

ENIO SETSUO ARAKAKI PACINI

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA  
DOS SUBTIPOS DE ADRENOCEPTORES  $\alpha_1$  NA CAUDA  
PROXIMAL E DISTAL DO EPIDIDIMO DE RATO

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área  
de concentração: Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Farmacologia, UNESP

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Pacini, Enio Setsuo Arakaki.

Expressão e caracterização farmacológica dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$   
na cauda proximal e distal do epidídimo de rato / Enio Setsuo Arakaki Pacini. –  
Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biociências de Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo

Capes: 21005001

1. Farmacologia. 2. Rato como animal de laboratório. 3. Testículos.

Palavras-chave: Adrenoceptores  $\alpha_1$ ; Epidídimo; Experimento de ligação com  
radioligante; Músculo liso.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. André Sampaio Pupo pela oportunidade, orientação e os ensinamentos providos.

Ao Prof. Dr. José Buratini Jr. pela colaboração nos experimentos de RT-qPCR.

Ao companheiro de laboratório Luiz Ricardo de Almeida Kiguti que teve a iniciativa de começar a trabalhar com o epidídimo de rato e generosamente me ensinou e teve participação efetiva no desenvolvimento desta dissertação.

Aos colegas Anthony César de Souza Castilho e Flavia Hebeler Barbosa Trovão pela realização e colaboração nos experimentos de RT-qPCR.

Aos companheiros de laboratório, Vanessa Lima, Juliana Akinaga, Fernanda Diehl Nojimoto e Bárbara Alcaide Gallo Kauchi pelo auxílio, discussões e principalmente o aprendizado conjunto adquirido.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pelos serviços de suma importância prestados.

A minha namorada, Natália Rodrigues Rodas, com quem tenho a grande felicidade de poder dividir cada momento da minha vida.

Aos meus pais, Edson Pacini e Maria Mizio Arakaki Pacini, por tudo.

**Resumo**

O epidídimo é um órgão formado por um longo túbulo enovelado composto por 3 regiões anatômicas distintas: a cabeça, o corpo e a cauda. A cabeça e o corpo do epidídimo têm papel na maturação dos espermatozoides, enquanto que a cauda do epidídimo armazena e mantém os espermatozoides em estado de quiescência até o momento da ejaculação. A cauda do epidídimo é a região que apresenta a camada muscular mais espessa de todo epidídimo, estando sobre o controle principal do sistema nervoso simpático. Durante o processo de emissão seminal, as varicosidades nervosas simpáticas liberam noradrenalina causando a contração da cauda do epidídimo e do ducto deferente para que o esperma seja propelido em direção à uretra. Apesar de estudos demonstrarem a presença e a importância dos adrenoceptores  $\alpha_1$  na contração da cauda do epidídimo de rato, os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  envolvidos ainda não foram identificados. Assim, a presente dissertação investigou a expressão dos três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  na cauda proximal e distal do epidídimo de rato e caracterizou farmacologicamente os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  envolvidos na contração da musculatura lisa. Apesar das porções proximais e distais da cauda do epidídimo de rato expressarem mRNA codificando todos os três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ , experimentos com radioligante revelaram a presença apenas dos adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$ , enquanto que o adrenoceptor envolvido nas contrações destes tecidos em resposta à noradrenalina é o  $\alpha_{1A}$ . A cauda do epidídimo pode ser um modelo interessante para a caracterização farmacologia de novas drogas com ação em adrenoceptores  $\alpha_1$  e no estudo dos efeitos de drogas sobre o sistema reprodutivo masculino.

Palavras chave: epidídimo; adrenoceptores  $\alpha_1$ ; músculo liso, experimento de ligação com radioligande

**Abstract**

The epididymis is an organ composed by a single convoluted tubule subdivided into three distinct anatomical regions: caput, corpus and cauda epididymis. Caput and corpus epididymis have a role in sperm maturation, while cauda epididymis store and maintain the sperm in a quiescent state prior the ejaculation. The cauda epididymis has a thicker smooth muscle layer than the others regions and is under the control of the sympathetic nervous system. During the emission phase of ejaculation, noradrenaline released from sympathetic nerve varicosities induces smooth muscle contraction in the cauda epididymis and vas deferens to propel the sperm towards the prostatic urethra. Despite some studies reporting the expression and involvement of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the contraction of cauda epididymis, the  $\alpha_1$ -adrenoceptors subtypes-mediated contraction are unknown. Thus, the present study investigated the expression of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors subtypes in proximal and distal rat cauda epididymis using RT-qPCR, radioligand binding and functional (contraction) assays. The results indicate the expression of mRNA encoding all three  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the rat cauda epididymis, but radioligand binding studies reveal the presence of only  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors. In addition, only the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor subtype mediates the contractions of both regions in response to noradrenaline. The cauda epididymis may serve as good model for the pharmacological characterization of drugs acting at  $\alpha_1$ -adrenoceptors and for the study of the effects of drugs in the male reproductive system.

Key words: epididymis;  $\alpha_1$ -adrenoceptors subtypes; smooth muscle; radioligand-binding assay



## **Sumário**

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	7
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
1. <i>Animais</i> .....	8
2. <i>Isolamento dos tecidos</i> .....	8
3. <i>Experimento de transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)</i> .....	8
3.1 <i>Extração do RNA total</i> .....	8
3.2 <i>Transcrição reversa</i> .....	9
3.3 <i>Oligonucleotídeos iniciadores</i> .....	10
3.4 <i>PCR em tempo real</i> .....	11
3.5 <i>Geração das curvas padrão</i> .....	11
3.6 <i>Eficiência de amplificação</i> .....	13
3.7 <i>Quantificação absoluta das amostras</i> .....	13
4. <i>Experimentos de ligação do radioligante [<sup>3</sup>H]Prazosin em segmentos de tecido intacto</i> .....	13
5. <i>Estudos de contração in vitro</i> .....	14
6. <i>Análise dos dados</i> .....	16
7. <i>Drogas e reagentes</i> .....	16
<b>RESULTADOS</b>	
1. <i>Expressão de mRNA para os subtipos de adrenocetores <math>\alpha_1</math> na cauda do epidídimo de rato</i> .....	18
2. <i>Experimentos de ligação com o radioligante [<sup>3</sup>H]Prazosin em segmentos de tecidos intactos na cauda proximal e distal do epidídimo de rato</i> .....	21
2.1 <i>Saturação da ligação</i> .....	21

2.2	<i>Análises da ligação competitiva.....</i>	23
3.	<i>Estudos de contração.....</i>	28
3.1	<i>Contrações da cauda do epidídimo de rato à noradrenalina.....</i>	28
3.2	<i>Efeito dos antagonistas nas contrações induzidas pela noradrenalina.....</i>	30
	<b>DISCUSSÃO.....</b>	33
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	41
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	42
	<b>ANEXOS</b>	
1.	<i>Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal.....</i>	52
2.	<i>Artigo publicado.....</i>	53

## **Introdução**

O epidídimo é um órgão formado por um túbulo único altamente enovelado que é dividido ultra estruturalmente e histologicamente em três diferentes regiões: a cabeça, o corpo e a cauda do epidídimo (Turner, 2008) (Figura 1A). Cada região possui distintas funções, sendo que a cabeça e o corpo do epidídimo estão envolvidos principalmente nos processos de maturação dos espermatozóides enquanto que a região da cauda do epidídimo está envolvida principalmente no processo de armazenamento de espermatozóides (Cornwall, 2009).

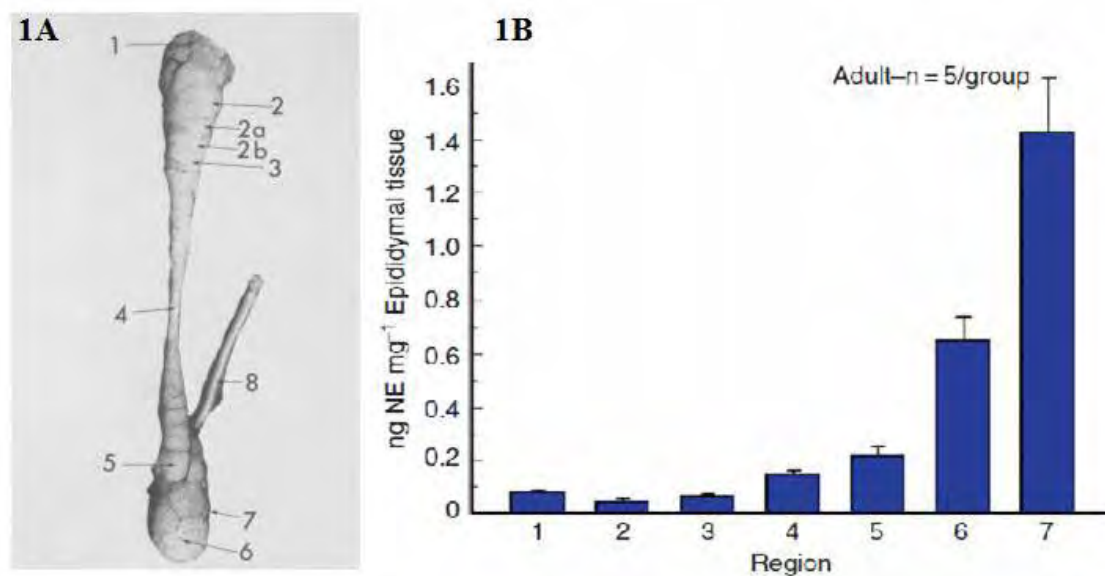


Figura 1. (A) Fotografia do epidídimo de rato mostrando as suas diferentes regiões. Região 1: segmento inicial; região 2: cabeça proximal; região 3: cabeça distal; região 4: corpo mediano; região 5: corpo distal; região 6: cauda proximal; região 7: cauda distal; região 8: ducto deferente (Figura retirada de Hinton *et al.*, 1979). (B) Concentração de noradrenalina ao longo das diferentes regiões do epidídimo de rato (Figura modificada de Kempinas and Klinefelter., 2010).

As diferentes regiões do epidídimo recebem inervação autonômica provenientes do gânglio mesentérico inferior, gânglio pélvico maior e gânglio pélvico acessório (Ricker *et al.*, 1997) desempenhando um importante papel regulatório nas funções do epidídimo, como no armazenamento de espermatozóides (Billups *et al.*, 1990a), transporte eletrolítico (Chan *et al.*, 1994) e

composição protéica do fluido luminal (Ricker *et al.*, 1996). As fibras parassimpáticas provenientes dos nervos pélvicos localizam-se principalmente na camada epitelial e subepitelial (El-Badawi and Schenk, 1967; Silva *et al.*, 2002), onde controlam as atividades secretórias do epitélio e aumentam a contratilidade da cauda do epidídimo por ativação de receptores muscarínicos (Siu *et al.*, 2006). As fibras simpáticas provenientes dos nervos hipogástricos, por sua vez, estão associadas predominantemente às camadas de músculo liso do epidídimo sugerindo que sua principal função é a modulação da atividade contrátil do ducto epididimário. Entretanto, a cauda do epidídimo é a região que recebe maior inervação autonômica (Bell, 1972; Silva *et al.*, 2002) e também possui parede muscular mais espessa que a da cabeça e do corpo (Kempinas *et al.*, 1998a). Além disso, a cauda do epidídimo é a região que contém as maiores concentrações dos neurotransmissores adrenérgicos noradrenalina e adrenalina (Eliasson and Risley, 1968; Kempinas and Klinefelter, 2010; Silva *et al.*, 2002) (Figura 1B).

A desnervação cirúrgica ou química dos componentes simpáticos tem efeitos marcantes sobre o epidídimo de rato, demonstrando a importância deste sistema para o funcionamento deste órgão. Após remoção do gânglio mesentérico inferior de ratos são observadas mudanças histológicas e no conteúdo protéico luminal do epidídimo (Ricker *et al.*, 1996), acúmulo de espermatozoides na cauda do epidídimo (Billups *et al.*, 1990a) e mudanças nos parâmetros de motilidade espermática (Billups *et al.*, 1990b). A simpatectomia cirúrgica ou química pelo uso de baixas doses de guanetidina diminui a contratilidade do epidídimo de rato, prolongando o tempo de transito do esperma na cauda do epidídimo sem causar alteração na qualidade dos espermatozoides coletados da região distal da cauda do epidídimo, além de causar um aumento significativo no número de

espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo (Kempinas et al., 1998a; Kempinas et al., 1998b).

A liberação de noradrenalina proveniente da estimulação simpática ativa adrenoceptores na musculatura lisa levando a contração da cauda do epidídimo (Ventura and Pennefather, 1991). Os adrenoceptores possuem em comum a característica de serem ativados pelas catecolaminas endógenas noradrenalina e adrenalina e pertencem à grande família dos receptores acoplados à proteína G (G-protein coupled receptors; GPCRs). Os adrenoceptores são divididos em três famílias ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ ) baseado nas suas propriedades farmacológicas, homologia estrutural e mecanismos de sinalização. Três subtipos de receptores de cada família foram clonados e designados como:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1d}$ ,  $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$ ,  $\alpha_{2c}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (Bylund et al., 1994; Hieble et al., 1995) e estão localizados respectivamente nos cromossomos humanos 8, 5, 20, 10, 2, 4, 10, 5 e 8 (Schaak et al., 2007).

Os adrenoceptores  $\alpha_1$  ( $\alpha_1$ -ARs) são compostos por uma única cadeia polipeptídica de sete domínios transmembrana com uma porção N-terminal localizada extracelularmente e uma longa porção C-terminal intracelular. Após sofrerem ativação, se acoplam preferencialmente as proteínas  $G_{q/11}$  resultando na hidrólise de fosfolípidios de membrana e a subsequente ativação da fosfolipase C do tipo  $\beta$  (PLC) gerando dois segundos mensageiros: o inositol(1,4,5)-trifosfato ([Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] ou IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG). O Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> se difunde no citosol e se liga a receptores intracelulares presentes no retículo endoplasmático resultando na abertura de canais Ca<sup>2+</sup> e a contração do músculo liso (Minneman, 1988). O DAG ativa a proteína kinase C (PKC) responsável pela fosforilação de proteínas alvo causando diversas respostas biológicas celulares. Magnitudes diferentes de ativação da PLC e estimulação da produção de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> são

relatadas para cada subtipo de adrenoceptores  $\alpha_1$  recombinante sendo elas  $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} > \alpha_{1D}$  (Hawrylyshyn *et al.*, 2004).

Os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  são discriminados farmacologicamente por vários compostos que exibem afinidades subtipo-seletivas. O adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  é reconhecido por apresentar uma alta afinidade aos ligantes 5-methylurapidil e RS 100329 (30-100 vezes) (Gross *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1999). O adrenoceptor  $\alpha_{1D}$  por sua vez exibe afinidades 30 vezes maiores ao antagonista BMY 7378 que os outros dois subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  (Goetz *et al.*, 1995). Além dos três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  classicamente conhecidos, um quarto subtipo (adrenoceptor  $\alpha_{1L}$ ) foi proposto devido a sua característica baixa afinidade pelo prazosin (Flavahan and Vanhoutte, 1986; Muramatsu *et al.*, 1990). Adicionalmente, o adrenoceptor  $\alpha_{1L}$  é caracterizado farmacologicamente por possuir baixa afinidade ao 5-methylurapidil, RS-17053 e BMY 7378 e alta afinidade ao silodosin e tamsulosin (Ford *et al.*, 1996; Hiraoka *et al.*, 1999; Muramatsu *et al.*, 2008). Atualmente, acredita-se que o adrenoceptor  $\alpha_{1L}$  é uma manifestação fenotípica do adrenoceptor  $\alpha_{1A}$ , uma vez que os adrenoceptores  $\alpha_{1L}$  não são encontrados em camundongos nocautes para o gene que codifica o adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  (Daniels *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2008; Muramatsu *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos realizados com agonistas adrenérgicos e colinérgicos na intensificação de contrações espontâneas dos túbulos epididimários de rato indicaram um envolvimento mais proeminente de receptores adrenérgicos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em relação a receptores muscarínicos (Hib, 1976; Pholpramool *et al.*, 1984). Posteriormente, o efeito contrátil de agonistas adrenérgicos no epidídimo de rato foi creditado principalmente à ativação de adrenoceptores  $\alpha$  (Pholpramool and Triphrom, 1984) e especificamente pela ativação de adrenoceptores  $\alpha_1$  sem o



envolvimento de adrenoceptores  $\alpha_2$  (Ventura and Pennefather, 1991, 1994). Entretanto, experimentos de micropuntura *in vivo* realizados mediante o uso de agonistas e antagonistas de adrenoceptores  $\alpha$  sugerem o envolvimento de adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  nas respostas contráteis da cauda do epidídimo de rato, principalmente na região proximal da cauda do epidídimo. (Chaturapanich *et al.*, 2002).

Estudos moleculares identificaram a presença de transcritos (mRNA) codificando cada um dos três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  ao longo do epidídimo de rato, com a predominância do transcrito  $\alpha_{1a}$  na região da cabeça e maior abundância dos  $\alpha_{1a}$  e  $\alpha_{1d}$  mRNAs na região da cauda (Queiroz *et al.*, 2002). Além disso, o mesmo estudo demonstrou a predominância da expressão do adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  na região da cabeça e da cauda do epidídimo por experimentos de ligação do [ $^3$ H]Prazosin em preparação de membrana destas regiões do epidídimo. Em concordância com esses dados, ensaios de imunohistoquímica detectaram a presença de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  nas células de músculo liso, em volta dos túbulos epididimários e vasos sanguíneos, e em subpopulações de células epiteliais da região da cabeça e da cauda do epidídimo com uma maior abundância na região da cauda do epidídimo (Queiroz *et al.*, 2008).

Apesar de alguns estudos já terem descrito o perfil de expressão molecular dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  presentes na cauda do epidídimo, a identidade dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  envolvidos nas repostas contráteis do músculo liso da cauda proximal e distal do epidídimo de rato ainda é desconhecida.

Devido a importante função da cauda do epidídimo no processo de transporte de espermatozóides e na emissão do ejaculado, o entendimento do papel funcional e fisiológico dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  presentes na cauda

do epidídimo é importante, uma vez que drogas atuantes sobre estes receptores podem afetar a fertilidade masculina.

**Objetivos**

Os objetivos específicos da presente dissertação foram:

- Quantificar a expressão de mRNA dos três subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  na cauda proximal e distal do epidídimo de rato.
- Investigar a distribuição protéica dos subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  na cauda proximal e distal do epidídimo de rato através de ensaios de competição da ligação do radioligante [ $^3$ H]Prazosin com ligantes seletivos.
- Caracterizar farmacologicamente os subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  envolvidos na contração da cauda proximal e distal do epidídimo de rato.

**Material e métodos**

## **1. Animais**

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos (15 a 20 semanas de idade) provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP de Botucatu. Os animais foram mantidos em condições de luz (12/12 h claro/escuro) e temperatura controladas (22-25°C) com livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais de Experimentação da UNESP – BOTUCATU (Protocolo nº 294-CEEA).

## **2. Isolamento dos tecidos**

Os ratos foram decapitados com o uso de guilhotina e os epidídimos juntamente com um segmento do ducto deferente foram retirados. Após o isolamento da região da cauda do epidídimo, o túbulo epididimário correspondente a porção proximal (região 6) ou distal (região 7) da cauda do epidídimo de rato distinguidos segundo Hinton *et al* (Hinton et al., 1979) foram separados (Figura 1A). Posteriormente, os túbulos de ambas as regiões foram cuidadosamente desenovelados e limpos de seus tecidos adjacentes. Através do uso de uma seringa contendo solução nutritiva, o lúmen dos túbulos epididimários foi lavado e preparado para posterior uso nos experimentos descritos abaixo.

## **3. Experimento de transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)**

### **3.1 Extração do RNA total**

Os tecidos isolados de ambas as regiões (n=8 por região) da cauda do epidídimo de quatro ratos foram colocados em tubos estéreis de 15 ml, com adição

de 1 ml de Trizol (Invitrogen Life Technologies®). Posteriormente, as amostras foram congeladas em freezer a -80°C até a realização da extração do RNA total.

A extração do RNA total foi realizada pelo protocolo Trizol com pequenas modificações segundo os seguintes procedimentos: as amostras foram descongeladas, trituradas (Polytron UltraTurrax T-25) e mantidas a temperatura ambiente por um período de 5 minutos seguido da adição de 200 µl de clorofórmio gelado. Em seguida, as amostras foram agitadas por 15 segundos e mantidas no gelo por mais 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g (12000 rpm) por 15 minutos à 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi retirada do tubo e transferida para um tubo estéril com 500 µl de isopropanol. Em seguida, a mistura formada foi mantida a -20°C por um período mínimo de 20 minutos e centrifugada a 19.000 x g (14000 rpm) por 10 minutos à 4°C. O precipitado formado foi separado do sobrenadante e adicionado 1 ml de etanol 75% gelado. Após a adição do etanol, a amostra foi homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante formado foi descartado e o material precipitado foi seco em temperatura ambiente.

Posteriormente, 10 µl de água foi adicionado ao precipitado para a ressuspensão e dissolução do RNA total.

As concentrações de RNA total de todas as amostras foram mensuradas por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®).

### **3.2 Transcrição reversa**

Com o propósito de eliminar a contaminação por DNA genômico, o RNA total das amostras foi tratado com DNase I (Invitrogen®). O volume correspondente a 1 µg de RNA foi transferido para um tubo estéril e adicionou-se 1 µl de tampão de

DNase, 1 µl de DNase e água suficiente para completar um volume final de 10 µl. Em seguida, a solução foi mantida por 15 minutos à temperatura ambiente e acrescentados 1 µl de EDTA (25 mM). Posteriormente, a solução foi incubada a 65°C por 10 minutos. A transcrição reversa foi realizada segundo o protocolo SuperScript III (Invitrogen®). Em suma, ao RNA tratado com DNase de cada amostra foram adicionados 1 µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dt), 1 µl de dNTP Mix e 3 µl de água. Em seguida, a solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e à seguir mantida em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados à solução 4 µl de tampão “First Strand” 5X, 1 µl de DTT (0,1M), 1 µl de Superscript III e 1 µl de “RNaseOUT Inhibitor”. A solução formada foi sequencialmente incubada a 50°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e armazenadas a -20°C até a utilização no PCR.

### 3.3 Oligonucleotídeos iniciadores

A reação de PCR em tempo real foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os 3 subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  do rato. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram obtidas de Yono e colaboradores (Yono et al., 2008) e estão disponíveis no GenBank (Tabela 1).

**Tabela1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real, tamanho dos produtos de PCR formados e número de acesso do mRNA dos 3 subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ .

mRNA		Sequencia (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)	Nº acesso
Adrenoceptor $\alpha_{1A}$	Sense	CGAGTCTACGTAGTAGCC	203	NM_017191
	Antisense	GTCTTGGCAGCTTTCTTC		
Adrenoceptor $\alpha_{1B}$	Sense	ATCGTGGCCAAGAGGACC	201	NM_016991
	Antisense	TTTGGCTGCTTTCTTTTC		



Adrenoceptor $\alpha_{1D}$	Sense	CGCGTGTACGTGGTCGCAC	219	NM_024483
	Antisense	CTTGGCAGCCTTTTTTC		

pb (pares de base)

### 3.4 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, contendo em cada poço: 12,5  $\mu$ l 2x Syber Green, 9,5  $\mu$ l de água, 1 $\mu$ l de oligonucleotídeo iniciador (200nM-300nM) sense e antisense respectivo ao subtipo de adrenoceptor  $\alpha_1$  a ser investigado e 1 $\mu$ l do cDNA das amostras, completando um volume total de 25  $\mu$ l. Durante 40 ciclos de PCR, as condições de amplificação foram ciclicamente alternadas, como se segue: desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos. A detecção foi realizada através do aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem). As amostras foram analisadas em duas placas, uma contendo o cDNA proveniente da cauda distal do epidídimo de rato e outra contendo o cDNA da cauda proximal. Desta maneira, cada placa permitiu a quantificação da expressão dos 3 subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  correspondente a uma única região. Para tanto, para cada placa foi construída uma curva padrão para cada um dos três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ . Controles negativos (água estéril) foram adicionados em ambas as placas. Todas as amostras utilizadas na reação foram analisadas em duplicata. A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores foi verificada pela curva de dissociação.

### 3.5 Geração das curvas padrão

As curvas padrão foram geradas a partir da diluição seriada dos produtos de PCR purificados de cada um dos três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ .

Em suma, uma das amostras obtidas da cauda distal do epidídimo de rato foi selecionada aleatoriamente e submetida a uma reação de PCR em tempo real (descrição acima). Após a reação de PCR os produtos dos 3 subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. As amostras foram visualizadas e o tamanho do fragmento observado correspondeu ao esperado. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit Invisorb<sup>®</sup> Fragment CleanUp – STRATEC Molecular segundo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram quantificados por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop<sup>®</sup>) e armazenados a -20°C até a sua utilização.

No total seis diluições seriadas dos produtos purificados de PCR foram utilizadas para a confecção da curva padrão. Os valores absolutos das diluições dos produtos purificados de PCR variaram aproximadamente entre 32.000 – 3.200.000 cópias/ $\mu$ l. As curvas padrão foram obtidas pela plotagem dos valores de Threshold Cycle (Ct) no eixo-Y e o log da concentração (cópias/ $\mu$ l) dos produtos purificados de PCR no eixo-X. Posteriormente, a curva padrão foi analisada por uma regressão linear.

O número de cópias foi determinado pela seguinte fórmula (Godornes et al., 2007):

Número de cópias /  $\mu$ l =

$$\frac{6.022 \times 10^{23} \text{ (moléculas / mole)} \times \text{DNA (g / } \mu\text{l)}}{\text{número de pares de base} \times 660 \text{ daltons}}$$

Onde,

$6.022 \times 10^{23}$  (moléculas/mole): número de Avogrado

660 Da: peso médio de um par de bases

### **3.6 Eficiência de amplificação**

O valor de inclinação da reta obtido pela regressão linear de cada curva padrão gerada foi utilizado para se calcular a eficiência ( $E$ ) de amplificação do PCR de acordo com a seguinte equação (Dhanasekaran et al., 2010):

$$E = 10^{(-1/\text{inclinação})} - 1$$

### **3.7 Quantificação absoluta das amostras**

A quantificação absoluta foi determinada pela relação dos valores de  $C_t$  obtidos de cada amostra de um dos 3 subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  amplificados com a sua respectiva curva padrão gerada por interpolação na regressão linear obtida.

## **4. Experimentos de ligação do radioligante [ $^3\text{H}$ ]Prazosin em segmentos de tecido intacto**

Os experimentos com radioligante em segmentos de tecido intacto foram realizados como descrito previamente por (Muramatsu et al., 2005). Em resumo, os túbulos epididimários isolados da porção proximal ou distal da cauda do epidídimo de rato foram cortados em pequenos segmentos (3 mm). Cada segmento foi incubado com [ $^3\text{H}$ ]Prazosin por 16 a 18 h à 4°C em 250  $\mu\text{l}$  de solução tampão de Krebs (135.7 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10.5 mM  $\text{NaHCO}_3$  e 11.5 mM glicose, pH 7,4).

Nos experimentos de saturação da ligação foram utilizadas concentrações crescentes de [ $^3\text{H}$ ]Prazosin (20-2000 pM) e as curvas de competição foram realizadas com [ $^3\text{H}$ ]Prazosin 350 pM. Após o período de incubação, os segmentos de tecidos foram rapidamente secos em papel de filtro, transferidos para tubos de

plásticos contendo 1.5 ml de solução tampão de Krebs a 4 °C e gentilmente agitados por 1 minuto a 1200 rpm. Posteriormente, os segmentos de tecidos foram secos em papel de filtro e solubilizados em 500 µl de solução 0.3 M de NaOH a 37°C. Durante o período de solubilização, os tubos foram fortemente agitados várias vezes. Os segmentos de tecidos demoraram cerca de 24h para a completa solubilização. A medição da radioatividade foi realizada com alíquotas de 100 µl de cada amostra dissolvida com a adição de 4 ml de líquido de cintilação (Optiphase Hi Safe 3, Perkin Elmer). A contagem da radiação foi realizada em um contador de cintilação líquida. A ligação específica foi determinada pela subtração da quantidade de ligação radioativa mensurada na presença de fentolamina 100 µM da ligação radioativa total mensurada por mg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata para cada concentração do [<sup>3</sup>H]Prazosin usado nos experimentos de saturação. A abundância de adrenoceptores α<sub>1</sub> foi representada pela ligação máxima obtida pelo total de proteína mensurada no tecido (fmol por mg total de proteína no tecido). A quantidade de proteína total de cada segmento de tecido foi mensurada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976; Ernst and Zor, 2010).

## **5. Estudos de contração *in vitro***

Os túbulos epididimários correspondentes às porções proximal ou distal da cauda do epidídimo foram cortados em segmentos de aproximadamente 1,5 cm de comprimento e utilizados para a realização do registro digital de tensão isométrica. Os tecidos isolados foram mantidos em câmaras musculares de 10 ml contendo solução nutritiva de Tyrode modificada (Picarelli et al., 1962) com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5.7; CaCl<sub>2</sub> 1.8; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.36; NaHCO<sub>3</sub> 15 e

glicose 5.5, pH 7,4). A solução nutritiva foi diluída em água destilada e aerada continuamente com uma mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), pH 7,4 a 30°C.

Posteriormente os túbulos epididimários foram distendidos a uma tensão basal de 0.5 g (região proximal) ou 1 g (região distal) e deixados estabilizar por um período de 30 minutos, com troca periódica da solução de Tyrode a cada 15 minutos. Em seguida, “choques” de KCl (80mM) foram realizados para determinar a viabilidade e proporcionar a estabilização da resposta máxima do tecido.

Após um período de 30 minutos de repouso, duas curvas concentração-resposta à noradrenalina foram construídas nos túbulos epididimários pela adição cumulativa da droga ao banho com um intervalo mínimo de 45 minutos entre elas para checar a reprodutibilidade das contrações. A segunda curva concentração-resposta à noradrenalina foi considerada a curva controle.

Após a construção da segunda curva concentração-resposta à noradrenalina (curva controle), curvas concentração-resposta à noradrenalina foram realizadas na presença de concentrações crescentes dos antagonistas seletivos prazosin ( $\alpha_1$ -AR seletivo), ioimbina ( $\alpha_2$ -AR seletivo), 5-methylurapidil ( $\alpha_{1A}$ -AR seletivo), RS 100329 ( $\alpha_{1A}$ -AR seletivo) e BMY 7378 ( $\alpha_{1D}$ -AR seletivo).

Todos antagonistas foram adicionados ao banho após o término da construção da curva concentração-resposta controle e deixados em contato com o tecido por pelo menos 45 minutos até a construção das curvas concentração-resposta à noradrenalina seguinte.

Todas as curvas concentração-resposta à noradrenalina foram realizadas na presença de um coquetel com cocaína (3  $\mu$ M), cortisona (10  $\mu$ M) e propranolol (0.1  $\mu$ M) para o bloqueio dos processos de captação neuronal, extraneuronal e adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , respectivamente.

## **6. Análise dos dados**

Nos experimentos com radioligante, os dados obtidos com os estudos de competição foram primeiramente analisados para o modelo de um sítio de ligação e posteriormente para o modelo de dois sítios de ligação utilizando o programa de microcomputador GraphPad Prism (Versão 5.00, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Se a soma residual dos quadrados foi significativamente menor para a análise de dois sítios do que a de um sítio ( $p < 0,05$ ), o modelo de dois sítios foi aceito (teste F para comparação).

As curvas concentração-resposta obtidas nos experimentos funcionais foram normalizadas pela porcentagem da resposta máxima da segunda curva concentração-resposta de noradrenalina construída (curva controle). A potência da noradrenalina estimada nas diferentes condições foi apresentada como o valor de  $pEC_{50}$ , o negativo do logaritmo da concentração efetiva do agonista que é capaz de produzir 50% da resposta máxima. As afinidades dos antagonistas ( $pK_B$ ) foram determinadas por análise de Schild (Arunlakshana and Schild, 1959).

Todos os dados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad PRISM (Versão 5.00, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Os valores foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de  $n$  experimentos. As diferenças entre os valores médios foram analisadas através do teste  $t$  de Student não pareado, ou Anova seguido de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ .

## **7. Drogas e reagentes**

Prazosin (prazosin hydrochloride), propranolol (( $\pm$ )-propranolol hydrochloride), loimbina (Yoimbine), BMY 7378, 5-methylurapidil, Research Biochemicals

International (Natick, MA, USA); RS 100329, Tocris Bioscience (Bristol, UK); Acetato de cortisona (Cruz Vermelha); Noradrenalina ((L)-(-)-Norepinephrine bitartrate salt monohydrate), Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Cocaína (cocainum hydrochloricum puriss), (Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Germany).

**Resultados**



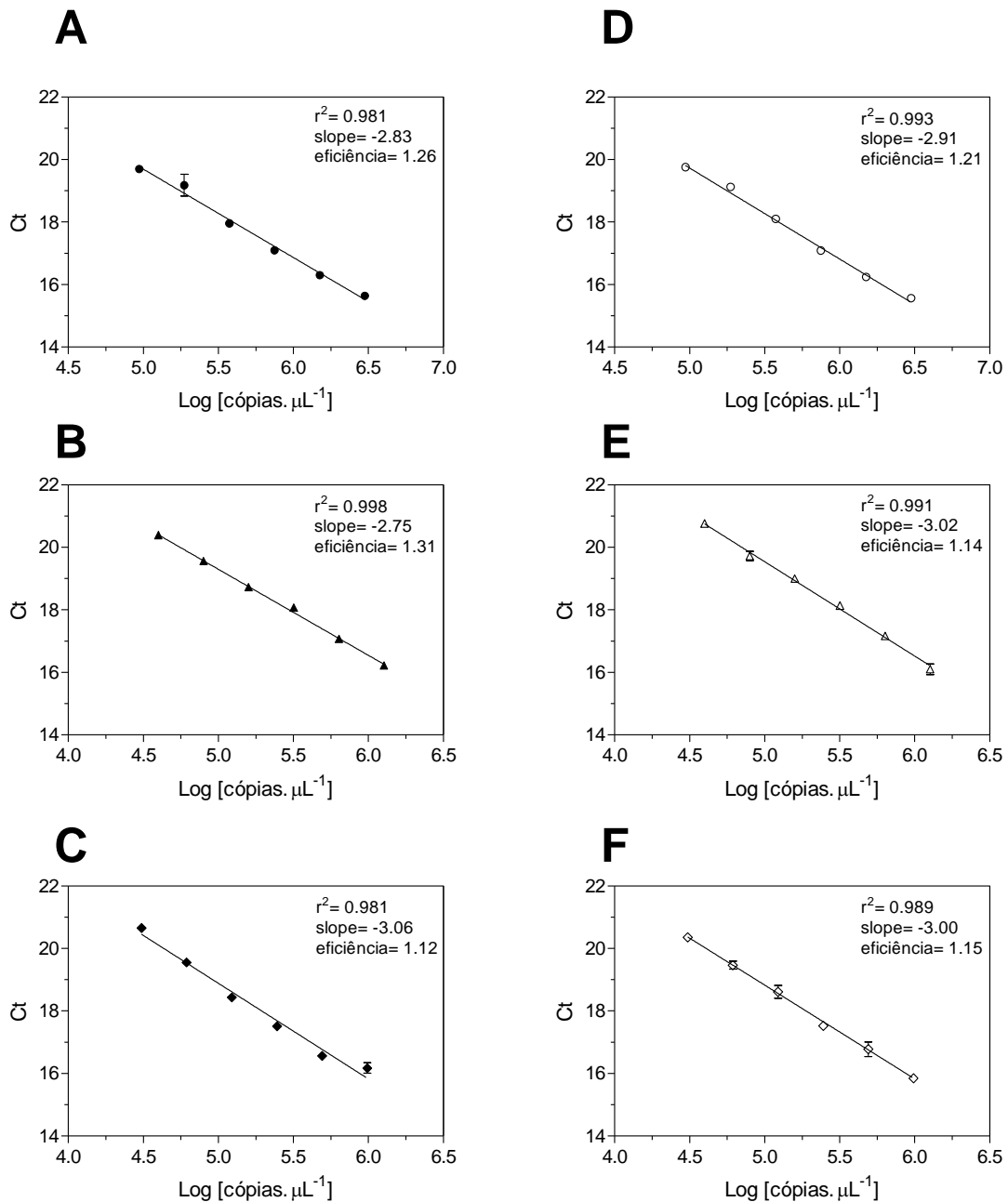
## 1. Expressão de mRNA para os subtipos de adrenocetores $\alpha_1$ na cauda do epidídimo de rato

A quantificação absoluta pela técnica de PCR em tempo real pode ser conveniente, pois permite a comparação da expressão de mRNA dos diferentes subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$ . Entretanto, é necessária a construção de uma curva padrão para cada um dos 3 subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$ . Na figura 2 estão representadas as curvas padrão construídas a partir do produto purificado da reação de PCR dos subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$ . As curvas padrão apresentaram coeficiente de correlação ( $r^2$ ) médio de 0.989. A eficiência de amplificação do PCR variou entre as curvas com uma média de inclinação de -2.93 (Figura 2). Não houve diferença entre as inclinações das retas geradas a partir da curva padrão ( $p>0,05$ ).

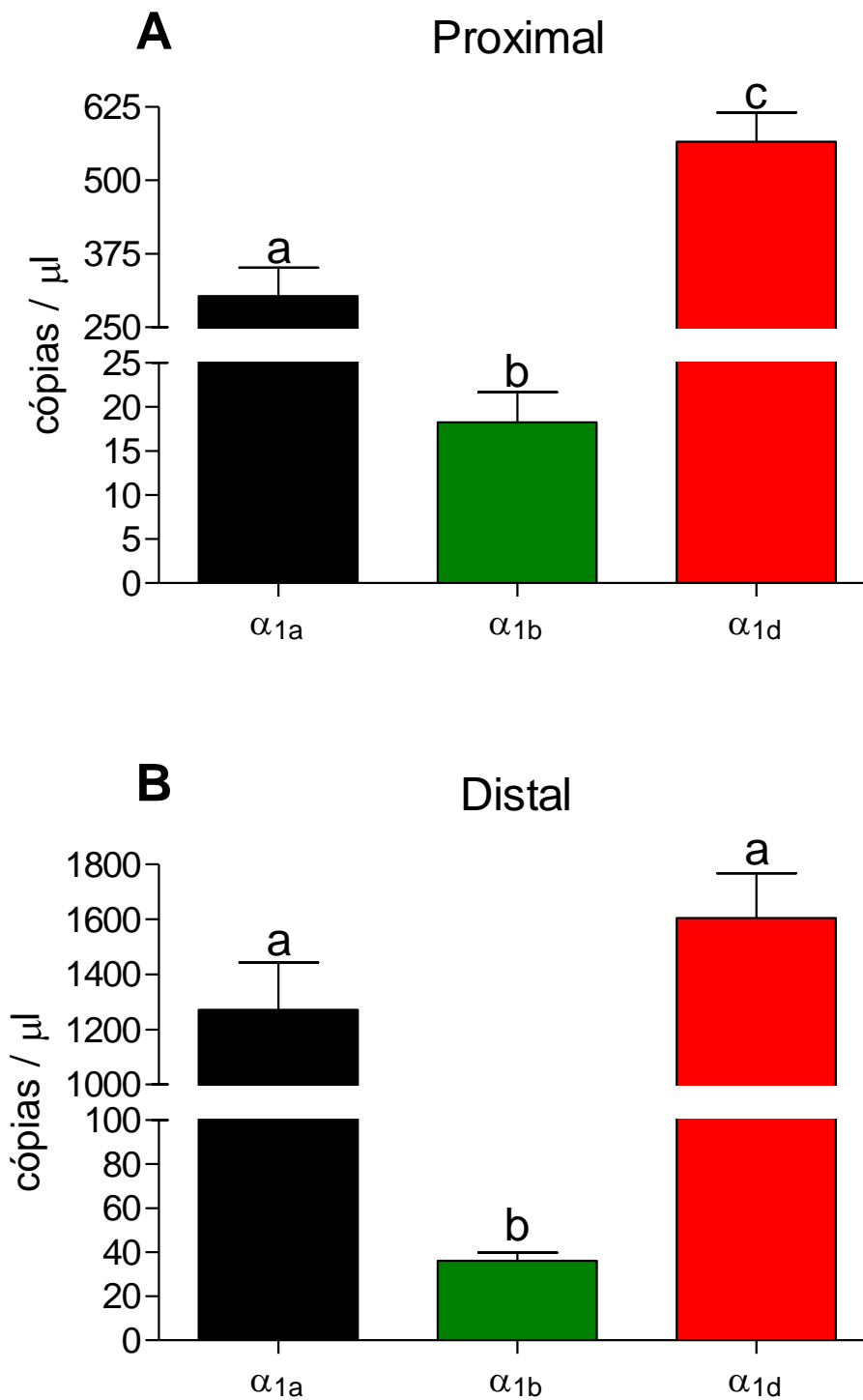
Estabelecidos os parâmetros das curvas padrão, os valores de Ct obtidos das reações de amplificação dos cDNAs das regiões proximal e distal da cauda do epidídimo de rato foram interpolados na regressão linear correspondente a sua curva padrão e quantificados em cópias por  $\mu$ l de DNA. Os resultados obtidos mostram a expressão de mRNA dos três subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  na cauda distal e proximal do epidídimo de rato. Entretanto, há diferenças na expressão dos subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  (Fig. 3;  $p<0,05$ ). A Figura 3A mostra a expressão de mRNA que codifica cada um dos subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  na porção proximal da cauda do epidídimo de rato. Os dados obtidos mostram diferentes níveis absolutos de mRNA entre os subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  na proporção de  $\alpha_{1d} > \alpha_{1a} > \alpha_{1b}$  ( $P<0,05$ ).

Na Figura 3B é mostrada a expressão de mRNA codificante para os subtipos de adrenocetores  $\alpha_1$  presentes na cauda distal do epidídimo de rato. Os níveis

absolutos de mRNA obtidos foram diferentes entre os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  na proporção de  $\alpha_{1a} = \alpha_{1d} > \alpha_{1b}$  ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Curvas padrão construídas com os produtos de PCR purificados dos adrenoceptores  $\alpha_{1a}$  (A e D),  $\alpha_{1b}$  (B e E) e  $\alpha_{1d}$  (C e F) da cauda proximal (A, B e C) e distal (D, E e F) do epidídimo de rato. Cada símbolo representa a média  $\pm$  epm de 8 amostras de 4 ratos.



**Figura 3.** Expressão absoluta do mRNA codificadores dos 3 subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  na cauda proximal (A) e distal (B) do epidídimo de rato. Dados apresentados como média  $\pm$  epm de 8 amostras provenientes de 4 ratos. Diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

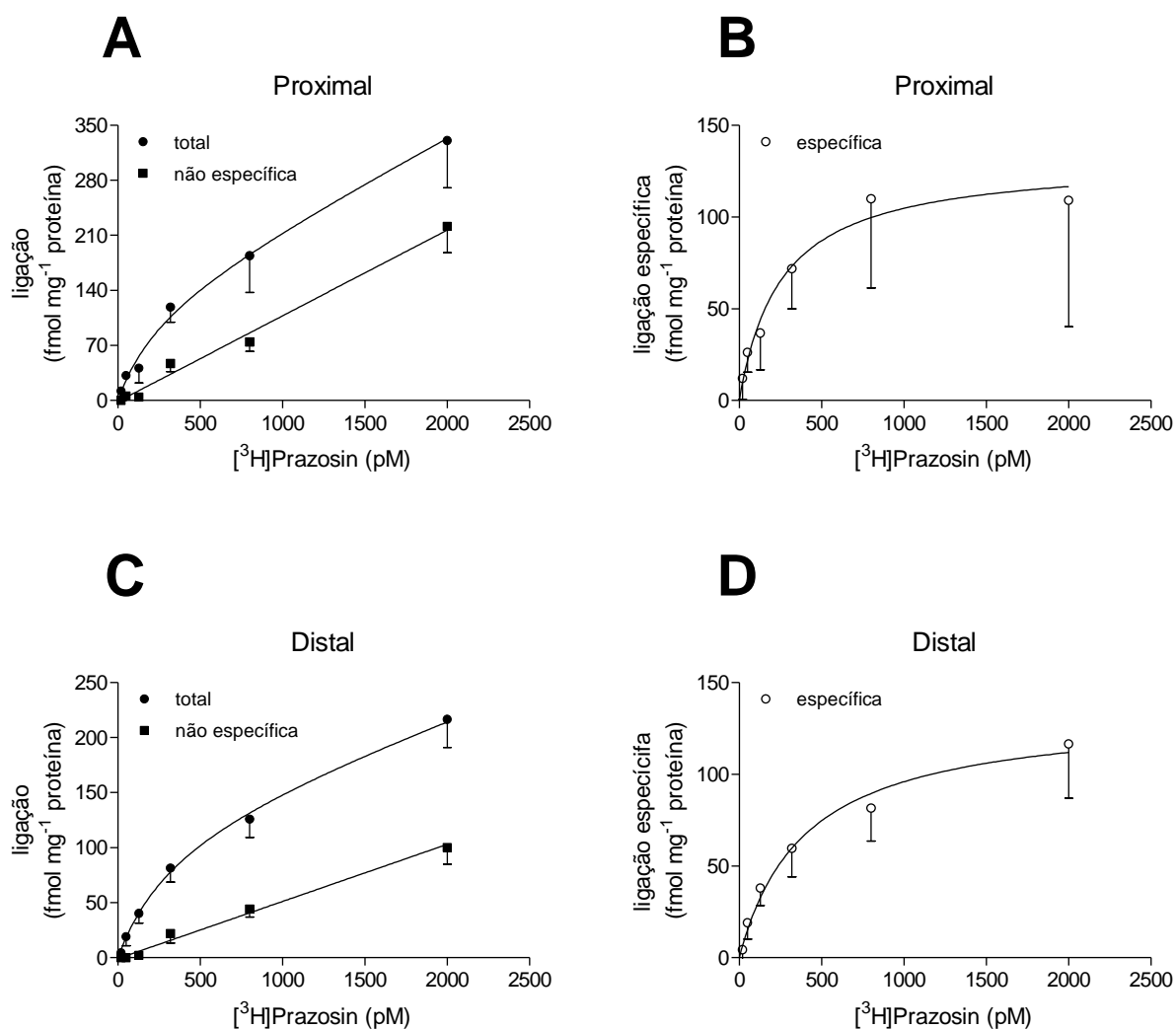
## 2. Experimentos de ligação com o radioligante [<sup>3</sup>H]Prazosin em segmentos de tecidos intactos na cauda proximal e distal do epidídimo de rato

### 2.1 Saturação da ligação

O radioligante [<sup>3</sup>H]Prazosin (20-2000 pM) se ligou de maneira concentração-dependente aos segmentos da cauda proximal do epidídimo de rato (Fig. 4A-B) com ligação inespecífica de  $\cong 25\%$  da ligação total na concentração de 320 pM (próxima àquela correspondente a constante de dissociação no equilíbrio,  $K_D$ ). O coeficiente de Hill estimado foi aproximado da unidade (1.06), indicando que a ligação específica do [<sup>3</sup>H]Prazosin é condizente com um único sítio. A constante de dissociação ( $pK_D$ ) e a máxima capacidade de ligação ( $B_{MAX}$ ) calculadas foram de  $9.59 \pm 0.28$  pM e  $132 \pm 41$  fmol.mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente (n=6).

Nos segmentos de tecido intacto da cauda distal do epidídimo de rato, o radioligante [<sup>3</sup>H]Prazosin (20-2000 pM) também se ligou de maneira concentração-dependente (Fig. 4C-D). A ligação inespecífica na concentração de 320 pM foi de  $\cong 30\%$  da ligação total e o coeficiente de Hill calculado foi próximo da unidade teórica (0.75). A constante de dissociação ( $pK_D$ ) e a máxima capacidade de ligação ( $B_{MAX}$ ) foram de  $9.40 \pm 0.21$  pM e  $134 \pm 28$  fmol.mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente (n=7).

Os dados obtidos indicam a presença de densidades semelhantes de adrenoceptores  $\alpha_1$  em segmentos proximais e distais da cauda do epidídimo de rato. Além disso, não houve diferença significativa entre os valores de  $pK_D$  nas regiões investigadas (Tabela 2).



**Figura 4.** Curva de saturação da ligação do  $[^3\text{H}]$ Prazosin em segmentos de tecido intacto na cauda proximal (A, B) e distal da cauda do epidídimo de rato (C, D). Cada símbolo representa a média  $\pm$  epm de 6 ou 7 experimentos.

**Tabela 2.** Valores da constante de dissociação ( $\text{pK}_D$ ) e máxima capacidade de ligação ( $B_{\text{MAX}}$ ) do  $[^3\text{H}]$ Prazosin na cauda do epidídimo de rato.

Região	$\text{pK}_D$	$B_{\text{MAX}}$ ( $\text{fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína)
Proximal	$9.59 \pm 0.28$	$132 \pm 41$
Distal	$9.40 \pm 0.21$	$134 \pm 28$

Valores estão apresentados como média  $\pm$  epm de 6 ou 7 experimentos.

## 2.2 Análises da ligação competitiva

Com o objetivo de investigar os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  presentes na cauda do epidídimo de rato, curvas de competição foram realizadas através da utilização de ligantes seletivos.

As curvas de competição da ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin pelos ligantes seletivos realizadas na presente dissertação estão representadas na figura 5 e 6 para as regiões proximal e distal da cauda do epidídimo de rato, respectivamente.

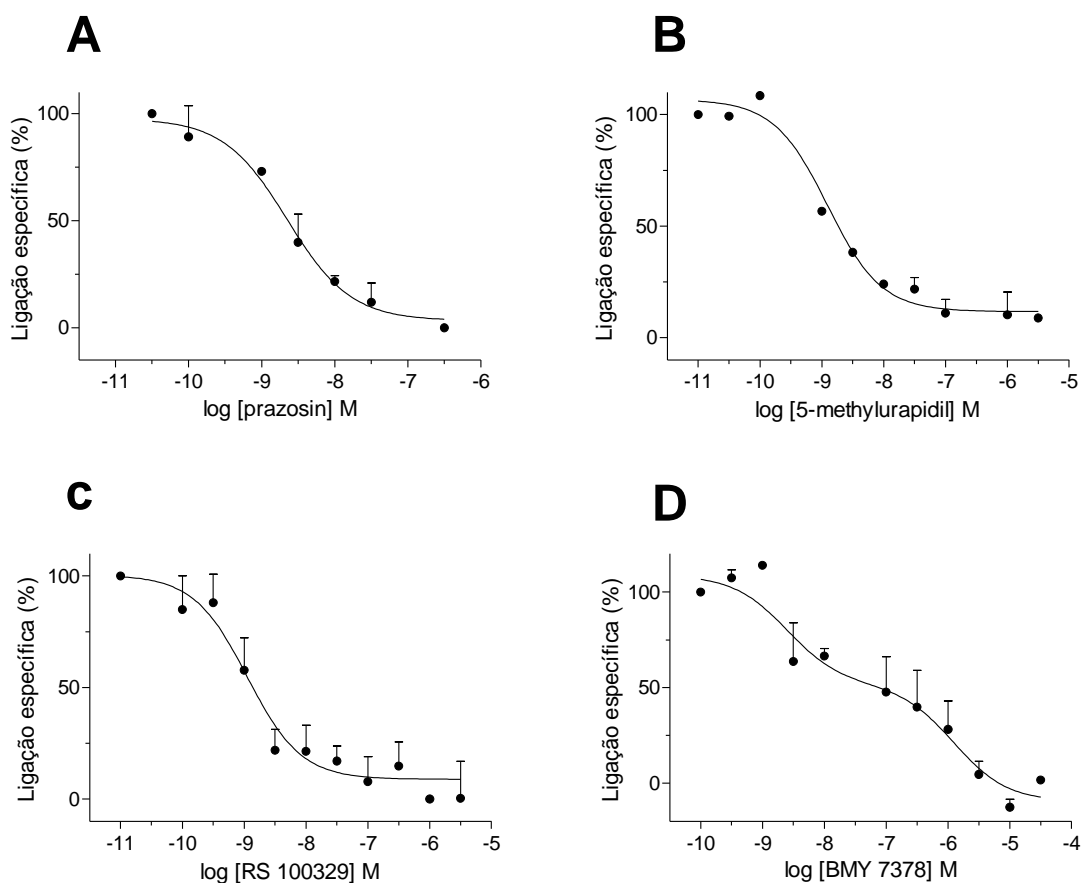
O ligante prazosin (não seletivo para os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ ) inibiu toda a ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin com afinidade condizente à esperada para os 3 subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ . A curva de competição foi monofásica indicando a presença de um único sitio de ligação para este ligante na cauda do epidídimo de rato (Fig. 5A e 6A).

Os ligantes 5-methylurapidil e RS 100329 (seletivos para o subtipo de adrenoceptor  $\alpha_{1A}$ ) foram capazes de inibir toda a ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin com afinidades semelhantes às aquelas encontradas para o subtipo de adrenoceptor  $\alpha_{1A}$ . As curvas de competição foram monofásicas indicando um único sítio de ligação em ambos ligantes (Fig. 5B-C e Fig. 6B-C).

O ligante BMY 7378 (seletivo para o adrenoceptor  $\alpha_{1D}$ ) foi capaz de inibir totalmente a ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin. Entretanto, a competição foi bifásica indicando a presença de dois sítios de ligação: um de alta afinidade condizente com aquela esperada para o subtipo de adrenoceptor  $\alpha_{1D}$  e outro de baixa afinidade condizente com aquelas encontradas para os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1B}$ . As proporções dos sítios de alta afinidade foram de 49% para a região proximal e 52% para a região distal da cauda do epidídimo de rato (Fig. 5D e Fig. 6D).

As afinidades estimadas dos ligantes seletivos utilizados no presente trabalho indicam a presença proporções semelhantes de proteínas correspondentes aos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$  em ambas as regiões da cauda do epidídimo de rato. Os valores de pKi obtidos na cauda proximal e distal do epidídimo de rato estão apresentados na tabela 3 (região proximal) e 4 (região distal), respectivamente.

Para facilitar a interpretação dos dados, os valores de pKi estimados na cauda do epidídimo de rato são comparados com valores de pKi retirados da literatura para cada um dos três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  recombinantes (Tabela 5).



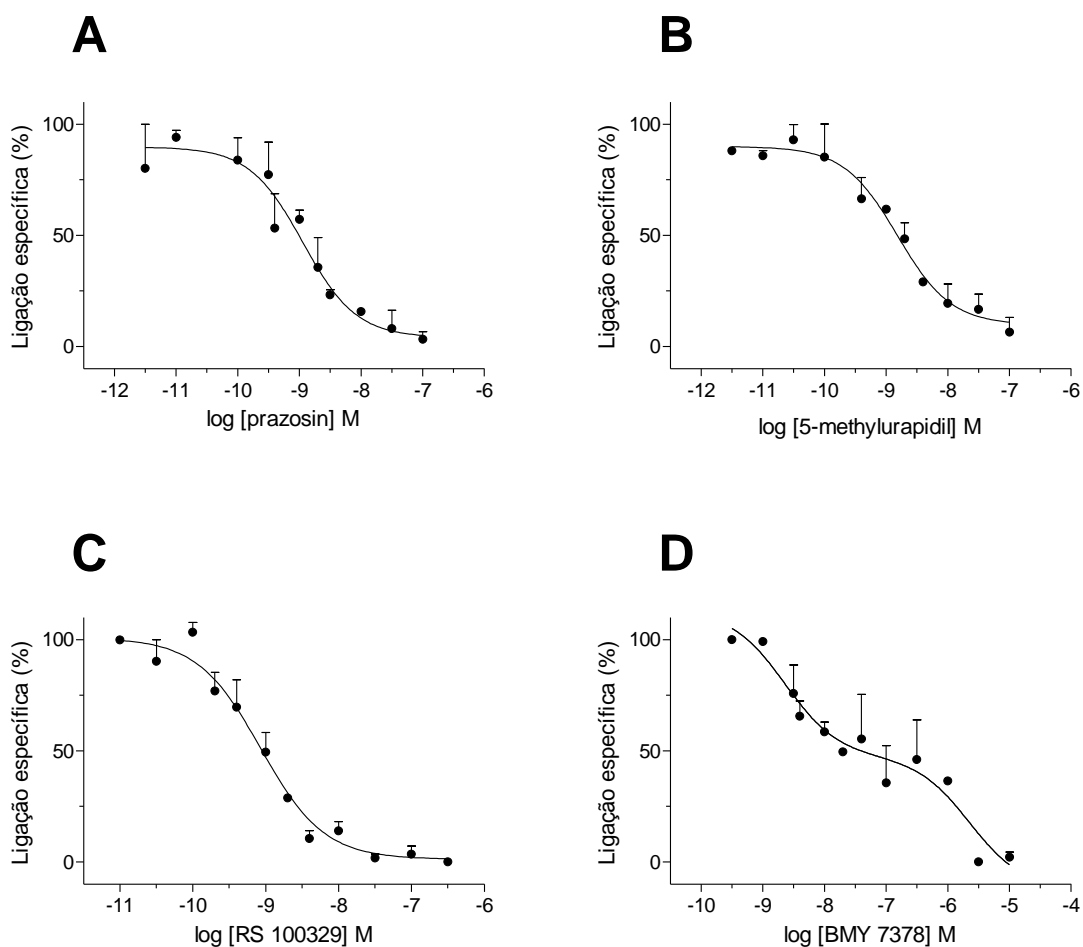
**Figura 5.** Curvas de competição da ligação específica do [<sup>3</sup>H]Prazosin pelos ligantes prazosin (A), 5-methylurapidil (B), RS 100329 (C) e BMY 7378 (D) na cauda proximal do epidídimo de rato. Cada ponto representa a média ± epm de 3-4 experimentos.

**Tabela 3.** Afinidades estimadas (pKi) para os ligantes de adrenoreceptores  $\alpha_1$  em segmentos de tecido intacto na cauda proximal do epidídimo de rato e respectivos coeficientes de Hill (nHill).

	pKi (maior)	pKi (menor)	-nHill
Prazosin	9.03±0.17	-	0.84±0.17
5-Methylurapidil	9.28±0.12	-	0.80±0.16
RS 100329	9.32±0.18	-	0.83±0.17
BMY 7378	8.98±0.47	6.28±0.42	0.53±0.12

Valores estão apresentados como média ± epm de 3-4 experimentos.





**Figura 6.** Curvas de competição da ligação específica do [<sup>3</sup>H]Prazosin pelos ligantes prazosin (A), 5-methylurapidil (B), RS 100329 (C) e BMY 7378 (D) na cauda distal do epidídimo de rato. Cada ponto representa a média ± epm de 4-5 experimentos.

**Tabela 4.** Afinidades estimadas (pKi) para os ligantes de adrenoreceptores α<sub>1</sub> em segmentos de tecido intacto na cauda distal do epidídimo de rato e respectivos coeficientes de Hill (nHill).

	pKi (maior)	pKi (menor)	-nHill
Prazosin	9.22±0.16	-	0.83±0.13
5-Methylurapidil	9.09±0.17	-	0.84±0.08
RS 100329	9.34±0.10	-	1.01±0.13
BMY 7378	8.91±0.39	5.92±0.57	0.42±0.08

Valores estão apresentados como média ± epm de 4-5 experimentos.

**Tabela 5.** Afinidades dos ligantes de adrenoceptores  $\alpha_1$  na cauda do epidídimo de rato e em células recombinantes expressando cada um dos 3 subtipos dos adrenoceptores  $\alpha_1$  recombinantes.

	Proximal		Distal		pKi <sup>(*)</sup>		
	pKi (maior)	pKi (menor)	pKi (maior)	pKi (menor)	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1B}$	$\alpha_{1D}$
Prazosin	9.03±0.17	-	9.22±0.16	-	9.00	9.90	9.50
5-Methylurapidil	9.28±0.12	-	9.09±0.17	-	9.02	7.14	7.72
RS 100329	9.36±0.17	-	9.34±0.10	-	9.60	7.50	7.90
BMY 7378	8.98±0.47	6.28±0.42	8.9±0.39	5.9±0.57	7.04	6.92	8.59

Valores estão apresentados como média  $\pm$  epm de 3-5 experimentos.

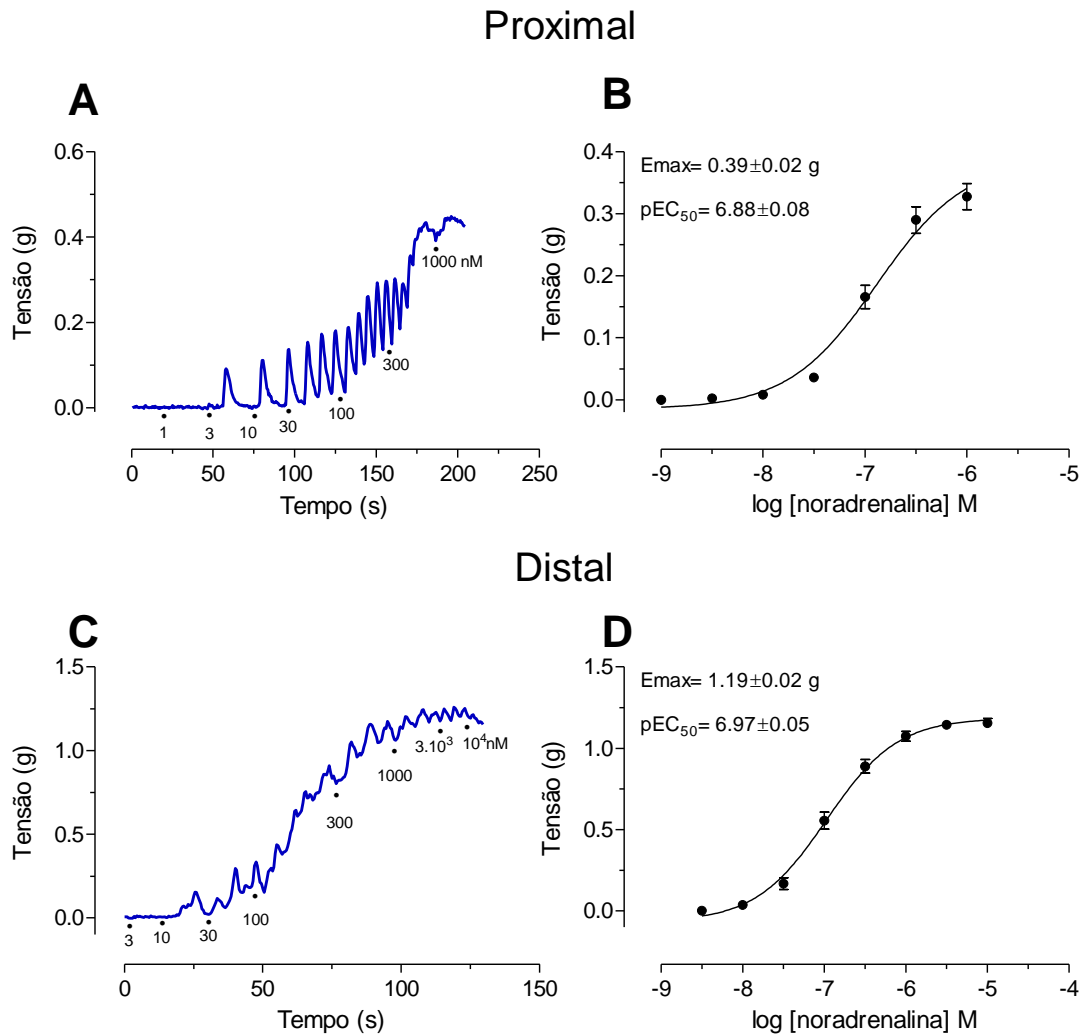
\* Valores retirados de Nojimoto *et al.* e Williams *et al.* (Nojimoto et al., 2010; Williams et al., 1999)

### **3. Estudos de contração**

#### **3.1 Contrações da cauda do epidídimo de rato à noradrenalina**

A noradrenalina induziu contrações concentração-dependente na cauda do epidídimo de rato. A contração induzida pela noradrenalina é exemplificada por um registro típico obtido da região proximal (Figura 7A) e distal (Figura 7C).

A análise das curvas concentração-resposta à noradrenalina obtidas na cauda proximal do epidídimo de rato apresentaram um valor de  $pEC_{50}$   $6.88 \pm 0.08$  e resposta máxima de  $0.39 \pm 0.02$  g (Figura 7B) enquanto que na cauda distal do epidídimo de rato o valor de  $pEC_{50}$  foi  $6.97 \pm 0.05$  e resposta máxima de  $1.19 \pm 0.02$  (Figura 7D).



**Figura 7.** Registro digital representativo de contrações induzidas pela adição cumulativa de noradrenalina na região proximal (A) e distal (C) da cauda do epidídimo de rato. Os pontos pretos representam o tempo e as concentrações de noradrenalina que foram adicionadas ao banho. Em B e D curva concentração-resposta à noradrenalina na porção proximal e distal da cauda do epidídimo de rato. Símbolo representa a média  $\pm$  epm de 24 e 25 diferentes tecidos.

### 3.2 Efeito dos antagonistas nas contrações induzidas pela noradrenalina

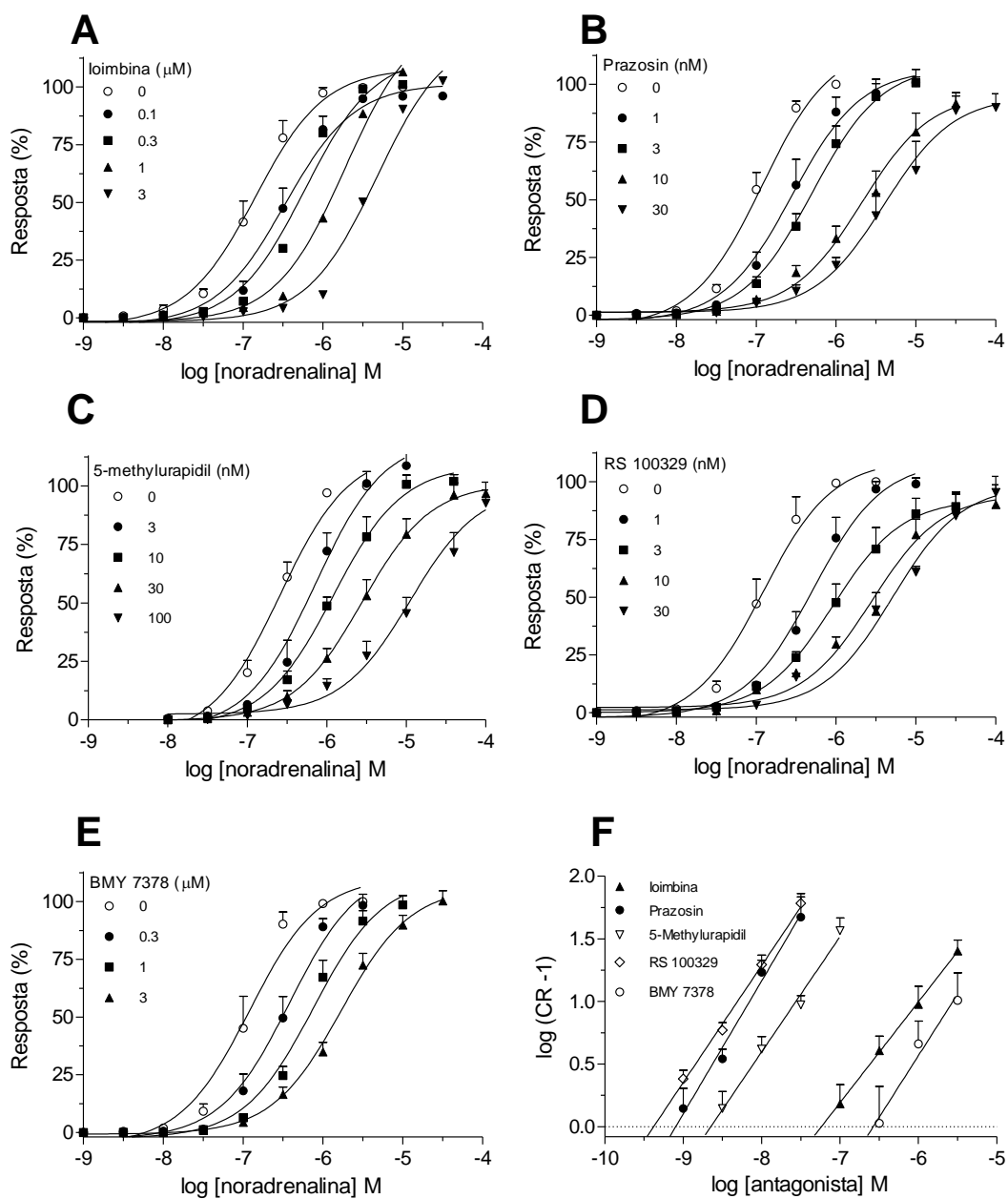
Após a caracterização do efeito da noradrenalina na cauda do epidídimo de rato, o presente trabalho procurou identificar quais adrenoceptores  $\alpha$  estavam envolvidos nas respostas contráteis. Para isto, foram utilizados os antagonistas prazosin (seletivo para adrenoceptores  $\alpha_1$ ) e ioimbina (seletivo para adrenoceptores  $\alpha_2$ ). Adicionalmente, foi realizada a caracterização farmacológica dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  mediante o uso dos antagonistas subtipo seletivos 5-methylurapidil (seletivo  $\alpha_{1A}$ ), RS 100329 (seletivo  $\alpha_{1A}$ ) e BMY 7378 (seletivo  $\alpha_{1D}$ ).

A Figura 8 e a Tabela 6 mostram os resultados obtidos na porção PROXIMAL da cauda do epidídimo de rato e a Figura 9 e a Tabela 7 representam os resultados obtidos na porção DISTAL da cauda do epidídimo de rato.

Todos os antagonistas utilizados promoveram deslocamentos concentração-dependentes à direita nas curvas concentração-resposta à noradrenalina em ambas as regiões da cauda do epidídimo de rato sem alteração da resposta máxima. As inclinações das retas obtidas pelo gráfico de Schild não diferiram da unidade teórica, caracterizando assim o antagonismo competitivo clássico (Figuras 8 e 9 e Tabelas 6 e 7).

As afinidades estimadas nas duas regiões estudadas da cauda do epidídimo de rato foram similares para todos os antagonistas utilizados. Os valores de  $pK_B$  calculados para os antagonistas exibiram ordem de afinidade RS 100329 > prazosin > 5-methylurapidil >> ioimbina > BMY 7378 (Figura 7-8 e Tabela 6-7).

Os dados obtidos sugerem a participação principal de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  na contratilidade da cauda proximal e distal do epidídimo de rato.

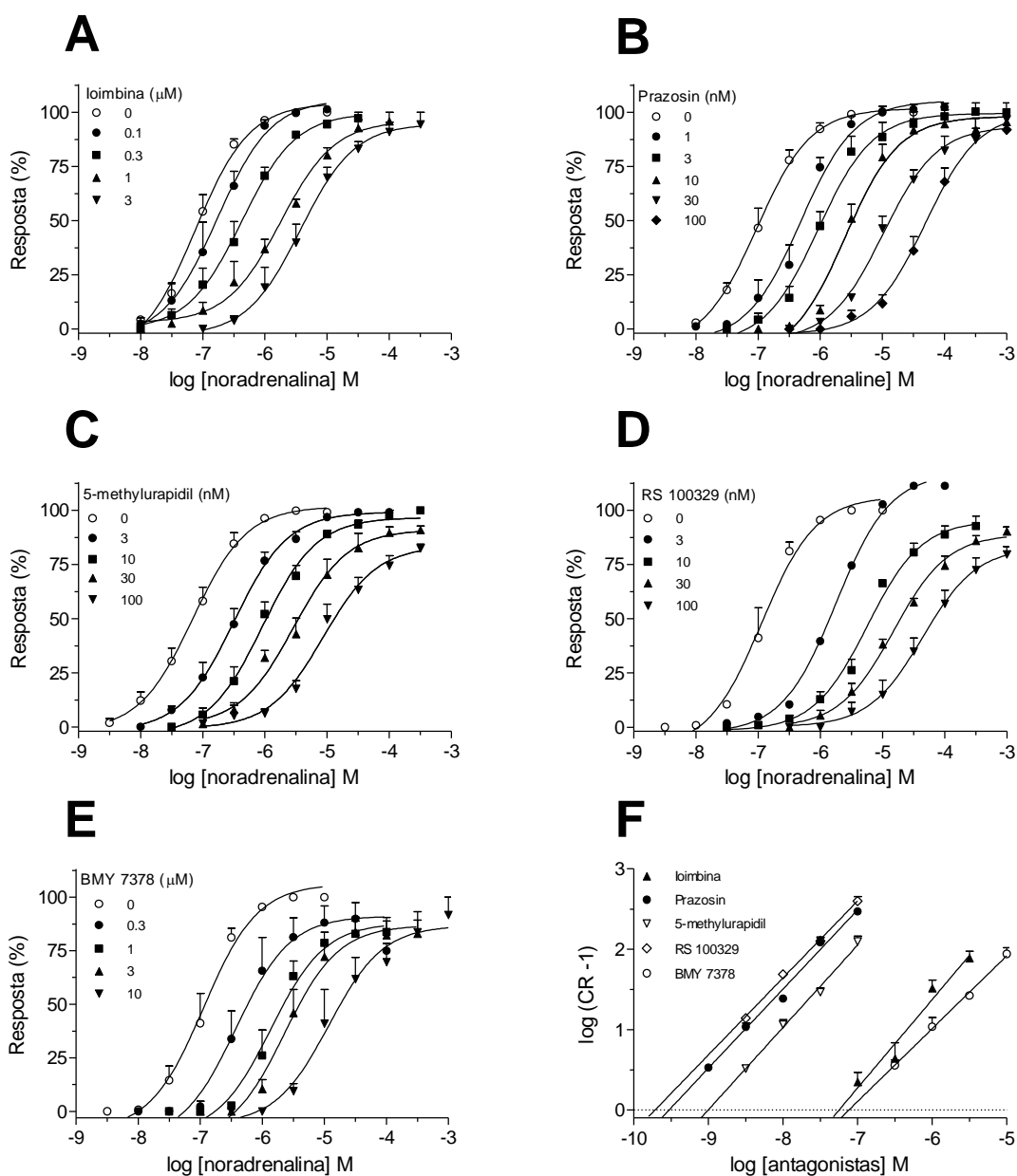


**Figura 8.** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na cauda proximal do epidídimo de rato obtidas na ausência e presença dos antagonistas ioimbina, prazosin, 5-methylurapidil, RS 100329 e BMY 7378 (A-E). Em F é apresentado o gráfico de Schild dos antagonistas. Cada símbolo representa a média  $\pm$  epm de 4 experimentos.

**Tabela 6.** Valores de  $pK_B$  e inclinação da reta no gráfico de Schild para os antagonistas na cauda proximal do epidídimo de rato.

	$pK_B$	inclinação da reta
Ioimbina	$7.06 \pm 0.07$	$0.81 \pm 0.11$
Prazosin	$9.15 \pm 0.06$	$1.06 \pm 0.12$
5-methylurapidil	$8.58 \pm 0.05$	$0.92 \pm 0.09$
RS 100329	$9.31 \pm 0.03$	$0.93 \pm 0.07$
BMY 7378	$6.57 \pm 0.13$	$0.98 \pm 0.32$

Valores apresentados como média  $\pm$  epm de 4 experimentos



**Figura 9.** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na cauda distal do epidídimo de rato obtidas na ausência e presença dos antagonistas ioimbina, prazosin, 5-methylurapidil, RS 100329 e BMY 7378 (A-D). Em D é apresentado o gráfico de Schild dos antagonistas. Cada símbolo representa a média  $\pm$  epm de 4-5 experimentos.

**Tabela 7.** Valores de  $pK_B$  e inclinação da reta no gráfico de Schild para os antagonistas na cauda distal do epidídimo de rato.

	$pK_B$	inclinação da reta
Ioimbina	$7.35 \pm 0.07$	$1.09 \pm 0.12$
Prazosin	$9.51 \pm 0.02$	$0.98 \pm 0.03$
5-methylurapidil	$9.03 \pm 0.03$	$1.02 \pm 0.05$
RS 100329	$9.63 \pm 0.02$	$0.96 \pm 0.04$
BMY 7378	$6.99 \pm 0.04$	$0.91 \pm 0.07$

Valores apresentados como média  $\pm$  epm de 4-5 experimentos.

**Discussão**



A presente dissertação quantificou a expressão dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  (mRNAs e proteínas) presentes na cauda proximal e distal do epidídimo de rato, bem como caracterizou o subtipo de adrenoceptor  $\alpha_1$  envolvido na resposta contrátil destes tecidos à noradrenalina.

A caracterização farmacológica do receptor responsável pela contração da cauda do epidídimo de rato é importante devido o papel fundamental que os adrenoceptores  $\alpha$  têm no transporte do espermatozóide ao longo do epidídimo e no processo ejaculatório. O transporte dos espermatozóides ao longo do epidídimo ocorre pela pressão de fluidos secretados nos túbulos seminíferos e contrações rítmicas da musculatura lisa presente nos túbulos epididimários (Talo et al., 1979; Turner, 2008). As contrações do epidídimo são controladas pelo sistema nervoso autônomo e a cauda do epidídimo é a região que recebe maior inervação simpática quando comparada ao *caput* (cabeça) ou corpo (Ricker, 1998). Drogas que interferem na neurotransmissão simpática têm efeitos relevantes no tempo de trânsito dos espermatozóides e na quantidade de espermatozóides estocados na cauda do epidídimo. Por exemplo, a simpatectomia cirúrgica ou química em ratos causa aumento do tempo de transito dos espermatozóides e do número de espermatozóides presentes na cauda do epidídimo (Billups et al., 1990a; Kempinas et al., 1998a). Uma publicação recente mostrou que a sibutramina, uma droga simpatomimética indireta inibidora da recaptção de noradrenalina, diminui a quantidade e o tempo de trânsito dos espermatozóides na cauda do epidídimo de ratos (Bellentani et al., 2011). Neste mesmo trabalho, o estudo *in vitro* de contrações mostrou que a sibutramina aumenta a atividade contrátil e a potência da noradrenalina na cauda distal do epidídimo do rato propondo uma explicação para a diminuição do tempo de trânsito e da quantidade de espermatozóides

observadas. Desta maneira, o uso dos experimentos de contração da cauda do epidídimo se mostra interessante na caracterização dos efeitos de drogas sobre os adrenoceptores  $\alpha_1$  e o sistema reprodutivo e pode contribuir na elucidação dos mecanismos pelos quais essas drogas afetam parâmetros espermáticos e a performance reprodutiva do macho.

Durante a fase de emissão do processo ejaculatório, descargas simpáticas e parassimpáticas provocam a contração do epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal e próstata levando à condução do esperma para a uretra posterior (Vignozzi et al., 2008). Pacientes com hiperplasia prostática benigna associada a sintomas do trato urinário inferior se beneficiam de drogas cujo principal mecanismo de ação é o antagonismo de adrenoceptores  $\alpha_1$  presentes na próstata, uretra e colo da bexiga reduzindo o tônus da musculatura lisa destes órgãos; assim, tais drogas aliviam a obstrução da uretra e os sintomas urinários característicos da próstata aumentada (van Dijk et al., 2006). Porém, o uso particular de duas dessas drogas, o tamsulosin e o silodosin, estão associados a maior incidência de disfunções ejaculatórias, como a diminuição do volume do ejaculado ou até mesmo a anejaculação (Hellstrom and Sikka, 2009; Kobayashi et al., 2008). De fato, estudos com camundongos nocautes propõem um papel fundamental dos adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  no processo ejaculatório, uma vez que a ausência desses receptores reduz em aproximadamente 50% a taxa de prenhez de fêmeas cruzadas com estes machos e há diminuição da contratilidade do ducto deferente (Sanbe et al., 2007). Além disso, o mesmo trabalho demonstra que o ducto deferente de camundongos nocaute para os três subtipos adrenoceptores  $\alpha_1$  não contrai em resposta à noradrenalina e estes machos triplo nocaute são inférteis.

Os experimentos de RT-qPCR conduzidos na presente dissertação mostraram a expressão de mRNA codificando todos os três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  na cauda do epidídimo de rato. Porém, os níveis de mRNA de cada um dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  foram diferentes ao longo das regiões da cauda do epidídimo investigadas. Na região proximal da cauda do epidídimo foi encontrada maior expressão de mRNA dos adrenoceptores  $\alpha_{1d}$  enquanto que na região distal a abundância de mRNA dos adrenoceptores  $\alpha_{1a}$  e  $\alpha_{1d}$  foram semelhantes. As quantidades de mRNA dos adrenoceptores  $\alpha_{1b}$  foram baixas em ambas as regiões da cauda do epidídimo quando comparadas às dos outros dois subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ . Estes resultados são consistentes com aqueles descritos por Queiroz *et al* (Queiroz et al., 2002) usando ensaios de proteção da ribonuclease (Ribonuclease Protection Assays, RPA), que também observou a expressão dos três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  na cauda do epidídimo de rato, mas com maior abundância de mRNA codificando os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_{1a}$  e  $\alpha_{1d}$ . Resultados similares também são encontrados em outros tecidos do trato reprodutivo de animais e humanos, tais como a próstata, ducto deferente e vesícula seminal (Kojima et al., 2006; Moriyama et al., 1997; Price et al., 1993; Suzuki et al., 1997; Yono et al., 2008).

Com o objetivo de verificar a expressão protéica dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  nas diferentes regiões da cauda do epidídimo de rato foram realizados estudos de ligação do radioligante [ $^3$ H]Prazosin em segmentos de tecido intacto. As curvas de saturação da ligação total e não-específica do radioligante [ $^3$ H]Prazosin obtidas tanto na região proximal quanto distal do epidídimo de rato revelaram sítios de ligação específicos, cujas constantes de dissociação estimadas nas porções proximais ( $pK_D \cong 9.59$ ) e distais ( $pK_D \cong 9.40$ ) são condizentes com a

afinidade deste radioligante por adrenoceptores  $\alpha_1$ . Ainda, os ensaios de saturação revelaram que segmentos proximais e distais da cauda do epidídimo expressam densidades semelhantes destes receptores. Esses dados são suportados por dados da literatura obtidos por Ventura & Pennefather (1994) com o radioligante [ $^3\text{H}$ ]Prazosin em preparações de membranas provenientes da cauda do epidídimo de rato. Entretanto, a densidade de receptores estimada em nossos experimentos foi aproximadamente sete vezes maior do que a relatada por Ventura e Pennefather (1994). A diferença observada pode estar relacionada às metodologias empregadas na obtenção do material biológico, uma vez que na presente dissertação os ensaios de ligação foram feitos em segmentos de tecido, enquanto que o outro estudo usou “preparações de membrana”. De fato, uma das vantagens da utilização de segmentos de tecido intacto na realização dos experimentos de ligação de radioligantes ao invés da utilização de preparações de membrana é a conservação dos receptores presentes no tecido a ser utilizado, uma vez que o processo da obtenção de preparações de membrana pode levar a uma grande perda dos receptores (Muramatsu et al., 2005; Tanaka et al., 2004).

Na presente dissertação foram utilizados ligantes seletivos para competir com o radioligante [ $^3\text{H}$ ]Prazosin com o propósito de caracterizar farmacologicamente os subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  presentes nas porções proximais e distais da cauda do epidídimo. O uso de ligantes seletivos na caracterização dos perfis farmacológicos dos subtipos de adrenoceptores  $\alpha$  é uma ferramenta valiosa que se fundamenta na razoável seletividade (30 a 100 vezes) que os ligantes apresentam pelos diferentes receptores estudados. As curvas de inibição da ligação específica do [ $^3\text{H}$ ]Prazosin em segmentos proximais ou distais da cauda do epidídimo foram consistentes com a competição por um único sítio de ligação com altas afinidades

para os ligantes prazosin (seletivo  $\alpha_1$ ), 5-methylurapidil (seletivo  $\alpha_{1A}$ ) e RS 100329 (seletivo  $\alpha_{1A}$ ). As altas afinidades para o prazosin indicam adicionalmente a marcação de adrenoceptores  $\alpha_1$  pelo [ $^3$ H]Prazosin a ausência da “contaminação” de populações de adrenoceptores  $\alpha_2$  em segmentos proximais e distais da cauda do epidídimo de rato. Em contraste, as curvas de inibição da ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin pelo ligante BMY 7378 (seletivo  $\alpha_{1D}$ ) foram bifásicas tanto em segmentos proximais ou quanto distais da cauda do epidídimo reconhecendo um sítio de ligação de alta afinidade e outro de baixa afinidade, cada um deles correspondendo à aproximadamente metade dos receptores marcados. Ainda, os altos valores de  $pK_i$  estimados para os ligantes seletivos de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  (5-methylurapidil e RS 100329) e adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  (BMY 7378) sugerem a presença de uma população heterogênea de receptores na cauda proximal e distal do epidídimo de rato composta pelos adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$ . As afinidades estimadas na cauda do epidídimo de rato são semelhantes a de outros estudos realizados com segmentos de tecido intacto provenientes da íris de coelho, artéria caudal e aorta torácica de rato (Muramatsu et al., 2009; Tanaka et al., 2004).

Queiroz e colaboradores (Queiroz et al., 2002) também relatam a presença de um população heterogênea de adrenoceptores  $\alpha_1$  na cauda do epidídimo de rato composta por adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e adrenoceptores  $\alpha_{1B}$  ou  $\alpha_{1D}$ . No entanto, as afinidades dos ligantes por Queiroz et al (2002) diferem daquelas estimadas na presente dissertação. No estudo de Queiroz et al., (2002) os ligantes prazosin e 5-methylurapidil apresentaram um sítio de alta e outro de baixa afinidade, enquanto que no presente trabalho os dois ligantes reconheceram apenas um sítio de ligação de alta afinidade. Interessantemente, o ligante BMY 7378 reconheceu apenas um sítio de baixa afinidade no estudo de Queiroz et al (2002) enquanto que dois sítios

de ligação foram marcados por este ligante no presente estudo. Deste modo, os experimentos de ligação com segmentos de tecido intacto evidenciam a presença dos adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  na cauda do epidídimo de rato apesar dos experimentos com preparação de membrana não serem capazes. Há outros exemplos na literatura de discrepâncias semelhantes. Por exemplo, o adrenoceptor  $\alpha_{1L}$ , um fenótipo do adrenoceptor  $\alpha_{1A}$ , só é detectável em experimentos com o radioligante [ $^3$ H]Prazosin em segmentos de tecido intacto, uma vez que mediante a homogeneização do tecido para a obtenção de preparações de membrana o receptor detectado é o adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  (Hiraizumi-Hiraoka et al., 2004; Morishima et al., 2008; Morishima et al., 2007). Da mesma maneira, estudos comparativos usando o adrenoceptor  $\alpha_{1B}$  em preparações de membrana ou segmentos de tecido intacto apontam diferenças significativas ( $\approx 100$  vezes) nas afinidades estimadas da ketanserina (Sathi et al., 2008). Além disso, é importante salientar que diversos tipos celulares e tecidos conjuntivos estão presentes nos experimentos de ligação que usam segmentos de tecido intacto podendo levar a resultados diferentes daqueles obtidos com tecidos homogeneizados (Muramatsu et al., 2005).

É interessante notar que a presença do adrenoceptor  $\alpha_{1D}$  só foi identificada pelo uso do BMY 7378, enquanto que os ligantes seletivos de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  investigados não indicaram a presença deste receptor. Era esperado que os ligantes seletivos de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  também exibissem curvas de inibição da ligação [ $^3$ H]Prazosin com perfis bifásicos evidenciando a presença dos dois sítios de ligação.

Nos estudos funcionais, a noradrenalina foi capaz de promover contrações concentração-dependente em ambas as porções da cauda do epidídimo de rato com alta potência. As respostas à noradrenalina foram competitivamente

antagonizadas pelo prazosin, ioimbina, 5-methylurapidil, RS 100329 e BMY 7378. A alta afinidade estimada para o prazosin e a baixa afinidade estimada para a ioimbina são condizentes com as esperadas na ativação de adrenoceptores  $\alpha_1$ . Tais resultados são suportados por experimentos *in vivo* (pressão intraluminal) e *in vitro* (estimulação elétrica) mediante a utilização de agonistas e antagonistas adrenérgicos na cauda do epidídimo de rato que relatam a participação principal dos adrenoceptores  $\alpha_1$  (Pholpramool and Triphrom, 1984; Ventura and Pennefather, 1991). Entretanto, outros trabalhos verificaram o envolvimento de adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  na contração da cauda proximal do epidídimo de rato e de cobaia (Chaturapanich et al., 2002; Haynes and Hill, 1996).

Os ligantes seletivos de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  (5-methylurapidil e RS 100329) antagonizaram com altas afinidades as contrações induzidas pela noradrenalina em ambas as porções da cauda do epidídimo de rato. Contrariamente, o ligante seletivo de adrenoceptor  $\alpha_{1D}$  (BMY 7378) exibiu um baixo valor de afinidade. Em conjunto, os resultados obtidos indicam a predominância de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  mediando as contrações da cauda proximal e distal do epidídimo de rato em resposta à noradrenalina. As afinidades estimadas são semelhantes àquelas estimadas por nosso grupo e pela literatura em outros tecidos nos quais os adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  estão envolvidos nas respostas contráteis à agonistas de adrenoceptores  $\alpha$  (Campos et al., 2003a; Campos et al., 2003b; Honner and Docherty, 1999; Kamikihara et al., 2007; Kamikihara et al., 2005; Lima et al., 2005; Pupo, 1998).

Apesar dos dados de RT-qPCR e de ligação do radioligante [ $^3$ H]Prazosin apontarem a existência de adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  na cauda do epidídimo de rato, o presente trabalho não foi capaz de identificar a participação destes receptores na

contração da cauda do epidídimo. Interessantemente, é sabido que as contrações do ducto deferente de rato em resposta a agonistas adicionados à cuba muscular resultam da ativação de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$ , enquanto que há a participação de adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  nas contrações evocadas pela estimulação elétrica deste órgão (Honner and Docherty, 1999). Além disso, experimentos realizados no ducto deferente de camundongos nocautes para adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  mostram que o BMY 7378 tem menor potencia na redução da contratilidade em resposta à noradrenalina exógena ou por estimulação elétrica evidenciando assim a participação dos adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  nas respostas contráteis uma vez que a contração por agonistas exógenos também é mediada por adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  em camundongos selvagens (Bexis et al., 2008; Cleary et al., 2003).

Em resumo, os resultados obtidos com os experimentos RT-qPCR indicam a presença predominante dos adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$  na cauda proximal e distal do epidídimo de rato, o que é suportado pelos experimentos com o radioligante [ $^3$ H]Prazosin, enquanto que os experimentos funcionais apontam o envolvimento predominante de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  nas respostas contráteis à noradrenalina. O papel funcional dos adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  nestes tecidos ainda é desconhecido e precisa ser investigado. A cauda do epidídimo de rato pode representar um bom modelo para o estudo do efeito de drogas no sistema reprodutivo masculino que atuam por mecanismo de ação direta ou indireta sobre os adrenoceptores  $\alpha_1$ . Além disso, a cauda do epidídimo de rato pode ser utilizada em estudos de caracterização farmacológica de novos ligantes de adrenoceptores  $\alpha_1$ , bem como para o entendimento de seus mecanismos de ação.



**Conclusão**

- A cauda do epidídimo de rato expressa mRNAs codificando os três subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ ;
- Entretanto, apenas as proteínas correspondentes aos adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$  estão presentes cauda do epidídimo de rato;
- A contração da musculatura lisa da cauda do epidídimo de rato é mediada predominantemente pela ativação de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$ . Porém, a função dos adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  na cauda do epidídimo de rato não está elucidada;
- A cauda do epidídimo pode ser um modelo interessante para a caracterização farmacologia de novas drogas com ação em adrenoceptores  $\alpha_1$  e seus mecanismos de ação e no estudo dos efeitos de drogas sobre o sistema reprodutivo masculino com ação direta ou indireta nestes receptores.

## **Referências bibliográficas**

Arunlakshana, O., and Schild, H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* 14, 48-58.

Bell, C. (1972). Autonomic nervous control of reproduction: circulatory and other factors. *Pharmacol Rev* 24, 657-736.

Bellentani, F.F., Fernandes, G.S., Perobelli, J.E., Pacini, E.S., Kiguti, L.R., Pupo, A.S., and Kempinas, W.D. (2011). Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. *J Androl* 32, 718-724.

Bexis, S., Cleary, L., McGrath, J.C., Tanoue, A., Tsujimoto, G., and Docherty, J.R. (2008). Alpha(1D)-adrenoceptors mediate nerve and agonist-evoked contractions in mouse vas deferens: evidence obtained from knockout technology. *Auton Autacoid Pharmacol* 28, 81-85.

Billups, K.L., Tillman, S., and Chang, T.S. (1990a). Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens. *J Urol* 143, 625-629.

Billups, K.L., Tillman, S.L., and Chang, T.S. (1990b). Reduction of epididymal sperm motility after ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat. *Fertil Steril* 53, 1076-1082.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., and Trendelenburg, U. (1994). International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacological Reviews* 46, 121-136.

Campos, M., de Lucena Morais, P., and Pupo, A.S. (2003a). Functional characterisation of alpha(1)-adrenoceptors in denervated rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368, 72-78.

Campos, M., Morais Pde, L., and Pupo, A.S. (2003b). Effects of castration and of testosterone replacement on alpha(1)-adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* 471, 149-155.

Chan, H.C., Fu, W.O., Chung, Y.W., Zhou, T.S., and Wong, P.Y. (1994). Adrenergic receptors on cultured rat epididymal cells: regulation of Cl<sup>-</sup> conductances. *Biol Reprod* 51, 1040-1045.

Chaturapanich, G., Maythaartaphong, S., Verawatnapakul, V., and Pholpramool, C. (2002). Mediation of contraction in rat cauda epididymidis by alpha-adrenoceptors. *Reproduction* 124, 887-892.

Cleary, L., Vandeputte, C., and Docherty, J.R. (2003). Investigation of postjunctional alpha1- and alpha2-adrenoceptor subtypes in vas deferens from wild-type and alpha(2A/D)-adrenoceptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 138, 1069-1076.

Cornwall, G.A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15, 213-227.

Daniels, D.V., Gever, J.R., Jasper, J.R., Kava, M.S., Lesnick, J.D., Meloy, T.D., Stepan, G., Williams, T.J., Clarke, D.E., Chang, D.J., *et al.* (1999). Human cloned alpha1A-adrenoceptor isoforms display alpha1L-adrenoceptor pharmacology in functional studies. *Eur J Pharmacol* 370, 337-343.

Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., and Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods* 354, 34-39.

El-Badawi, A., and Schenk, E.A. (1967). The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis: a comparative histochemical study. *Am J Anat* 121, 1-14.

Eliasson, R., and Risley, P.L. (1968). Adrenergic innervation of the male reproductive ducts of some mammals. 3. Distributions of noradrenaline and adrenaline. *Acta Physiol Scand* 73, 311-319.

Ernst, O., and Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *J Vis Exp*.

Flavahan, N.A., and Vanhoutte, P.M. (1986). Alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor: response coupling in canine saphenous and femoral veins. *J Pharmacol Exp Ther* 238, 131-138.

Ford, A.P., Arredondo, N.F., Blue, D.R., Jr., Bonhaus, D.W., Jasper, J., Kava, M.S., Lesnick, J., Pfister, J.R., Shieh, I.A., Vimont, R.L., *et al.* (1996). RS-17053 (N-[2-(2-cyclopropylmethoxyphenoxy)ethyl]-5-chloro-alpha, alpha-dimethyl-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride), a selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist, displays low affinity for functional alpha 1-adrenoceptors in human prostate: implications for adrenoceptor classification. *Mol Pharmacol* 49, 209-215.

Godornes, C., Leader, B.T., Molini, B.J., Centurion-Lara, A., and Lukehart, S.A. (2007). Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* 38, 1-7.

Goetz, A.S., King, H.K., Ward, S.D., True, T.A., Rimele, T.J., and Saussy, D.L., Jr. (1995). BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 272, R5-6.

Gray, K., Short, J., and Ventura, S. (2008). The alpha1A-adrenoceptor gene is required for the alpha1L-adrenoceptor-mediated response in isolated preparations of the mouse prostate. *Br J Pharmacol* 155, 103-109.

Gross, G., Hanft, G., and Rugevics, C. (1988). 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the alpha 1-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol* 151, 333-335.

Hawrylyshyn, K.A., Michelotti, G.A., Coge, F., Guenin, S.P., and Schwinn, D.A. (2004). Update on human alpha1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol Sci* 25, 449-455.

Haynes, J.M., and Hill, S.J. (1996). Alpha-adrenoceptor mediated responses of the cauda epididymis of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 119, 1203-1210.

Hellstrom, W.J., and Sikka, S.C. (2009). Effects of alfuzosin and tamsulosin on sperm parameters in healthy men: results of a short-term, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *J Androl* 30, 469-474.

Hib, J. (1976). Effects of autonomic drugs on epididymal contractions. *Fertil Steril* 27, 951-956.

Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., and Ruffolo, R.R., Jr. (1995). International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 47, 267-270.

Hinton, B.T., Dott, H.M., and Setchell, B.P. (1979). Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *J Reprod Fertil* 55, 167-172.

Hiraizumi-Hiraoka, Y., Tanaka, T., Yamamoto, H., Suzuki, F., and Muramatsu, I. (2004). Identification of alpha-1L adrenoceptor in rabbit ear artery. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 995-1002.

Hiraoka, Y., Ohmura, T., Oshita, M., Watanabe, Y., Morikawa, K., Nagata, O., Kato, H., Taniguchi, T., and Muramatsu, I. (1999). Binding and functional characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes in the rat prostate. *Eur J Pharmacol* 366, 119-126.

Honner, V., and Docherty, J.R. (1999). Investigation of the subtypes of alpha1-adrenoceptor mediating contractions of rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 128, 1323-1331.

Kamikihara, S.Y., Mueller, A., Lima, V., Akinaga, J., Nojimoto, F.D., Castilho, A., Buratini, J., Jr., and Pupo, A.S. (2007). alpha1-Adrenoceptors in proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376, 117-126.

Kamikihara, S.Y., Mueller, A., Lima, V., Silva, A.R., da Costa, I.B., Buratini, J., Jr., and Pupo, A.S. (2005). Differential distribution of functional alpha1-adrenergic receptor subtypes along the rat tail artery. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 753-761.

Kempinas, W.D., and Klinefelter, G.R. (2010). The Epididymis as a Target for Toxicants. In *Comprehensive Toxicology*, C.A. McQueen, ed. (Oxford, Elsevier), pp. 149-166.

Kempinas, W.D., Suarez, J.D., Roberts, N.L., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J.M., and Klinefelter, G.R. (1998a). Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol Reprod* 59, 890-896.

Kempinas, W.D., Suarez, J.D., Roberts, N.L., Strader, L.F., Ferrell, J., Goldman, J.M., Narotsky, M.G., Perreault, S.D., Evenson, D.P., Ricker, D.D., *et al.* (1998b). Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod* 59, 897-904.



Kobayashi, K., Masumori, N., Hisasue, S., Kato, R., Hashimoto, K., Itoh, N., and Tsukamoto, T. (2008). Inhibition of Seminal emission is the main cause of anejaculation induced by a new highly selective alpha1A-blocker in normal volunteers. *J Sex Med* 5, 2185-2190.

Kojima, Y., Sasaki, S., Shinoura, H., Hayashi, Y., Tsujimoto, G., and Kohri, K. (2006). Quantification of alpha1-adrenoceptor subtypes by real-time RT-PCR and correlation with age and prostate volume in benign prostatic hyperplasia patients. *Prostate* 66, 761-767.

Lima, V., Mueller, A., Kamikihara, S.Y., Raymundi, V., Alewood, D., Lewis, R.J., Chen, Z., Minneman, K.P., and Pupo, A.S. (2005). Differential antagonism by conotoxin rho-TIA of contractions mediated by distinct alpha1-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *Eur J Pharmacol* 508, 183-192.

Minneman, K.P. (1988). Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca<sup>2+</sup>. *Pharmacol Rev* 40, 87-119.

Morishima, S., Suzuki, F., Yoshiki, H., Md Anisuzzaman, A.S., Sathi, Z.S., Tanaka, T., and Muramatsu, I. (2008). Identification of the alpha1L-adrenoceptor in rat cerebral cortex and possible relationship between alpha1L- and alpha1A-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 153, 1485-1494.

Morishima, S., Tanaka, T., Yamamoto, H., Suzuki, F., Akino, H., Yokoyama, O., and Muramatsu, I. (2007). Identification of alpha-1L and alpha-1A adrenoceptors in human prostate by tissue segment binding. *J Urol* 177, 377-381.

Moriyama, N., Nasu, K., Takeuchi, T., Akiyama, K., Murata, S., Nishimatsu, H., Yano, J., Tsujimoto, G., and Kawabe, K. (1997). Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human vas deferens: comparison with those of epididymal and pelvic portions. *Br J Pharmacol* 122, 1009-1014.

Muramatsu, I., Morishima, S., Suzuki, F., Yoshiki, H., Anisuzzaman, A.S., Tanaka, T., Rodrigo, M.C., Myagmar, B.E., and Simpson, P.C. (2008). Identification of alpha 1L-adrenoceptor in mice and its abolition by alpha 1A-adrenoceptor gene knockout. *Br J Pharmacol* 155, 1224-1234.

Muramatsu, I., Ohmura, T., Kigoshi, S., Hashimoto, S., and Oshita, M. (1990). Pharmacological subclassification of alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 99, 197-201.

Muramatsu, I., Suzuki, F., Nishimune, A., Anisuzzaman, A.S., Yoshiki, H., Su, T.H., Chang, C.K., and Morishima, S. (2009). Expression of distinct alpha 1-adrenoceptor phenotypes in the iris of pigmented and albino rabbits. *Br J Pharmacol* 158, 354-360.

Muramatsu, I., Tanaka, T., Suzuki, F., Li, Z., Hiraizumi-Hiraoka, Y., Anisuzzaman, A.S., Yamamoto, H., Horinouchi, T., and Morishima, S. (2005). Quantifying receptor properties: the tissue segment binding method - a powerful tool for the pharmacome analysis of native receptors. *J Pharmacol Sci* 98, 331-339.

Nojimoto, F.D., Mueller, A., Hebel-Barbosa, F., Akinaga, J., Lima, V., Kiguti, L.R., and Pupo, A.S. (2010). The tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline and imipramine are weak antagonists of human and rat alpha1B-adrenoceptors. *Neuropharmacology* 59, 49-57.

Pholpramool, C., and Triphrom, N. (1984). Effects of cholinergic and adrenergic drugs on intraluminal pressures and contractility of the rat testis and epididymis in vivo. *J Reprod Fertil* 71, 181-188.

Pholpramool, C., Triphrom, N., and Din-Udom, A. (1984). Intraluminal pressures in the seminiferous tubules and in different regions of the epididymis in the rat. *J Reprod Fertil* 71, 173-179.

Picarelli, Z.P., Hyppolito, N., and Valle, J.R. (1962). Synergistic effect of 5-hydroxytryptamine on the response of rats's seminal vesicles to adrenaline and noradrenaline. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 138, 354-363.

Price, D.T., Schwinn, D.A., Lomasney, J.W., Allen, L.F., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1993). Identification, quantification, and localization of mRNA for three distinct alpha 1 adrenergic receptor subtypes in human prostate. *J Urol* 150, 546-551.

Pupo, A.S. (1998). Functional effects of castration on alpha1-adrenoceptors in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* 351, 217-223.

Queiroz, D.B., Mendes, F.R., Porto, C.S., and Avellar, M.C. (2002). Alpha1-adrenoceptor subtypes in rat epididymis and the effects of sexual maturation. *Biol Reprod* 66, 508-515.

Queiroz, D.B., Porto, C.S., Grossman, G., Petrusz, P., and Avellar, M.C. (2008). Immunolocalization of alpha(1A)-adrenoceptors in rat and human epididymis. *Cell Tissue Res* 332, 509-522.

Ricker, D.D. (1998). The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl* 19, 1-4.

Ricker, D.D., Chamness, S.L., Hinton, B.T., and Chang, T.S. (1996). Changes in luminal fluid protein composition in the rat cauda epididymidis following partial sympathetic denervation. *J Androl* 17, 117-126.

Ricker, D.D., Crone, J.K., Chamness, S.L., Klinefelter, G.R., and Chang, T.S. (1997). Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development. *J Androl* 18, 131-138.

Sanbe, A., Tanaka, Y., Fujiwara, Y., Tsumura, H., Yamauchi, J., Cotecchia, S., Koike, K., Tsujimoto, G., and Tanoue, A. (2007). Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol* 152, 332-340.

Sathi, Z.S., Anisuzzaman, A.S., Morishima, S., Suzuki, F., Tanaka, T., Yoshiki, H., and Muramatsu, I. (2008). Different affinities of native alpha1B-adrenoceptors for ketanserin between intact tissue segments and membrane preparations. *Eur J Pharmacol* 584, 222-228.

Schaak, S., Mialet-Perez, J., Flordellis, C., and Paris, H. (2007). Genetic variation of human adrenergic receptors: from molecular and functional properties to clinical and pharmacogenetic implications. *Curr Top Med Chem* 7, 217-231.

Silva, A.M., Queiroz, D.B., Castro Neto, E.F., Naffah-Mazzacoratti Mda, G., Godinho, R.O., Porto, C.S., Gutierrez-Ospina, G., and Avellar, M.C. (2002). Segment-specific decrease of both catecholamine concentration and acetylcholinesterase activity are accompanied by nerve refinement in the rat cauda epididymis during sexual maturation. *J Androl* 23, 374-383.

Siu, E.R., Yasuhara, F., Marostica, E., Avellar, M.C., and Porto, C.S. (2006). Expression and localization of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in rat efferent ductules and epididymis. *Cell Tissue Res* 323, 157-166.

Suzuki, F., Miyamoto, S., Takita, M., Oshita, M., Watanabe, Y., Kakizuka, A., Narumiya, S., Taniguchi, T., and Muramatsu, I. (1997). Cloning, functional expression and tissue distribution of rabbit alpha 1d-adrenoceptor. *Biochim Biophys Acta* 1323, 6-11.

Talo, A., Jaakkola, U.M., and Markkula-Viitanen, M. (1979). Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in vitro. *J Reprod Fertil* 57, 423-429.

Tanaka, T., Zhang, L., Suzuki, F., and Muramatsu, I. (2004). Alpha-1 adrenoceptors: evaluation of receptor subtype-binding kinetics in intact arterial tissues and comparison with membrane binding. *Br J Pharmacol* 141, 468-476.

Turner, T.T. (2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl* 29, 237-250.

van Dijk, M.M., de la Rosette, J.J., and Michel, M.C. (2006). Effects of alpha(1)-adrenoceptor antagonists on male sexual function. *Drugs* 66, 287-301.

Ventura, S., and Pennefather, J.N. (1991). Sympathetic co-transmission to the cauda epididymis of the rat: characterization of postjunctional adrenoceptors and purinoceptors. *Br J Pharmacol* 102, 540-544.

Ventura, S., and Pennefather, J.N. (1994). Alpha 2-adrenoceptor binding sites vary along the length of the male reproductive tract: a possible basis for the regional variation in response to field stimulation. *Eur J Pharmacol* 254, 167-173.

Vignozzi, L., Filippi, S., Morelli, A., Luconi, M., Jannini, E., Forti, G., and Maggi, M. (2008). Regulation of epididymal contractility during semen emission, the first part of the ejaculatory process: a role for estrogen. *J Sex Med* 5, 2010-2016; quiz 2017.

Williams, T.J., Blue, D.R., Daniels, D.V., Davis, B., Elworthy, T., Gever, J.R., Kava, M.S., Morgans, D., Padilla, F., Tassa, S., *et al.* (1999). In vitro alpha1-adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel alpha1A-adrenoceptor selective antagonists. *Br J Pharmacol* 127, 252-258.

Yono, M., Latifpour, J., Yamamoto, Y., Imanishi, A., and Yoshida, M. (2008). Region and age dependent differences in alpha(1)-adrenergic responsiveness of rat seminal vesicle and vas deferens. *Eur J Pharmacol* 587, 291-295.

**Parecer da Comissão de Ética na  
Experimentação Animal**

## *Certificate*

We certify that the protocol n° 294 about "Pharmacological characterization of alpha 1 adrenoceptors in rat cauda epididymis" agree with ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOSCIENCE INSTITUTE/UNESP ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA), in May 09, 2011.

Botucatu, May 09, 2011.



**Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**  
Presidente - CEEA

**Artigo publicado**



## Acceleration of Sperm Transit Time and Reduction of Sperm Reserves in the Epididymis of Rats Exposed to Sibutramine

FERNANDA F. BELLENTANI,\* GLAURA S. A. FERNANDES,† JULIANA E. PEROBELLI,†  
ENIO S. A. PACINI,‡ LUIZ R. A. KIGUTI,‡ ANDRÉ S. PUPO,§ AND WILMA D. G. KEMPINAS||

From the \*Graduate Program in General and Applied Biology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP—Univ Estadual Paulista, Botucatu, Brazil; the †Graduate Program in Cellular and Structural Biology, Institute of Biology, UNICAMP—State University of Campinas, Campinas, Brazil; the ‡Graduate Program in Biological Sciences—Pharmacology, the §Department of Pharmacology, and the ||Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP—Univ Estadual Paulista, Botucatu, Brazil.

**ABSTRACT:** Sibutramine is a drug globally used for the treatment of obesity. The aim of this study was to investigate male reproductive disorders caused by sibutramine in adult rats. Wistar rats were treated for 28 consecutive days (gavage) with 10 mg/kg of sibutramine. Control animals received only vehicle (dimethylsulfoxide and saline). The rats were sacrificed for evaluation of body and reproductive organ weights, sperm parameters, hormone levels (luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone), testicular and epididymal histopathology, sexual behavior, fertility and in vitro contractility of the epididymal duct. Sibutramine decreased ( $P < .05$ ) weights of the epididymis and ventral prostate, but not of other reproductive organs. The sperm number and transit time in the epididymal cauda were decreased ( $P < .001$ ), but the daily sperm production was not altered. Moreover, morphology and

sperm motility, histopathology of the testes and epididymis, sexual behavior, fertility, and serum hormone levels were not altered by the treatment. Sibutramine increased the potency of norepinephrine and, per se, increased the mechanical activity of the epididymal duct in vitro. Thus, although sibutramine in these experimental conditions did not interfere with the reproductive process of rats, it provoked acceleration of the sperm transit time and a decrease in the sperm reserves in the epididymal cauda. This alteration is probably related to the sympathomimetic effect of this drug, as shown by the in vitro assays. In humans, use of this drug might present a threat for male fertility because sperm reserves in men are naturally lower than those in rats.

Key words: Male rats, sympathetic innervation.

J Androl 2011;32:718–724

Sibutramine is a widely used antiobesity drug (Luque and Rey, 2002). It is a centrally acting aid to weight loss that inhibits the reuptake of serotonin and norepinephrine involved in the control of food intake and stimulates thermogenesis, increasing energy expenditure (Ara and Brennan, 2007).

The most commonly reported side effects of sibutramine include dry mouth, high blood pressure, fatigue, constipation, tachycardia, anorexia, headaches, and insomnia (Luque and Rey, 1999; Richter, 1999; Cuellar et al, 2000; Perrio et al, 2007). The European Medicines Agency have recommended suspension of marketing authorizations for sibutramine. This decision was taken because of a possible increased cardiovascular risk,

mainly ischemic heart disease, associated with the use of sibutramine in patients with pathologies prone to develop cardiovascular complications. The conclusion was that the benefits no longer outweigh the risks (Scheen, 2010). However, this drug is still used in other parts of the world, including Brazil.

Regarding the effects of this drug on male reproduction, abnormal ejaculation was observed in rats (Nojimoto et al, 2009), but studies related to the topic are still lacking in the scientific literature. In fact, drugs that increase serotonergic neurotransmission, such as antidepressant inhibitors of the neuronal reuptake of monoamines, delay ejaculation. Apart from its action in the central nervous system, facilitation of ejaculation might result from augmented sensitivity of the smooth muscles of the vas deferens and seminal vesicles to norepinephrine, whereas reductions of intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations might be involved in the delayed ejaculation observed with high doses of sibutramine (Nojimoto et al, 2009).

It is important to note that sibutramine increases sympathetic tone (Hirsch et al, 2000) and that other male reproductive organs, such as the epididymis, might

We are grateful to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) for financial support.

Correspondence to: Wilma De Grava Kempinas, Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP—Univ Estadual Paulista, Caixa-Postal 510, CEP 18618-970, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP—Brazil (e-mail: kempinas@ibb.unesp.br).

Received for publication February 17, 2011; accepted for publication April 28, 2011.

DOI: 10.2164/jandrol.111.013466

also be damaged with changes in sympathetic innervation. Kempinas et al (1998b) found that chemical or surgical sympathectomy delays the transit of sperm through the cauda epididymidis and produces ejaculatory dysfunction.

Because of the growing use of sibutramine for obesity treatment and the dearth of information in the literature on the effects of this drug in the male reproductive system, this study evaluates reproductive parameters, reproductive performance, and the pharmacological reactivity of the isolated distal cauda epididymal duct of adult male rats exposed to sibutramine.

## Materials and Methods

### Animals

Adult male and female Wistar rats were supplied by Central Biotherium of the State University of São Paulo and were housed in polyethylene cages (43 × 30 × 15 cm) with laboratory-grade pine shavings as bedding. The animals were maintained in controlled environmental conditions of temperature (22°C ± 2°C), relative air humidity (55% ± 10%), light/dark cycle (12:12 hours), and air circulation (continuous). Rat chow and filtered tap water were provided ad libitum. The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research of the Brazilian College of Animal Experimentation and was approved by the Bioscience Institute/UNESP Botucatu Ethical Committee for Animal Experimentation (115-CEEA). To evaluate endpoints of general reproductive toxicity and reproductive performance, the study was conducted in 3 steps—Experiment 1, Experiment 2, and Experiment 3.

*Experiment 1—Reproductive organ weights, serum hormone levels, sperm parameters, and histology.* Adult male rats (120 days old, n = 10) were treated with 10 mg/kg per day of sibutramine diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and saline (60 mg sibutramine/1 mL DMSO/2 mL saline) by gavage (oral route) for 28 consecutive days. The respective controls (n = 10) received only vehicle (1 mL DMSO/2 mL saline) at a dose of 0.17 mL DMSO/kg.

*Body weight and weight of reproductive organs.* On the day after the end of treatment, animals were weighed and killed by decapitation. The right testis, epididymis, vas deferens, ventral prostate, and seminal vesicle (without the coagulating gland, full and empty of secretion) were removed, and their weights were determined.

*Hormonal measurement.* After decapitation, blood was collected (between 9:00 and 11:30 AM) from ruptured cervical vessels for determination of the serum concentrations of testosterone, luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH). Serum was obtained after centrifugation (1200 × g, 20 minutes, 4°C) in a refrigerated apparatus and was frozen at -20°C until the moment of hormonal determination. The analyses were determined by double-antibody radioimmunoassay at the Neuroendocrinology Laboratory, Dental School of University of São Paulo—USP

campus at Ribeirão Preto, Sao Paulo state, Brazil. Testosterone was measured with the Testosterone kit (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas). The LH and FSH levels were quantified by specific kits from the National Institute of Arthritis, Diabetes, and Kidney Diseases (NIADDK, CITY, STATE). All samples were measured in the same assay to avoid interassay errors. Intra- and interanalysis variations were, respectively, 4% and 10% for LH, 3% and 10% for FSH, and 1.75% and 20% for testosterone.

*Sperm counts, daily sperm production, and sperm transit time through the epididymis.* Spermatids resistant to the process of testicular homogenization (stage 19 of spermiogenesis) and spermatozoa present in the caput/corpus and cauda epididymidis were enumerated as described by Robb et al (1978), with modifications by Fernandes et al (2007). To calculate the daily sperm production (DSP), the number of spermatids per testis was divided by 6.1, which is the number of days in which mature spermatids are present in the seminiferous epithelium. Then, the DSP per gram was calculated to determine the efficiency of the process. Sperm transit time through the epididymal caput/corpus and cauda was obtained by dividing the number of spermatozoa present in each of these regions by DSP.

*Histological analysis of testis and epididymis.* The left testis and epididymis were fixed in Alfac fixing solution (85% ethanol, 10% formaldehyde, and 5% glacial acetic acid) for 24 hours. The fixed organs were embedded in paraplast and subjected to histological cuts of 5 μm thickness, subsequently stained with hematoxylin and eosin. Histological evaluation was carried out with the use of transverse sections of the testis and longitudinal sections of the epididymis, analyzed with the aid of a light microscope.

*Sperm morphology and motility.* With the aid of a syringe and a needle, spermatozoa were removed from the left vas deferens through internal rinsing with 1.0 mL of formol-saline. For the analysis, smears were prepared on histological slides that were left to dry for 90 minutes and observed in a phase-contrast microscope (×400 magnification; Seed et al, 1996); 200 spermatozoa were analyzed per animal. Morphological abnormalities were classified into general categories pertaining to head morphology (without curvature, without characteristic curvature, pinhead, or isolated form, ie, no tail attached) and tail morphology (broken, isolated, ie, no head attached, or rolled into a spiral) (Filler, 1993).

Sperm motility was analyzed as described by Perobelli et al (2010) on spermatozoa collected from the right vas deferens.

*Experiment 2—Sexual behavior, fertility, and reproductive performance after mating.* In this experiment, another batch of 20 male rats (120 days old) and 40 females (70 days old) were used following the same experimental design as described for Experiment 1.

*Sexual behavior.* One day after the end of sibutramine treatment, male rats were placed individually in boxes of polycarbonate crystal, measuring 44 × 31 × 16 cm, 5 minutes before introduction of 1 sexually receptive adult female. Behavioral testing was conducted for 4 hours in the dark period of the cycle under dim red illumination. For the next

Table 1. Serum hormonal levels expressed as  $\bar{x} \pm SEM$ ; Mann-Whitney test,  $P > .05$

	Experimental Groups	
	Control (n = 10)	Sibutramine (n = 10)
FSH, ng/mL	6.05 $\pm$ 0.46	6.10 $\pm$ 0.53
LH, ng/mL	1.64 $\pm$ 0.32	1.50 $\pm$ 0.30
Testosterone, ng/mL	2.23 $\pm$ 0.29	2.33 $\pm$ 0.48

Abbreviations: FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone.

40 minutes, the following measures were recorded: intromission latency, defined as the time from introduction of the female into the cage to the first intromission; intromission frequency, the number of intromissions preceding the first ejaculation; ejaculation latency, the time from introduction of the female into the cage to the first ejaculation; intromission latency postejaculation, the time to the first intromission after the first ejaculation; intromission frequency postejaculation, the number of intromissions after the first ejaculation; total number of ejaculations (Alhenius and Larsson, 1984; Ågmo, 1997). If the male did not mount or intromit in the first 10 minutes after the introduction of 1 adult female into the box, it was considered sexually inactive.

**Fertility and reproductive performance.** Rats that ejaculated during evaluation of sexual behavior stayed with the females for an additional 4 hours, permitting a greater number of ejaculations. The animals deemed inactive were tested again daily for the next 5 days, during which different females in estrus were placed in their boxes during the dark period of the cycle. At the end of the afternoon males and females were separated and vaginal smears were collected, in which initial sperm detection was determined to be day 0 of gestation (GD0). On GD20, females were killed by decapitation. After collection of the uterus and ovaries, the numbers of corpora lutea, implantation sites, resorptions, live fetuses, and fetal weights were determined. From these results were determined fertility potential (efficiency of implantation), implantation sites/corpora lutea  $\times$  100; rate of preimplantation loss, (number of corpora lutea – number of implantations)/number of corpora lutea  $\times$  100; rate of postimplantation loss, (number of implantations – number of live fetuses)/number of implantations  $\times$  100; and sex ratio, number of male fetuses/number of female fetuses  $\times$  100.

**Experiment 3—Pharmacological reactivity of isolated distal cauda epididymal duct.** Adult male Wistar rats (90 days old, n = 4) were killed by decapitation, and the whole epididymis was carefully excised. Strips from the distal cauda epididymidis (Hinton et al, 1979) were dissected and cleaned of adherent tissues and spermatozoa. Tissues were mounted in organ baths under 9.8 mN resting tension in a nutrient solution with the composition (mM)—NaCl 138; KCl 5.7; CaCl<sub>2</sub> 1.8; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.36; NaHCO<sub>3</sub> 15, dextrose 5.5—prepared in glass-distilled, deionized water, maintained at 30°C, pH 7.4, and continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Changes of isometric tension in the distal cauda epididymidis were digitally recorded. After a 30-minute stabilization period with adjustments of basal tension, tissues were challenged with 80 mM KCl until

Table 2. Reproductive organs and body weights expressed as  $\bar{x} \pm SEM$

	Experimental Groups	
	Control (n = 10)	Sibutramine (n = 10)
Final body, g	460.16 $\pm$ 11.52	437.34 $\pm$ 10.25
Testis, g	1.74 $\pm$ 0.06	1.83 $\pm$ 0.06
Epididymis, mg	715.86 $\pm$ 22.72	652.62 $\pm$ 13.37 <sup>a</sup>
Ventral prostate, mg	597.01 $\pm$ 40.33	437.17 $\pm$ 34.99 <sup>a</sup>
Full seminal vesicle, g	1.59 $\pm$ 0.13	1.37 $\pm$ 0.07
Empty seminal vesicle, mg	611.26 $\pm$ 38.12	563.53 $\pm$ 29.78
Vas deferens, mg	131.51 $\pm$ 3.78	123.99 $\pm$ 5.21

<sup>a</sup> Student's *t* test,  $P < .05$ .

reproducible contractions were obtained. Then, a concentration-response curve to norepinephrine was obtained in the absence of sibutramine by adding accumulating concentrations of the agonist, which was taken as a control curve. After washing and relaxation, increasing concentrations of sibutramine (1, 3, and 10  $\mu$ M) were incubated for at least 45 minutes, then a new concentration-response curve to norepinephrine was obtained. Concentration-response curves to norepinephrine were normalized by the percentage of the maximal response obtained in the control curve. The potencies of norepinephrine (pEC<sub>50</sub>) in the absence and presence of sibutramine were measured by the negative logarithm of the concentration of norepinephrine that produced 50% of the maximal response. Erratic contractile activity triggered by sibutramine was quantified by the sum of any phasic or tonic activity above baseline during 5 minutes. For normalization purposes, these measurements were taken 30 minutes after the addition of sibutramine.

**Statistical Analysis**—ANOVA, Student's *t*, or nonparametric Mann-Whitney tests were used to compare the data, according to the experiment and characteristic of each variable. Differences were considered statistically significant at  $P < .05$ .

## Results

Although the hormonal assay revealed that experimental groups did not differ significantly in serum levels of testosterone, LH, or FSH (Table 1), sibutramine-treated rats showed a significant reduction in the weights of the epididymis and prostate (Table 2).

Exposure to sibutramine did not markedly alter the number of mature spermatids in the testis, the daily sperm production, and the number and sperm transit time through the caput/corpus epididymidis. On the other hand, there was a significant reduction in both sperm number and transit time in the epididymal cauda (Table 3).

Histopathological analysis of the testes and epididymis (data not shown) did not reveal any apparent alterations that could be attributed to sibutramine exposure (mean percentages of normal tubules in the

Table 3. Sperm parameters expressed as  $\bar{x} \pm SEM$ 

	Experimental Groups	
	Control (n = 10)	Sibutramine (n = 10)
Spermatid number, $10^6$ /testis	216.07 $\pm$ 9.45	235.22 $\pm$ 7.43
Daily sperm production		
$10^6$ /testis/d	35.42 $\pm$ 1.55	38.56 $\pm$ 1.22
$10^6$ /g testis/d	24.67 $\pm$ 1.02	25.00 $\pm$ 1.02
Caput/corpus epididymal sperm number, $10^6$ /organ	136.18 $\pm$ 6.82	148.34 $\pm$ 7.79
Cauda epididymal sperm number, $10^6$ /organ	276.16 $\pm$ 12.37	180.98 $\pm$ 8.87 <sup>a</sup>
Sperm transit time in the caput/corpus, d	3.86 $\pm$ 0.16	3.86 $\pm$ 0.19
Sperm transit time in the cauda, d	7.85 $\pm$ 0.32	4.73 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Student's *t* test,  $P < .05$ .

Table 4. Sexual behavior endpoints expressed as  $\bar{x} \pm SEM$ , with latencies expressed in seconds. The number of animals that presented the behavior is indicated in parentheses. Student's *t* test,  $P > .05$ 

	Experimental Groups	
	Control (n = 10)	Sibutramine (n = 8)
Latency to the first intromission, s	50.78 $\pm$ 10.09 (9)	37.25 $\pm$ 13.15 (8)
No. of intromissions until the first ejaculation	22.00 $\pm$ 1.97 (9)	17.25 $\pm$ 2.45 (8)
Latency to the first ejaculation, s	1166.63 $\pm$ 123.72 (8)	999.29 $\pm$ 112.95 (7)
First postejaculatory intromission, s	373.83 $\pm$ 40.78 (6)	461.83 $\pm$ 26.73 (6)
No. of postejaculatory intromissions	10.33 $\pm$ 1.41 (6)	10.17 $\pm$ 2.71 (6)
No. of ejaculations	1.62 $\pm$ 0.26 (8)	1.57 $\pm$ 0.20 (7)

control group = 98% and in the sibutramine group = 97.5%). In the same way, the number of morphologically normal spermatozoa in the sibutramine-treated group (96%) was comparable to that of the control group (95.8%). Sibutramine also did not interfere with sperm motility (data not shown).

Tables 4 and 5 show that there were no differences among the experimental groups in sexual behavior and reproductive performance.

In the absence of sibutramine, no spontaneous contractile activity was observed in the rat isolated distal cauda epididymidis (Figure 1a). The incubation with 1, 3, and 10  $\mu$ M sibutramine induced phasic contractions in the epididymal duct (Figure 1b through

d). The sum of the contractile activity induced by sibutramine measured during 5 minutes was higher than the contractile activity measured in the absence of sibutramine (n = 7–8,  $P < .05$ ; Figure 1e).

Norepinephrine induced concentration-dependent contractions in the rat distal cauda epididymidis with high potency ( $pEC_{50} = 6.53 \pm 0.06$ , n = 8). Incubation with 1, 3, and 10  $\mu$ M of sibutramine increased the sensitivity of the distal cauda epididymidis to norepinephrine approximately 8- ( $pEC_{50} = 7.45 \pm 0.09$ , n = 7), 16- ( $pEC_{50} = 7.72 \pm 0.10$ , n = 7), and 14-fold ( $pEC_{50} = 7.66 \pm 0.19$ , n = 7), respectively (n = 7–8,  $P < .05$ ). This increase was characterized by a leftward shift in the concentration-response curve to norepinephrine (Fig-

Table 5. Fertility and reproductive performance expressed as  $\bar{x} \pm SEM$ . Student's *t* test,  $P > .05$ 

	Experimental Groups	
	Control (n = 10)	Sibutramine (n = 8)
Body weight of dams, g	354.37 $\pm$ 8.63	373.96 $\pm$ 4.81
No. of corpora lutea	12.10 $\pm$ 0.57	13.37 $\pm$ 0.26
No. of implants	11.80 $\pm$ 0.70	12.37 $\pm$ 0.37
No. of resorptions	0.20 $\pm$ 0.20	0.50 $\pm$ 0.27
No. of live fetuses	11.60 $\pm$ 0.69	11.87 $\pm$ 0.40
Fetus weight, g	3.07 $\pm$ 0.05	3.07 $\pm$ 0.06
Sex ratio, % <sup>a</sup>	100.00 (66.67–159.82)	78.57 (66.67–206.25)
Fertility potential, % <sup>a</sup>	100.00 (100.00–100.00)	96.43 (88.87–100.00)
Preimplantation loss, % <sup>a</sup>	0.00 (0.00–0.00)	3.57 (0.00–11.12)
Postimplantation loss, % <sup>a</sup>	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–7.63)

<sup>a</sup> Values expressed as median (Q1–Q3). Mann-Whitney test,  $P > .05$ .

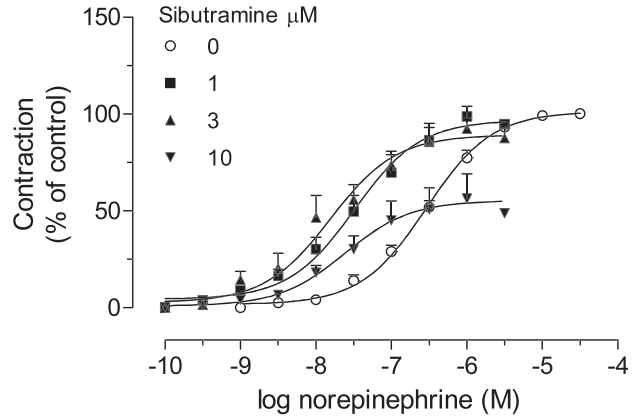
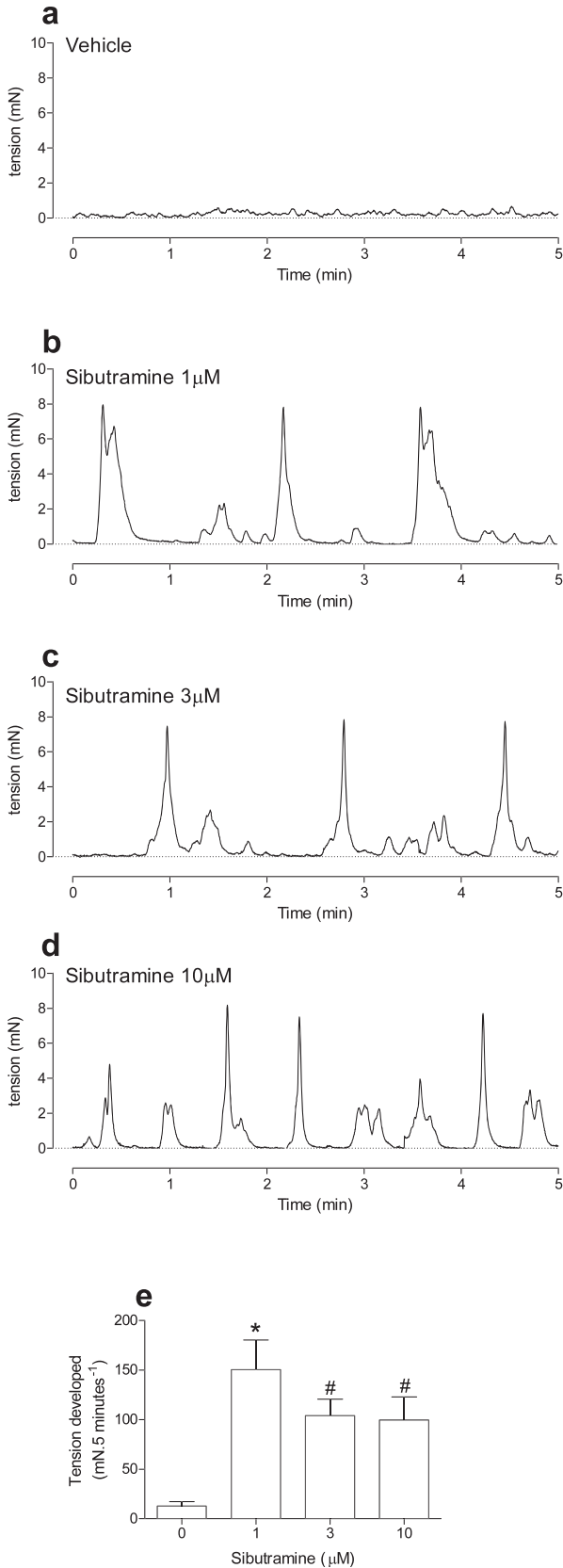


Figure 2. Concentration-response curves to norepinephrine in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine. Each symbol represents the mean, and the vertical bars are the SEM of 8 tissues taken from 4 rats.

ure 2). Additionally, the 10 μM concentration of sibutramine reduced the maximal contractions induced by norepinephrine (n = 7–8, *P* < .001; Figure 2).

### Discussion

Despite the increasing use of drugs for treating obesity, specific detailed work on the reproductive effects of these compounds, including sibutramine, are scarce.

It is known that the autonomic nervous system plays an important role in the growth, maturation, and secretory function of the prostate (Rodrigues et al, 2002). Possibly, the diminution of the weight of the prostate in the absence of effects on testosterone levels in animals treated with sibutramine is due to the sympathomimetic effect of this drug and is related to its capacity to inhibit noradrenaline reuptake (Haynes and Egri, 2005; Nojimoto et al, 2009). The reduction of epididymal weight caused by sibutramine might have occurred because of the diminished number of spermatozoa in the epididymal cauda region.

Sperm transport through the epididymis is mediated by contraction of smooth muscles surrounding the duct. The epididymis receives autonomic innervation pro-

←

Figure 1. Representative tracings of the contractile activity induced by vehicle (**a**) and sibutramine 1 (**b**), 3 (**c**), and 10 (**d**) μM in the distal portion of the rat cauda epididymidis. (**e**) Tension developed after 5 min in the absence (vehicle, water) and presence of increasing concentration of sibutramine. Values are  $\bar{x} \pm$  SEM of 8 tissue segments taken from 4 different rats. This is different from the tension developed in the presence of vehicle (ANOVA followed by Newman-Keuls; \* *P* < .001, # *P* < .05).



ceeding from the inferior mesenteric ganglion, major pelvic ganglion, and pelvic accessory ganglion (Ricker, 1998). The sympathetic innervation controls the smooth muscle contractions of the epididymal duct in all regions of the epididymis, mainly by activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors (Pholpramool and Triphrom, 1984; Ventura and Pennefather, 1991, 1994). Drugs that interfere with the sympathetic system or contractile activity of epididymis have important effects on the sperm transit time through the organ (Billups et al, 1990; Kempinas et al, 1998a; Fernandez et al, 2008).

Sibutramine showed 2 distinct effects in the rat distal cauda epididymidis: increased potency of norepinephrine and increased mechanical activity. Similar effects have also been observed in the vas deferens and seminal vesicle by Nojimoto et al (2009). The increased potency of norepinephrine in the rat distal cauda epididymidis observed in this study might result from the inhibition of neuronal reuptake by sibutramine, and the induction of mechanical activity might be associated with the ability of sibutramine to block voltage-gated  $K^+$  channels (Kim et al, 2007). It is known that voltage-gated  $K^+$  channels have an important function in the control of smooth muscle contraction. In the bovine epididymal duct, it has been demonstrated that voltage-gated *ether-à-go-go*-related gene (Erg  $K^+$ ) channels modulate contractile activity (Mewe et al, 2008). In addition, 10  $\mu$ M sibutramine suppressed the maximal contraction obtained in the concentration-response curves to norepinephrine in the rat cauda distal epididymidis. Similarly, Nojimoto et al (2009) observed reductions in the maximal contraction of the rat vas deferens and seminal vesicle with sibutramine 10, 30, and 100  $\mu$ M. This effect was credited to the action of sibutramine in blocking  $Ca^{2+}$  influx into the smooth muscle cells, and this could explain the same action observed here in the rat cauda epididymidis.

The passage of spermatozoa through the epididymis occurs by means of spontaneous contractile activity of smooth muscle in the regions of the caput and corpus and induced contractile activity of smooth muscle in the cauda region, which is highly innervated (Kaleczyc et al, 1993; Ricker, 1998; Kempinas and Klinefelter, 2010). In the present study, the sympathomimetic effect of sibutramine in the smooth muscle of rat distal cauda epididymidis could explain the decrease in sperm number and acceleration of sperm transit time, mainly by induction of contractile activity.

Nojimoto et al (2009) demonstrated that sibutramine can interfere with ejaculation. However, this was not observed in the present study because the animals of both experimental groups presented sexually similar behavior. This might have occurred because of differences in experimental protocols and in the sibutramine

doses used in each study. Moreover, sperm motility, fertility, and reproductive performance were not altered by sibutramine exposure.

Therefore, although sibutramine in these experimental conditions did not interfere with the reproductive process of rats, it provoked acceleration of the sperm transit and decreased the sperm reserves in the epididymal cauda. This alteration is probably related to the sympathomimetic effect of this drug, as shown by the in vitro assays. In humans, use of this drug could present a threat for male fertility because sperm reserves in men are naturally lower compared with rats (Johnson et al, 1997).

## Acknowledgments

We are grateful to Dr Janete Aparecida Anselmo-Franci and to Dr Ruither de Oliveira Gomes Carolino of the Department of Morphology, Stomatology, and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo—USP, for collaboration with the hormonal assays. This paper represents part of the Master's thesis presented by F. F. Bellentani to UNESP—Univ Estadual Paulista, Brazil.

## References

- Ågmo A. Male rat sexual behavior. *Brain Res Protoc.* 1997;1:203–209.
- Ahlenius S, Larsson K. Apomorphine and haloperidol-induced effects on male rat sexual behavior: no evidence for actions due to stimulation of central dopamine autoreceptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 1984;21:463–466.
- Ara R, Brennan A. The cost-effectiveness of sibutramine in non-diabetic obese patients: evidence from four Western countries. *Obes Rev.* 2007;8:363–371.
- Billups KL, Tillman S, Chang TS. Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens. *J Urol.* 1990;143:625–629.
- Cuellar GE, Ruiz AM, Monsalve MC, Berber A. Six-month treatment of obesity with sibutramine 15 mg; a double-blind, placebo-controlled monocenter clinical trial in a Hispanic population. *Obes Res.* 2000;8:71–82.
- Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CD, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol.* 2007;23:106–112.
- Fernandez CD, Porto EM, Arena AC, Kempinas WDG. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Int J Androl.* 2008;31:427–437.
- Filler R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: Chapin RE, Heindel JH, eds. *Male Reproductive Toxicology.* San Diego, CA: Academic Press Inc; 1993:334–343.
- Haynes WG, Egri Z. Sibutramine and the sympathetic nervous system in obese humans. *Clin Auton Res.* 2005;15:189–192.
- Hinton BT, Dott HM, Setchell BP. Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *J Reprod Fertil.* 1979;55:167–172.
- Hirsch J, Mackintosh RM, Aronne LJ. The effects of drugs used to treat obesity on the autonomic nervous system. *Obes Res.* 2000;8:227–233.
- Johnson L, Welsh TH Jr, Wilker CE. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In:

- Sipes G, McQueen CA, Gandolfi AJ, eds. *Comprehensive Toxicology*. Vol 10. New York, NY: Elsevier Science Inc; 1997:6–51.
- Kaleczyc J, Majewski M, Całka J, Lakomy M. Adrenergic innervation of the epididymis, vas deferens, accessory genital glands and urethra in the boar. *Folia Histochem Cytobiol*. 1993;31:117–123.
- Kempinas WDG, Klinefelter GR. The epididymis as a target for toxicants. In: McQueen CA, ed. *Comprehensive Toxicology*. Oxford, United Kingdom: Academic Press; 2010:149–166.
- Kempinas WDG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Klinefelter GR. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol Reprod*. 1998a;59:890–896.
- Kempinas WDG, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, Narotsky MG, Perreault SD, Evenson DP, Ricker DD, Klinefelter GR. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod*. 1998b;59:897–904.
- Kim SE, Ahn HS, Choi BH, Jang HJ, Kim MJ, Rhie DJ, Yoon SH, Jo YH, Kim MS, Sung KW, Hahn SJ. Open channel block of A-type, kv4.3, and delayed rectifier K<sup>+</sup> channels, Kv1.3 and Kv3.1, by sibutramine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321:753–762.
- Luque CA, Rey JA. Sibutramine: a serotonin-norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity. *Ann Pharmacother*. 1999;33:968–978.
- Luque CA, Rey JA. The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol*. 2002;440:119–128.
- Mewe M, Wulfsen I, Schuster AM, Middendorff R, Glassmeier G, Schwarz JR, Bauer CK. Erg K<sup>+</sup> channels modulate contractile activity in the bovine epididymal duct. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R895–R904.
- Nojimoto FD, Piffer RC, Kiguti LR, Lameu C, de Camargo AC, Pereira OC, Pupo AS. Multiple effects of sibutramine on ejaculation and on vas deferens and seminal vesicle contractility. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;239:233–240.
- Perobelli JE, Martinez MF, Franchi CAS, Fernandez CD, Camargo JL, Kempinas WDG. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73:991–1002.
- Perrio MJ, Wilton LV, Shakir SA. The safety profiles of orlistat and sibutramine: results of prescription-event monitoring studies in England. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:2712–2722.
- Pholpramool C, Triphrom N. Effects of cholinergic and adrenergic drugs on intraluminal pressures and contractility of the rat testis and epididymis in vivo. *J Reprod Fertil*. 1984;71:181–188.
- Richter WO. How safe are the new obesity drugs? Indications and contraindications of orlistat and sibutramine. *MMW Fortschr Med*. 1999;141:32–36.
- Ricker DD. The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl*. 1998;19:1–4.
- Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*. 1978;54:103–107.
- Rodrigues AO, Machado MT, Wroclawski ER. Prostate innervation and local anesthesia in prostate procedures. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002;57:287–292.
- Scheen AJ. Suspension of the commercialization of sibutramine and rosiglitazone in Europe. *Rev Med Liege*. 2010;65:574–579.
- Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Veeramachaneni DN, Wise LD. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol*. 1996;10:237–244.
- Ventura S, Pennefather JN. Sympathetic co-transmission to the cauda epididymis of the rat: characterization of postjunctional adrenoceptors and purinoceptors. *Br J Pharmacol*. 1991;102:540–544.
- Ventura S, Pennefather JN. Alpha 2-adrenoceptor binding sites vary along the length of the male reproductive tract: a possible basis for the regional variation in response to field stimulation. *Eur J Pharmacol*. 1994;254:167–173.