificada na presente abordagem experimental.

Passamos, então a investigar alguns mecanismos subjacentes à estimulação de receptores na membrana e que são envolvidos com a habilidade das células musculares lisas em produzir força contrátil. Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (VOCs) são uma das principais fontes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  em células excitáveis. Esses canais abrem em resposta a eventos de despolarização da membrana, como potenciais de ação, para permitir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio de seu gradiente eletroquímico (SEISENBERGER et al., 2000). Segundo

RATZ (2005), a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  é um dos principais parâmetros que regulam a contração da musculatura lisa dos tecidos. Além da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , a dependência de voltagem é outra característica importante para induzir o influxo deste cátion (RATZ et al., 2005).

No presente trabalho realizamos protocolos em que o canal deferente foi pré-contraído com diferentes gradientes de concentração de KCl (40, 60, 80 e 120 mM) e em seguida foi construída a curva concentração-efeito da  $\beta$ -FEA e da octopamina com a finalidade de avaliar o papel das amins-traço sobre a dependência de voltagem. Foi observado que a resposta contraturante exercida pelo KCl foi potencializada apenas quando o tecido foi contraído com a menor concentração (40 mM). Para as outras concentrações utilizadas (60, 80 e 120 mM) o efeito contraturante foi mantido, mas não potencializado. Até este ponto, a potenciação do efeito contraturante das amins-traço sobre a pré-contração com KCl 40 mM parece estar atribuída a dois fatores atuando de maneira sinérgica: a ação simpatomimética sobre receptores adrenérgicos e a ação agonista sobre canais de cálcio ativados por voltagem (VOC). Devemos considerar que, similar às amins-traço, a contração da fenilefrina também foi potencializada nas preparações previamente contraídas por 40 mM KCl, mas não aquelas mantidas em 80 mM KCl.

Dando continuidade na avaliação do envolvimento de VOC na resposta contrátil exercida pela octopamina, a curva-concentração-efeito foi construída em presença de 10  $\mu\text{M}$  de nifedipina. O segmento EP possui resposta contraturante mais potente e essa resposta foi bloqueada a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$  em presença do nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ). Em um grupo de experimentos, utilizamos o  $\text{Ba}^{2+}$  em substituição ao  $\text{Ca}^{2+}$  na solução de Krebs-Henseleit e construímos curvas concentração-efeito da octopamina (1 – 1000  $\mu\text{M}$ ). Observamos que a contração muscular na presença do  $\text{Ba}^{2+}$  não teve efeito significativo e foi bem menor quando comparada a solução contendo  $\text{Ca}^{2+}$ . Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, o  $\text{Ba}^{2+}$  é capaz de entrar na célula através dos canais VOC e induzir contração muscular por si só (KARAKI et al., 1986). No entanto, os receptores ativados por ligantes, como no caso do receptor adrenérgico  $\alpha$ -1A, são impermeáveis ao  $\text{Ba}^{2+}$  (KARAKI et al., 1986). Esse resultado volta o nosso entendimento novamente para a ação simpatomimética das amins-traço em receptores adrenérgicos, visto que a contração induzida pelo  $\text{Ba}^{2+}$  foi significativamente menor quando comparada às contrações induzidas em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$  com o receptor adrenérgico disponível.

Com a intenção de verificar a ação das amins-traço em um outro subtipo de receptor TAAR, resolvemos adquirir a nafazolina (NFZ). A NFZ exerce duas ações importantes já

descritas em relação ao canal deferente: agonista  $\alpha$ -adrenérgico (SANDERS et al., 1975) e bloqueador de canais de  $K^+$ , prolongando o potencial de ação (GRANA et al., 1991). Porém, até a presente data, em tecidos isolados de ratos, a NFZ é também descrita como um agonista de receptores TAAR4 (ALEXANDER et al., 2023). Apesar deste receptor pertencer a mesma família do TAAR1, o seu mecanismo de ação permanece incerto. Como afirmamos anteriormente, o estudo de Chiellini et al. (2012) demonstrou a presença desse subtipo de receptor em testículos de rato.

Os experimentos iniciais com a NFZ foram conduzidos através da construção de curva concentração-efeito e indicou que em segmentos EP e PR, a NFZ seguiu um padrão semelhante de resposta excitatória da  $\beta$ -FEA e da octopamina, com o segmento EP demonstrando perfil contraturante mais acentuado em comparação ao segmento PR.

Esse perfil diferenciado de contração, com a porção EP sendo mais responsiva na presença de todas as substâncias utilizadas no presente trabalho pode estar associado ao padrão de distribuição do músculo liso nesses segmentos, sendo o segmento PR composto quase que completamente por músculo liso disposto circularmente, com faixas finas de músculo longitudinal dispersas por essa camada circular. No segmento EP, há proporções aproximadamente iguais de músculo disposto circularmente e longitudinalmente, e estes são dispostos em duas camadas relativamente distintas (PENNEFATHER et al., 1964). Macdonald & Mcgrath (1980) demonstraram que a diferença de contratilidade entre as porções EP e PR em relação a estimulação de receptores adrenérgicos, com a porção EP exibindo resposta excitatória superior a porção PR (MACDONALD; MACGRATH, 1980). Utilizando metodologia de ensaio de ligação de receptor (“receptor binding assay”), Yono et al (2008) demonstraram que a densidade total de  $\alpha_1$ -adrenorreceptores foi significativamente menor na porção PR do que na porção EP (YONO et al., 2008) e essa informação corresponde aos dados funcionais encontrados no presente trabalho, com a porção EP sendo mais responsiva tanto ao agonista adrenérgico fenilefrina quanto às amins-traço utilizadas. Assim, as diferenças regionais nas respostas contráteis podem ser explicadas pela diferença da densidade de receptores adrenérgicos encontradas nos diferentes segmentos de tecidos, também fortalecendo a hipótese das amins-traço estarem agindo em receptores adrenérgicos.

A NFZ também foi avaliada em relação a resposta excitatória do KCl, onde foi observado potenciação do efeito do segmento EP na concentração de 100  $\mu$ M de NFZ frente a pré-contração com 40 mM de KCl. Para o segmento PR não foi observada potenciação do efeito contraturante da NFZ e nem efeito inibitório em nenhuma concentração.

Dando continuidade à investigação do perfil farmacológico da NFZ, realizamos

protocolos utilizando antagonistas adrenérgicos, fentolamina (3  $\mu\text{M}$ ) e prazosin (30 nM), a fim de avaliar o envolvimento destes na resposta contrátil mediada pela NFZ. A fentolamina (3  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de inibir a resposta contraturante nas concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$  (NFZ), em concentrações superiores da curva concentração-efeito, o perfil excitatório foi capaz de sobrepor a inibição causada por esse antagonista. Para o prazosin (30 nM) não observamos efeitos inibitórios frente a curva da NFZ (0,1 – 100  $\mu\text{M}$ ). Neste protocolo encontramos diferenças em relação ao perfil apresentado pela  $\beta$ -FEA e pela octopamina, visto que o prazosin (30 nM) foi incapaz de inibir a resposta contrátil mediada pela NFZ, nos levando a considerar que a NFZ não parece agir apenas em receptores adrenérgicos.

Uma limitação que encontramos no decorrer do desenvolvimento dos protocolos experimentais foi a inexistência de um agonista ou mesmo um antagonista específico para receptores TAAR4. Para analisar o provável envolvimento do subtipo TAAR1 na resposta mediada pela NFZ, decidimos realizar um protocolo utilizando o EPPTB (50  $\mu\text{M}$ ). Apesar de sabermos que a resposta mediada pelo receptor TAAR1 é através da ativação da proteína Gs com aumento dos níveis de AMPc, ainda desconhecemos o papel do receptor TAAR1 na resposta farmacológica do canal deferente. Assim, avaliamos a ação da NFZ na presença de EPPTB, porém, o antagonista foi incapaz de exercer efeito sobre a resposta contraturante mediada pela NFZ (0,1 – 100  $\mu\text{M}$ ).

Em relação a expressão gênica de TAARs, uma revisão realizada por Gainetidov et al (2018) descreveu diversos estudos que utilizaram técnicas de biologia molecular e foram capazes de detectar a presença dos genes associados a esses receptores em tecidos de diferentes espécies, como: rim, pulmão, estômago, testículo, intestino delgado, SNC (GAINETDOV et al., 2018). Chiellini et al. (2012) avaliou a expressão de nove subtipos de TAAR através de técnica de PCR quantitativo em tempo real e apontou que o testículo de ratos possui expressão significativa para os subtipos TAAR1 e TAAR8 (CHIELLINI et al., 2012), por isso decidimos utilizar o testículo como o tecido de referência para a avaliação da expressão gênica dos receptores TAAR1 e TAAR4 nos dois segmentos do canal deferente de ratos. Os resultados encontrados indicam que o segmento EP demonstrou expressão gênica maior de ambos os subtipos de receptores em comparação ao segmento PR e que o testículo teve uma expressão superior do que os segmentos do canal deferente tanto para o TAAR1 quanto para o TAAR4.

Também avaliamos a expressão gênica dos receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$  no testículo e nos segmentos EP e PR do canal deferente de rato e constatamos que o segmento EP possui expressão gênica superior ao segmento PR e ao testículo. Com relação ao canal

deferente, esses resultados estão em concordância com o estudo realizado por Yono et al (2008), que avaliou a presença de três subtipos de receptores adrenérgicos ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ ) nos segmentos EP e PR e também detectou que o segmento EP é o que possui a maior expressão relativa dos genes para os três tipos de receptores, sendo o subtipo  $\alpha_{1A}$  o que possui maior expressão (YONO et al., 2008).

Os resultados encontrados através da técnica de RT-PCR, onde os genes para os receptores foram amplamente expressos, principalmente no segmento EP, nos levam a interpretar que tanto a  $\beta$ -FEA quanto a octopamina parecem realmente estar se ligando em receptores adrenérgicos, dado o perfil contraturante observado nos experimentos funcionais com tecidos isolados em banho de órgãos isolados.

Para finalizar a análise acerca do perfil da resposta associada aos receptores envolvidos, realizamos experimentos utilizando a técnica de western blotting com a finalidade de avaliar o perfil de expressão proteica desses receptores. A expressão proteica foi avaliada no testículo e nos segmentos EP e PR do canal deferente. Para o TAAR1, a expressão proteica esteve presente, porém não foi observada diferença quantitativa entre os segmentos EP e PR. Para o TAAR4, o segmento EP parece ter uma menor expressão em relação ao testículo. Também não foi observada diferença quantitativa entre a expressão nos segmentos EP e PR.

Os experimentos de expressão proteica do receptor TAAR4 em canal deferente de ratos demonstram a existência desse receptor no tecido em questão. Porém, a escassez de ferramentas farmacológicas, como agonistas e antagonistas mais específicos, foi uma das limitações encontradas no presente trabalho para dar continuidade a investigação dos mecanismos envolvendo esse receptor. Em relação ao subtipo TAAR1, a existência dele em testículo já tinha sido observada por Chiellini et al (2012). Nosso estudo trouxe o dado adicional de que esse receptor também está presente no canal deferente de ratos e que não há diferença na densidade deles entre os segmentos EP e PR.

Abordagens complementares serão necessárias em estudos posteriores para entender de maneira mais detalhada a respeito da sinalização farmacológica das aminas-traço no canal deferente, incluindo a avaliação do envolvimento do receptor TAAR8. A inexistência de anticorpos e agonistas farmacológicos específicos para esse receptor foi outra limitação encontrada no presente trabalho.

## 7 CONCLUSÕES

- As aminos-trazo  $\beta$ -FEA e octopamina exercem ação contraturante dependente de concentração no canal deferente isolado de ratos, no qual a octopamina apresentou atividade contraturante mais potente quando comparada à  $\beta$ -FEA;
- O efeito das aminos-trazo e da NFZ é mais potente no segmento EP do que no segmento PR;
- O canal deferente possui expressão gênica para os receptores TAAR1 e TAAR4 de forma mais modesta em relação ao testículo.
- Existe expressão proteica dos receptores TAAR1 e TAAR4 no canal deferente de ratos, cuja magnitude é comparável à expressão no testículo;
- Em termos de receptores adrenérgicos, há expressão gênica dos receptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$  no canal deferente isolado de ratos.
- O efeito contraturante mediado pelas aminos-trazo e pela NFZ parece ser através da ativação de receptores adrenérgicos, e não pela via dos TAARs.

## REFERÊNCIAS

- ALM, Per. On the autonomic innervation of the human vas deferens. **Brain Research Bulletin**, [S.L.], v. 9, n. 1-6, p. 673-677, jul. 1982. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90172-1](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(82)90172-1).
- AMOBI, Nnaemeka; GUILLEBAUD, John; SMITH, I. Christopher H.. Contractile actions of L-type Ca<sup>2+</sup> agonists in human vas deferens and effects of structurally different Ca<sup>2+</sup> antagonists. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 627, n. 1-3, p. 285-294, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.043>
- ANDERSSON, K.-E.; FOVAEUS, M.; HEDLUND, H.; HOLMQUIST, F.; LUNDIN, S.. Immunoreactive Arginine Vasopressin (AVP) and Effects of Avp in the Human Vas Deferens. **Journal Of Urology**, [S.L.], v. 140, n. 51, p. 1054-1057, nov. 1988. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)41925-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)41925-2).
- 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**, [S.L.], v. 81, n. 3, p. 321-344, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37652009000300002>
- AXELROD, Julius; SAAVEDRA, Juan M.. Octopamine. **Nature**, [S.L.], v. 265, n. 5594, p. 501-504, fev. 1977. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/265501a0>.
- BERRY, Mark D.. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 90, n. 2, p. 257-271, 10 jun. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02501.x>.
- BERRY, Mark D.; SHITUT, Mithila R.; ALMOUSA, Ahmed; ALCORN, Jane; TOMBERLI, Bruno. Membrane permeability of trace amines: evidence for a regulated, activity-dependent, nonexocytotic, synaptic release. **Synapse**, [S.L.], v. 67, n. 10, p. 656-667, 21 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/syn.21670>.
- BONETTA, S. et al. Detection of Biogenic Amine Producer Bacteria in a Typical Italian Goat Cheese. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p. 205–209, 2008.
- BOROWSKY, Beth; ADHAM, Nika; JONES, Kenneth A.; RADDATZ, Rita; ARTYMYSHYN, Roman; OGOZALEK, Kristine L.; DURKIN, Margaret M.; LAKHLANI, Parul P.; BONINI, James A.; PATHIRANA, Sudam. Trace amines: identification of a family of mammalian g protein-coupled receptors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 98, n. 16, p. 8966-8971, 17 jul. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.151105198>.
- BRITTO-JÔNIO, José; JACINTHO, Felipe Fernandes; MURARI, Guilherme M. Figueiredo; CAMPOS, Rafael; MORENO, Ronilson Agnaldo; ANTUNES, Edson; MÓNICA, Fabiola Z.; NUCCI, Gilberto de. Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels. **Life Sciences**, [S.L.], v. 243, p. 117257, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117257>.
- BUCCIONI, Michela; KANDHAVELU, Meenakshisundaram; ANGELI, Piero; CRISTALLI, Gloria; BEN, Diego dal; GIARDINÀ, Dario; LAMBERTUCCI, Catia; LAMMI, Carmen; VOLPINI, Rosaria; MARUCCI, Gabriella. Identification of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes

involved in contraction of young CD rat epididymal vas deferens. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 602, n. 2-3, p. 388-394, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.067>.

BUNZOW, James R.; SONNERS, Mark S.; ARTTAMANGKUL, Seksiri; HARRISON, Laura M.; ZHANG, Ge; QUIGLEY, Denise I.; DARLAND, Tristan; SUCHLAND, Katherine L.; PASUMAMULA, Shailaja; KENNEDY, James L.. Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor. **Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 1181-1188, 1 dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.60.6.1181>.

BURCHETT, Scott A.; HICKS, T. Philip. The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 79, n. 5-6, p. 223-246, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.07.003>.

BURDEN, D. A.; PHILIPS, S. R.. Kinetic Measurements of the Turnover Rates of Phenylethylamine and Tryptamine In Vivo in the Rat Brain. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 1725-1732, jun. 1980. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb11267.x>.

BURGESS, Krisstina S. Danek; JUSTICE, Joseph B.. Effects of Serine Mutations in Transmembrane Domain 7 of the Human Norepinephrine Transporter on Substrate Binding and Transport. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 656-664, ago. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730656.x>.

CAMPOS, Marcelo; MORAIS, Paola de Lucena; PUPO, André S.. Effects of castration and of testosterone replacement on  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 471, n. 2, p. 149-155, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01822-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01822-3).

CELUCH, Stellamaris; JUORIO, Augustov.. Pre- and postsynaptic effects of p-tyramine and p-octopamine in the prostatic portion of the rat vas deferens. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [S.L.], v. 338, n. 1, p. 39-46, jul. 1988. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00168810>

CHIELLINI, Grazia; ERBA, Paola; CARNICELLI, Vittoria; MANFREDI, Chiara; FRASCARELLI, Sabina; GHELARDONI, Sandra; MARIANI, Giuliano; ZUCCHI, Riccardo. Distribution of exogenous [125I]-3-iodothyronamine in mouse in vivo: relationship with trace amine-associated receptors. **Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 213, n. 3, p. 223-230, 22 mar. 2012. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/joe-12-0055>.

DEHPOUR, Ahmad Reza; TAJKHORSHID, Emadeddin; ALIMIAN, Mehrdad; BEHBAHANI, Nahid Radjaee. Different calcium dependencies of contractile activity of prostatic and epididymal portions of rat vas deferens. **General Pharmacology: The Vascular System**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 633-639, maio 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)00211-5](http://dx.doi.org/10.1016/0306-3623(94)00211-5).

DIXON, John S.; JEN, Phillip Y.P.; GOSLING, John A.. Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: a review. **Microscopy Research And Technique**, [S.L.], v. 42, n.

6, p. 423-432, 15 set. 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0029\(19980915\)42:63.0.co;2-n](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0029(19980915)42:63.0.co;2-n)

DURDEN, D. A.; DAVIS, B. A.. Determination of regional distributions of phenylethylamine and meta- and para-tyramine in rat brain regions and presence in human and dog plasma by an ultra-sensitive negative chemical ion gas chromatography-mass spectrometric (NCI-GC-MS) method. **Neurochemical Research**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 995-1002, set. 1993. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00966759>.

EBONG, Omotayo O.. Influence of lowered temperature upon the response of prostatic and epididymal portion of the rat isolated vas deferens to field stimulation. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 9-16, jan. 1986. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.1986.tb00310.x>.

ELTZE, Manfred. Pathways involved in muscarinic M1 and M2 receptor stimulation in rabbit vas deferens. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 263, n. 1-2, p. 31-37, set. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90520-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(94)90520-7).

ERSPAMER, V.. Active Substances in the Posterior Salivary Glands of Octopoda. I. Enteramine-like Substance. **Acta Pharmacologica Et Toxicologica**, [S.L.], v. 4, n. 3-4, p. 213-223, jul. 1948. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0773.1948.tb03344.x>.

GAINETDINOV, Raul R.; HOENER, Marius C.; BERRY, Mark D.. Trace Amines and Their Receptors. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 549-620, 25 jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.117.015305>.

GLORIAM, D e I; BJARNADÓTTIR, T K; SCHIÖTH, H B; FREDRIKSSON, R.. High Species Variation within the Repertoire of Trace Amine Receptors. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 1040, n. 1, p. 323-327, abr. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1327.052>.

GRANA, Enzo; BARBIERI, Annalisa; ZONTA, Franco. Effects of cromakalim (BRL 34915) on mechanical responses of rat vas deferens to noradrenaline and naphazoline. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 192, n. 1, p. 79-84, jan. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90071-w](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(91)90071-w).

HAN, Chide; ABEL, Peter W.; MINNEMAN, Kenneth P..  $\alpha$ 1 Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular  $Ca^{2+}$  in smooth muscle. **Nature**, [S.L.], v. 329, n. 6137, p. 333-335, set. 1987. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/329333a0>.

HEDQVIST, Per; VON EULER, Ulf S.. Inhibition by  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors of the twitch response to transmural stimulation in the guinea-pig vas deferens. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 153-162, nov. 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(76\)90365-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(76)90365-4).

HIRST, G. D. S.; NEILD, T. O.. Evidence for two populations of excitatory receptors for noradrenaline on arteriolar smooth muscle. **Nature**, [S.L.], v. 283, n. 5749, p. 767-768, fev. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/283767a0>.

HOLT, A. et al. Multiple Binding Sites for Substrates and Modulators of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidases: Kinetic Consequences. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 525-538, 2007.

HONNER, Valerie; DOCHERTY, J R. Investigation of the subtypes of  $\alpha 1$ -adrenoceptor mediating contractions of rat vas deferens. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 128, n. 6, p. 1323-1331, nov. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702913>.

HUEBERT, N.D. et al. The measurement of beta-phenylethylamine in human plasma and rat brain. **Anal Biochem**, v. 221, p. 42–47, 1994

IBRAHIM, K. E.; COUCH, M. W.; WILLIAMS, C. M.; FREGLY, M. J.; MIDGLEY, J. M. M-Octopamine: normal occurrence with p :octopamine in mammalian sympathetic nerves. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 1862-1867, jun. 1985. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb07180.x>.

KALECZYC, J. *et al.* Immunohistochemical characteristics of nerve fibres supplying the porcine vas deferens. A colocalisation study. **Histochemistry And Cell Biology**, [S.L.], v. 107, n. 3, p. 229-241, 12 mar. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s004180050108>.

KARAKI, H.; SATAKE, N.; SHIBATA, S. Mechanism of barium-induced contraction in the vascular smooth muscle of rabbit aorta. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 88, n. 4, p. 821-826, ago. 1986. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1986.tb16255.x>.

KAVOUSSI, Parviz K; GUPTA, Chirag; SHAH, Rupin. Varicocele and nonobstructive azoospermia. **Asian Journal Of Andrology**, [S.L.], p. 235-244, 6 ago. 2024. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/aja202444>.

KHAN, Muhammad Zahid; NAWAZ, Waqas. The emerging roles of human trace amines and human trace amine-associated receptors (hTAARs) in central nervous system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 83, p. 439-449, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.002>.

KOH, Andy Hsien Wei; CHESS-WILLIAMS, Russ; LOHNING, Anna Elizabeth. Differential mechanisms of action of the trace amines octopamine, synephrine and tyramine on the porcine coronary and mesenteric artery. **Scientific Reports**, Queensland, v. 9, n. 1, p. 1-9, 29 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-46627-5>.

KÖSE, Mustafa Gökhan; ERDEM, Ş. Remzi; PEŞKIRCIOĞLU, Çetin Levent; ÇAYLAK, Berrin. Effects of Angiogenesis Inhibition by Spironolactone on Isolated Vas Deferens Contractility in an Experimental Varicocele Model in Rats. **Urology**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 816-821, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2012.07.017>.

KOSLOV, David S.; ANDERSSON, Karl-Erik. Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens—an update. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 4, p. 1-11, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2013.00101>.

LAFI, M.A.K.; LEAKE, L.D.. Actions of dopamine and related amines on reserpinised and chronically denervated vasa deferentia of the rat. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, [S.L.], v. 89, n. 2, p. 141-146, jan. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(88\)90200-9](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(88)90200-9).

LAFI, M.A.K.; LEAKE, L.D.. Tonic and rhythmic contractions induced by dopamine and related amines in rat vasa deferentia are pharmacologically separable. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, [S.L.], v. 90, n. 1, p. 183-188, jan. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(88\)90117-x](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(88)90117-x).

LANDETE, J. M. et al. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1119–1124, 2005.

LANGE, Angela B.. Tyramine: from octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. **General And Comparative Endocrinology**, [S.L.], v. 162, n. 1, p. 18-26, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.05.021>.

LAUWERYNS, J M; VAN RANST, L. Immunocytochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase in human, rat, and mouse bronchopulmonary and gastrointestinal endocrine cells. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, [S.L.], v. 36, n. 9, p. 1181-1186, set. 1988. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/36.9.2900264>.

LIANG, S.X.; D'ARBE, M.; PHILLIPS, W.D.; LAVIDIS, N.A.. Development of fast purinergic transmission in the mouse vas deferens. **Synapse**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 283-291, 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1098-2396\(20000915\)37:43.0.co;2-w](http://dx.doi.org/10.1002/1098-2396(20000915)37:43.0.co;2-w).

LIANG, Ying-Jian; ZHEN, Juan; CHEN, Nianhang; REITH, Maarten E. A.. Interaction of catechol and non-catechol substrates with externally or internally facing dopamine transporters. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 109, n. 4, p. 981-994, 14 abr. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06034.x>.

LIMA-JUNIOR, Francisco Jose Batista de. **Investigação da  $\beta$ -feniletilamina sobre a contratilidade de diferentes órgãos isolados e mecanismo responsável por efeito dual em tiras isoladas de fundo de estômago de rato**. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 89. 2019.

LINDEMANN, Lothar; EBELING, Martin; KRATOCHWIL, Nicole A.; BUNZOW, James R.; GRANDY, David K.; HOENER, Marius C.. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. **Genomics**, [S.L.], v. 85, n. 3, p. 372-385, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.11.010>.

LINDEMANN, Lothar; HOENER, Marius C.. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 274-281, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.007>.

MACDONALD, A.; MCGRATH, J.C.. The distribution of adrenoceptors and othe drug receptors between the two ends of the rat vas deferentes as revealed by selective agonists and antagonists. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 445-458, fev. 1980. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1980.tb10957.x>.

MARKUS, R. P.; AVELLAR, M. C. W. de. Age-related changes in the reactivity of post-synaptic adrenoceptors in the rat vas deferens: differences between the epididymal and prostatic portion. **Journal Of Autonomic Pharmacology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 147-154, jan. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2680.1997.00449.x>.

MILLER, Gregory M.; VERRICO, Christopher D.; JASSEN, Amy; KONAR, Martha; YANG, Hong; PANAS, Helen; BAHN, Mary; JOHNSON, Ryan; MADRAS, Bertha K.. Primate Trace Amine Receptor 1 Modulation by the Dopamine Transporter. **Journal Of**

**Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [S.L.], v. 313, n. 3, p. 983-994, 11 mar. 2005. Elsevier BV.

MULRYAN, K.; GITTERMAN, D. P.; LEWIS, C. J.; VIAL, C.; LECKIE, B. J.; COBB, A. L.; BROWN, J. E.; CONLEY, E. C.; BUELL, G.; PRITCHARD, C. A.. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. **Nature**, [S.L.], v. 403, n. 6765, p. 86-89, jan. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/47495>.

OLIVEIRA, Daniel Maia Nogueira de. **Efeitos agudos das feniletilaminas sobre a motilidade gastrointestinal em ratos**. 2021. 124 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

PASTORE, P. et al. Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 1098, n. 1–2, p. 111–115, 2005.

PATERSON, I. A.; JUORIO, A. V.; BOULTON, A. A.. 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system?. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 55, n. 6, p. 1827-1837, dez. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb05764.x>.

PENNEFATHER, Jocelyn N.; VARDOLOV, Ludmila; HEATH, Penelope. Regional variation in the response of the rat vas deferens to field stimulation, to noradrenaline and to tyramine. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [S.L.], v. 1, n. 5, p. 451-462, out. 1974. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.1974.tb00566.x>.

PHILIPS, S. R.; BOULTON, A. A.. The effect of monoamine oxidase inhibitors on some arylalkylamines in rats striatum. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 159-167, jul. 1979. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb11718.x>.

PHILIPS, S. R.; DAVIS, B. A.; DURDEN, D. A.; BOULTON, Alan A.. Identification and Distribution of m-Tyramine in the Rat. **Canadian Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 65-69, 1 jan. 1975. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/o75-010>.

RAITERI, Maurizio; CARMINE, Renata del; BERTOLLINI, Alberto; LEVI, Giulio. Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 133-143, jan. 1977. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(77\)90202-3](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(77)90202-3).

RAMSAY, R. R.; OLIVIERI, A.; HOLT, A. An improved approach to steady-state analysis of monoamine oxidases. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 7, p. 1003–1019, 2011.

RATZ, Paul H.; BERG, Krystina M.; URBAN, Nicole H.; MINER, Amy S.. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: kcl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, [S.L.], v. 288, n. 4, p. 769-783, abr. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00529.2004>.

REVEL, Florent G.; MOREAU, Jean-Luc; GAINETDINOV, Raul R.; BRADAIA, Amyaouch; SOTNIKOVA, Tatyana D.; MORY, Roland; DURKIN, Sean; ZBINDEN, Katrin Groebke; NORCROSS, Roger; MEYER, Claas A.. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic

activity. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 20, p. 8485-8490, 27 abr. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1103029108>.

REYNOLDS, G.; RAUSCH, W.; RIEDERER, P. Effects of tranylcypromine stereoisomers on monamine oxidation in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 521–523, 1980.

RIBEIRO-FILHO, H. V.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J. B.; PINHO, J. P. M.; SOUSA, D. F.; SILVA, M. T. B.; SIQUEIRA, R. J. B. de; COSKER, F.; BASTOS, V. P. D.; SANTOS, A. A.. Talking about bioelectrical potentials using rings of the mesenteric artery without glass micropipettes. **Advances In Physiology Education**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 336-344, dez. 2012. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/advan.00050.2012>.

ROEDER, Thomas. TYRAMINE AND OCTOPAMINE: ruling behavior and metabolism. **Annual Review Of Entomology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 447-477, 1 jan. 2005. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130404>.

RUAN, Ye Chun; WANG, Zhe; DU, Jian Yang; ZUO, Wu Lin; GUO, Jing Hui; ZHANG, Jie; WU, Zhong Luan; WONG, Hau Yin; CHUNG, Yiu Wa; CHAN, Hsiao Chang. Regulation of smooth muscle contractility by the epithelium in rat vas deferens: role of atp :induced release of pge2. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 586, n. 20, p. 4843-4857, 14 out. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154096>.

SAAVEDRA, J. M. Enzymatic Isotopic Assay for and Presence of B-Phenylethylamine in Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 22, n. 2, p. 211–216, 1974.

SCHÖNFELD, C. -L.; TRENDELENBURG, U.. The release of 3H-noradrenaline by p- and m-tyramines and -octopamines, and the effect of deuterium substitution in alpha-position. **Naunyn-Schmiedeberg'S Archives Of Pharmacology**, [S.L.], v. 339, n. 4, p. 433-440, abr. 1989. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00736058>.

SEISENBERGER, Claudia; SPECHT, Verena; WELLING, Andrea; PLATZER, Josef; PFEIFER, Alexander; KÜHBANDNER, Susanne; STRIESSNIG, Jörg; KLUGBAUER, Norbert; FEIL, Robert; HOFMANN, Franz. Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type  $\alpha 1C$  (Ca 1.2) Calcium Channel Gene in the Mouse. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 275, n. 50, p. 39193-39199, dez. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m006467200>.

SJÖSTRAND, Nils O.. Inhibition by Ganglionic Blocking Agents of the Motor Response of the Isolated Guinea-Pig Vas Deferens to Hypogastric Nerve Stimulation. **Acta Physiologica Scandinavica**, [S.L.], v. 54, n. 3-4, p. 306-315, mar. 1962. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1962.tb02354.x>.

STALDER, Henri; HOENER, Marius C.; NORCROSS, Roger D.. Selective antagonists of mouse trace amine-associated receptor 1 (mTAAR1): discovery of epptb (ro5212773). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 1227-1231, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.075>.

STÄUBERT, Claudia; BÖSELT, Iris; BOHNEKAMP, Jens; RÖMPLER, Holger; ENARD, Wolfgang; SCHÖNEBERG, Torsten. Structural and Functional Evolution of the Trace Amine-Associated Receptors TAAR3, TAAR4 and TAAR5 in Primates. **Plos One**, [S.L.], v.

5, n. 6, p. 11133, 15 jun. 2010. Public Library of Science (PLoS).  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011133>.

STEERS, W.D.. Physiology of the vas deferens. **World Journal Of Urology**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 543-558, out. 1994. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00191208>

TAKAYANAGI, M.; WATANABE, T.. Immunocytochemical colocalizations of insulin, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase, S-100 protein and chromogranin A in B-cells of the chicken endocrine pancreas. **Tissue And Cell**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 17-24, fev. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0040-8166\(96\)80040-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0040-8166(96)80040-1).

TIFFANY, P.; GOLDSTEIN, M. Aperistalsis of the vas deferens corrected with administration of ephedrine. **Journal of Urology**, v. 133, n. 6, p. 1060–1061, 1985.

TILLEM, S.M.; MELLINGER, B.C. Azoospermia due to aperistalsis of vas deferens: successful treatment with pseudoephedrine. **Urol**, v. 53, p. 417-419, 1999.

TODOROV, L.; WINDISCH, K.; SHERSEN, H.; LAJTHA, A.; PAPASOVA, M.; VIZI, E.s.. Prejunctional nicotinic receptors involved in facilitation of stimulation-evoked noradrenaline release from the vas deferens of the guinea-pig. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 102, n. 1, p. 186-190, jan. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12151.x>.

WONG, Pei Yee; FONG, Zhihui; HOLLYWOOD, Mark A.; THORNBURY, Keith D.; SERGEANT, Gerard P.. Regulation of nerve-evoked contractions of the murine vas deferens. **Purinergic Signalling**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 547-557, 20 fev. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-024-09993-y>.

YONO, Makoto; LATIFPOUR, Jamshid; YAMAMOTO, Yasuhiro; IMANISHI, Aya; YOSHIDA, Masaki. Region and age dependent differences in  $\alpha$ 1-adrenergic responsiveness of rat seminal vesicle and vas deferens. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 587, n. 1-3, p. 291-295, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.04.009>.

ZIEGLEDER, G.; STOJACIC, E. Originalarbeit in Kakao und Kakaoerzeugnissen. p. 235–238, 1992.

ZUCCHI, R; CHIellini, G; SCANLAN, T s; GRANDY, D K. Trace amine-associated receptors and their ligands. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 149, n. 8, p. 967-978, dez. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706948>.

## ANEXO A – PROTOCOLO DE ACEITE DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA – UFC)



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DA B-FENILETILAMINA E DO AGONISTA SELETIVO TAAR1 R05166017 SOBRE A CONTRATILIDADE IN VITRO DE CANAL DEFERENTE E VESÍCULA SEMINAL DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 8056290120 (ID 001568), sob a responsabilidade de **Pedro Jorge Caldas Magalhães e equipe; Karine Lima Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 09/04/2020.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF B-PHENYLETHYLAMINE AND TAAR1 R05166017 SELECTIVE AGONIST IN IN VITRO CONTRATILITY OF VAS DEFERENS AND SEMINAL VESICULA OF RATS", utilizing 216 Heterogenics rats (216 males), protocol number CEUA 8056290120 (ID 001568), under the responsibility of **Pedro Jorge Caldas Magalhães and team; Karine Lima Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/09/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2020](#) a [01/2023](#)

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [10 a 16 semanas](#) N: [216](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 250 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI)

Fortaleza, 03 de julho de 2020

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará