



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE ADRENOCEPTORES α_{1A} E α_{1D} NA CONTRAÇÃO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE RATO E SUA MODULAÇÃO ANDROGÊNICA E ESTROGÊNICA

LUIZ RICARDO DE ALMEIDA KIGUTI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
campus de Botucatu/UNESP, para obtenção do
título de doutor no Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas – Farmacologia

André Sampaio Pupo

BOTUCATU – SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE
ADRENOCEPTORES α_{1A} E α_{1D} NA CONTRAÇÃO
DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE RATO E SUA
MODULAÇÃO ANDROGÊNICA E ESTROGÊNICA**

LUIZ RICARDO DE ALMEIDA KIGUTI

PROF. DR. ANDRÉ SAMPAIO PUPO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
campus de Botucatu/UNESP, para obtenção do
título de doutor no Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas – Farmacologia

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Kiguti, Luiz Ricardo de Almeida.

Investigação da participação de adrenoceptores alfa1A e alfa1D na contração da cauda do epidídimo de rato e sua modulação androgênica e estrogênica / Luiz Ricardo de Almeida Kiguti. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo

Capes: 21005001

1. Epidídimo. 2. Receptores adrenérgicos. 3. Estrógenos. 4. Andrógenos. 5. Contração muscular. 6. Rato.

Palavras-chave: Adrenoceptores alfa1; Andrógeno; Epidídimo; Estrógeno.

Auxílio Financeiro

CAPES

(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE): 12355/13-5

DEDICATÓRIA

Aos meus irmãos Luiz Gustavo de Almeida Kiguti e Guilherme de Almeida Kiguti pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas, pela convivência harmoniosa e amorosa.

À minha amada companheira Celi Macedo Polo pela amizade, companheirismo, compreensão, paciência e amor dedicados.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Sampaio Pupo pelos anos de orientação, ensinamentos e oportunidades.

Ao Prof. Dr. Roger James Summers e Sabatino Ventura pela oportunidade de realização de estágio no Monash Institute of Pharmaceutical Sciences da Monash University (Melbourne, Australia)

Às Dras. Bronwyn Evans, Dana Hutchinson e Martina Kocan pela orientação nos experimentos e discussões durante o estágio na Monash University

À Linzi Lim, Sheng Yu Ang, Mohsin Sarwar e Dalibor Mijaljica pelo auxílio na realização dos experimentos durante o estágio na Monash University

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Ênio Setsuo Arakaki Pacini pelo esforço em conjunto no estabelecimento da cauda do epidídimo de rato como modelo experimental e pela contribuição na caracterização farmacológica dos α_1 -ARs da cauda do epidídimo.

À Vanessa Lima, Juliana Akinaga, Carlos Alberto da Silva Ribeiro, Raquel de Cássia dos Santos e Katiussia Pinho da Silva pela contribuição na realização dos experimentos e, principalmente, pelas estimulantes discussões.

Aos professores do Departamento de Farmacologia pela excelente contribuição em minha formação acadêmica.

Aos servidores técnicos do Departamento de Farmacologia Luiz Antonio de Oliveira, Paulo Cesar Mioni e Hélio Kushima pela contribuição na realização de diferentes experimentos.

ÍNDICE

Índice de Figuras	1
Índice de Tabelas.....	5
Lista de siglas e abreviaturas.....	7
Resumo.....	9
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1 Epidídimo.....	11
1.2 Subtipos de α_1 -ARs e oligomerização.....	14
1.3 Expressão dos α_1 -ARs no epidídimo.....	22
2. Objetivo.....	23
2.1 Objetivos específicos.....	23
3. Material e métodos.....	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Estudos de contração do ducto epididimário da cauda do epidídimo (CE) in vitro	
3.2.1 Isolamento de segmentos do ducto epididimário.....	24
3.2.2 Avaliação da ordem de potência de agonistas de α_1 -ARs na contração da CE	25
3.2.3 Avaliação da potência ou afinidade de antagonistas seletivos contra as contrações da CE induzidas pelos diferentes agonistas.....	26
3.2.4 Investigação da participação de α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs na contração da CE por experimentos de proteção contra os antagonistas irreversíveis fenoxibenzamina e cloroetilclonidina.....	27
3.2.4.1 Fenoxibenzamina.....	28
3.2.4.2 Cloroetilclonidina.....	29
3.2.4.3 Análise do efeito protetor dos antagonistas incubados.....	30
3.3 Avaliação da expressão dos α_1 -ARs no ducto epididimário da CE de rato.....	31
3.3.1 Experimentos de ligação do [3 H]Prazosin a segmentos intactos de ducto epididimário da CE	31

3.3.2	Curvas de saturação da ligação do [³ H]Prazosin.....	32
3.3.3	Curvas de inibição da ligação do [³ H]Prazosin a segmentos intactos da CE.....	32
3.4	Avaliação da modulação androgênica e estrogênica dos subtipos de α_1 -ARs mediando contração da CE de rato.....	33
3.4.1	Orquidectomia bilateral.....	34
3.4.2	Investigação da modulação androgênica dos α_1 -ARs mediando contração da CE de ratos jovens.....	35
3.5	Investigação da dimerização entre os α_{1A} -ARs, α_{1B} -ARs e α_{1D} -ARs recombinantes humanos.....	36
3.5.1	Ensaio de transferência de bioluminescência por ressonância (BRET) para detecção da dimerização de receptores.....	38
3.5.1.1	Avaliação da dimerização entre os α_{1A} -eGFP, α_{1B} -eGFP, α_{1D} -eGFP ou Δ^{1-79} α_{1D} -eGFP e o α_{1A} -Rluc8 por curvas de saturação BRET.....	40
3.5.2	Investigação do efeito funcional da co-expressão dos α_{1A} -ARs e Δ^{1-79} α_{1D}	42
3.5.2.1	Aumento de cálcio intracelular livre.....	42
3.5.2.2	Investigação do efeito funcional da expressão dos α_{1A} -ARs e Δ^{1-79} α_{1D} -ARs recombinantes humanos em células HEK 293.....	43
3.5.2.3	Investigação do efeito funcional da expressão do Δ^{1-79} α_{1D} -AR recombinante humano na sinalização de um α_{1A} -ARs endogenamente expresso em células 22Rv1.....	43
3.5.3	Avaliação da expressão de α_1 -AR por ensaios de ligação do [³ H]Prazosin.....	44
3.6	Drogas, reagentes e soluções.....	45
3.7	Análise estatística.....	46
4.	Resultados.....	47
4.1	Expressão dos α_1 -ARs na CE.....	47
4.2	Avaliação do subtipo de α_1 -ARs funcional na contração à noradrenalina exógena.....	49

4.2.1 Avaliação do efeito protetor de antagonistas seletivos contra a inativação de α_1 -ARs da CE por antagonistas irreversíveis.....	57
4.2.2 Fenoxibenzamina (PBZ).....	57
4.2.3 Cloroetilclonidina (CEC).....	62
4.3 Investigação da heterodimerização dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs.....	70
4.3.1 Investigação da dimerização entre os α_{1A} -eGFP, α_{1B} -eGFP, α_{1D} -eGFP ou Δ^{1-79} α_{1D} -eGFP e o α_{1A} -Rluc8 por curvas de saturação de BRET.....	70
4.3.2 Avaliação do efeito funcional da co-expressão do Δ^{1-79} α_{1D} -AR no aumento de cálcio intracelular livre induzido pela ativação do α_{1A} -ARs recombinantes humanos expressos em células HEK 293.....	72
4.3.3 Investigação do efeito da expressão dos Δ^{1-79} α_{1D} -HA no aumento de cálcio intracelular livre induzido por um α_{1A} -AR endogenamente expresso em células 22Rv1.....	76
4.4 Investigação da modulação androgênica e estrogênica da plasticidade dos subtipos de α_1 -ARs mediando contração da CE de rato.....	84
4.4.1 Orquidectomia bilateral por 8 dias.....	85
4.4.1.1 Expressão dos α_1 -ARs na CE.....	85
4.4.1.2 Efeitos da castração por orquidectomia por 8 dias na contração do ducto epididimário da CE.....	90
4.4.2 Orquidectomia bilateral por 30 dias.....	95
4.4.2.1 Contração da CE de ratos castrados por orquidectomia bilateral por 30 dias.....	97
4.4.3 Contratilidade da CE de ratos jovens.....	109
4.4.3.1 Contratilidade da CE de ratos jovens tratados com veículo.....	109
4.4.3.2 Efeito do tratamento com andrógeno na contratilidade da CE de ratos jovens.....	112
5. Discussão.....	116

6. Conclusões.....	137
Referências bibliográficas.....	138

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Fotografia e esquemas da estrutura do epidídimo.	11
2. Esquema ilustrativo da estrutura primária do α_{1A} -AR humano.....	15
3. Esquema ilustrativo da ativação das proteínas $G_{q/11}$ pelos α_1 -ARs.....	16
4. Estrutura do homodímero de receptores κ -opioides determinada por difração de raios X.....	20
5. Fotografia de um epidídimo de rato.....	25
6. Esquema ilustrativo do protocolo experimental empregado para avaliação do efeito protetor dos antagonistas sobre a inativação dos α_1 -ARs induzida pela fenoxibenzamina (PBZ).....	28
7. Esquema ilustrativo do protocolo experimental empregado para avaliação do efeito protetor dos antagonistas sobre a inativação dos α_{1A} -ARs induzida pela cloroetilclonidina (CEC).	29
8. Esquema ilustrativo do processo da transferência de bioluminescência por ressonância (BRET) utilizando o par Rluc8/eGFP como doador/aceptor.....	39
9. <i>Binding</i> do [3 H]Prazosin a segmentos intactos da CE de rato.....	47
10. A) Curvas concentração-resposta para diferentes agonistas na CE distal de rato. B) Curvas concentração-resposta cumulativas consecutivas para oximetazolina na CE de rato.....	50
11. Caracterização do subtipo de α_1 -AR funcional envolvido na contração da CE à noradrenalina exógena.....	52
12. Gráficos de correlação entre as afinidades dos antagonistas seletivos determinadas em experimentos de inibição da ligação específica do [3 H]Prazosin nos receptores α_{1a} (A), α_{1b} (B) e α_{1d} (C) recombinantes humanos e as afinidades/potências determinadas contra as contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de rato.....	54

13. Antagonismo das contrações de segmentos da CE induzidas pelos agonistas α_{1A} seletivos A61603 (E a H) e oximetazolina (I a L) pelo prazosin (α_1 -seletivo), RS 100329 (α_{1A} -seletivo), L-765,314 (α_{1B} -seletivo) e BMY 7378 (α_{1D} -seletivo)...	56
14. Efeito da PBZ sobre as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de rato.	58
15. Proteção dos α_1 -ARs da CE (A), ducto deferente (B) ou aorta torácica (C) de rato contra a inativação induzida pela PBZ (30nM por 10 minutos).....	60
16. Efeito da CEC nas contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de rato.....	62
17. Investigação da proteção dos α_1 -ARs da CE de rato pelos antagonistas seletivos prazosin, RS 100329 ou BMY 7378 nas contrações induzidas pela noradrenalina (A a D) ou A61603 (E a H).....	64
18. Antagonismo da contração induzida pela noradrenalina pelo RS 17053 10nM.....	67
19. Avaliação do efeito do RS 17053 10nM contra a inativação dos α_1 -ARs da CE de rato pela CEC.....	69
20. Curvas de saturação de BRET entre os receptores α_{1A} -Rluc8/ α_{1A} -eGFP, α_{1A} -Rluc8/ α_{1B} -eGFP, α_{1A} -Rluc8/ α_{1D} -eGFP e α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP.....	71
21. Curvas concentração-resposta médias para noradrenalina, A61603, cirazolina e oximetazolina em células HEK 293 expressando α_{1A} -Rluc8 (+pcDNA3) (A) ou α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA (+ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$) (B).....	74
22. Caracterização farmacológica dos α_1 -ARs endogenamente expressos mediando aumento de cálcio intracelular livre em células 22Rv1 à noradrenalina.....	78
23. Curvas concentração-resposta à noradrenalina, A61603, cirazolina ou oximetazolina em células 22Rv1 expressando somente o α_{1A} -AR (A, +pcDNA3) ou co-expressando os α_{1A} / $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ (B, + $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$).....	80

24. Antagonismo do aumento de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina (A), A61603 (B), cirazolina (C) e oximetazolina (D) em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1.....	82
25. Efeito da castração e da reposição com DHT (5mg/dia/7dias) sobre o peso de órgãos dependentes de andrógeno do sistema reprodutor masculino de ratos....	84
26. Isotermas de saturação da ligação do [3 H]Prazosin a segmentos da CE de ratos controle e castrados.....	85
27. Curvas de inibição da ligação específica do [3 H]Prazosin a segmentos da CE de ratos controle e castrados+VEH.....	88
28. Registros representativos da tensão basal (A, B e C) e das contrações induzidas pela noradrenalina (D, E e F) da cauda do epidídimo de ratos controle, castrados+VEH e castrados+DHT.....	91
29. Curvas concentração-resposta médias para as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de ratos controle, castrados+VEH e castrados+DHT.....	92
30. Antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos controle, castrados+VEH e castrados+DHT pelo prazosin (A, B, C), RS 100329 (E, F, G) e BMY7378 (H, I, J).....	93
31. Efeito da castração e administração de E2 ou DHT sobre o peso de órgãos sexuais acessórios de rato.....	96
32. Registro da tensão basal de segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento.....	98
33. Registros representativos da contração induzida pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento.....	100
34. Curvas concentração-resposta à noradrenalina na indução de contração de segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento na presença dos antagonistas competitivos de α_1 -ARs prazosin, RS 100329, WB 4101 e BMY 7378.....	103

35. Efeito do antagonista seletivo de α_{1D} -ARs BMY 7378 sob as curvas concentração-resposta à noradrenalina (A, B, C e D) ou ao A61603 (E e F) em segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento.....	107
36. Antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos jovens (53-61 dias de idade) tratados com veículo pelo prazosin (A), RS 100329 (B), BMY 7378 (C) ou L-765,314 (D).....	110
37. Peso relativo de órgãos andrógeno-dependentes de ratos jovens (53-60 dias de idade) tratados com veículo (0.3ml/dia/7dias, sc) ou DHT (5mg/dia/7dias, sc).....	112
38. Curvas concentração-resposta para noradrenalina na CE de ratos jovens tratados com veículo ou DHT (5mg/dia/7 dias).....	113
39. Antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos jovens tratados com DHT (5mg/dia/7dias) pelo prazosin (A), RS 100329 (B), BMY 7378 (C) ou L-765,314 (D).....	115
40. Hipótese para os efeitos funcionais da CEC nas contrações da CE de rato.....	126
41. Hipótese para os efeitos funcionais da PBZ nas contrações da CE de rato.....	128

ÍNDICE DE TABELAS

1. Estimativas de afinidade (K_I) de ligantes de α_1 -ARs frente aos α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} -ARs.....	17
2. Constantes de dissociação em equilíbrio (pK_I) do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 derivadas das curvas de inibição da ligação específica do [3 H]Prazosin a segmentos intactos da CE de rato.....	48
3. Estimativas de potência (pA_2) ou afinidade (pK_B) dos antagonistas seletivos contra as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de rato.....	53
4. Análise quantitativa dos efeitos da PBZ na potência (pD_2) e contração máxima (E_{max}) da noradrenalina na CE, ducto deferente ou aorta torácica de rato.....	61
5. Análise quantitativa dos efeitos de antagonistas seletivos sobre a inativação dos α_1 -ARs mediando contração da CE de rato à noradrenalina ou A61603 pela CEC 10 μ M por 45 minutos.....	65
6. Análise quantitativa da interação entre os diferentes receptores.....	72
7. Potência (pD_2) e resposta máxima (E_{max}) da noradrenalina, A61603 e cirazolina no aumento de cálcio intracelular livre em células HEK 293 expressando o receptor α_{1A} -Rluc8 ou co-expressando os receptores α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA.....	75
8. Análise quantitativa do efeito do RS 17053 e BMY 7378 sobre a elevação de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina ou A61603 em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1.....	83
9. Densidade de receptores (B_{max}) e afinidade (K_D) da ligação específica do [3 H]Prazosin a segmentos da CE de rato.....	86
10. Estimativas de afinidade (pK_I) obtidas por análise de regressão não-linear das curvas de inibição da ligação do [3 H]Prazosin a segmentos da CE de ratos controle e castrados+VEH.....	89
11. Estimativas de afinidade (pK_B) do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 determinados a partir da construção de gráficos de Schild do antagonismo das	

contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de animais controle, castrados+VEH e castrados+ DHT.....	94
12. Contração máxima (Emax, em gramas de tensão) e potência (pD ₂) da noradrenalina na indução de contração na CE de ratos dos diferentes grupos.....	101
13. Potências e afinidades dos antagonistas de α_1 -ARs no antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento.....	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

22Rv1: células humanas de tumor prostático

A61603: *N*-[5-(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-2-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydro naphthalen-1-yl] methanesulfonamide hydrobromide

BMY 7378: 8-(2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl)-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione

BRET: ensaios de transferência de bioluminescência por ressonância

CCR: curva concentração-resposta

CE: cauda do epidídimo

CEC: cloroetilclonidina

CR: *concentration ratio*

DAG: *diacylglycerol*

DHT: 5 α -diidrotestosterona

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

E2: benzoato de 17- β estradiol

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

FLAG: epítipo FLAG

GRK: quinase de receptores acoplados à proteína G

HA: epítipo hemaglutinina

HEK 293: células de rim embrionário humano

HEPES: tampão 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IP3: inositol trisfosfato

L-765,314: (2*S*)-4-(4-amino-6,7-dimethoxy-2-quinazolinyl)-2-[[1,1-dimethylethyl) amino]carbonyl]-1-piperazinecarboxylic acid

PBZ: fenoxibenzamina

PIP2: fosfatil inositol 4,5-bisfosfato

PKC: proteína quinase C

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

RS 100329: *5-Methyl-3-[3-[3-[4-[2-(2,2,2,-trifluoroethoxy)phenyl]-1-piperazinyl]propyl]-2,4-(1H,3H)-pyrimidinedione hydrochloride*

RS 17053: *(N-[2-(2-Cyclopropylmethoxyphenoxy)ethyl]-5-chloro- α,α -dimethyl-1H-indole-3-ethanamine)hydrochloride*

SFB: *soro fetal bovino*

VEH: *veículo*

WB 4101: *2-(2,6-Dimethoxyphenoxyethyl)aminomethyl-1,4-benzodioxane hydrochloride*

Resumo

O epidídimo é o órgão do sistema reprodutor masculino responsável pela maturação e armazenamento dos espermatozóides. A contração da cauda do epidídimo (CE) é um dos primeiros eventos da fase de emissão seminal da ejaculação e o sistema nervoso autônomo simpático desempenha um papel importante na contração da CE através da ativação de adrenorreceptores α_1 (α_1 -ARs). Neste estudo mostramos que a CE expressa α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs e que ambos os receptores contribuem, de um modo complexo, para a contração da CE induzida por agonistas α_1 . Na ausência de ativação por agonistas o α_{1D} -ARs modula a contração induzida pela ativação de α_{1A} -ARs por agonistas exógenos. Os α_{1A} -ARs da CE não são dessensibilizados pela oximetazolina. Os andrógenos desempenham um papel importante na manutenção da interação entre os α_{1A}/α_{1D} -ARs visto que a redução de andrógenos, mas não de estrógenos, pela castração evidencia a presença dos α_{1D} -ARs. A interação complexa entre os α_{1A}/α_{1D} -ARs é discutida no contexto de heterodimerização de receptores visto que mostramos, pela primeira vez, a heterodimerização entre os α_{1A} e α_{1D} -ARs recombinantes humanos.

Abstract

The epididymis is the male reproductive organ responsible for sperm maturation and storage. The contraction of cauda epididymis (CE) during ejaculation is one of the first events of seminal emission phase of ejaculation and the sympathetic nervous system plays a key role in the CE contraction via α_1 adrenoceptors (α_1 -ARs) activation. In this study we show that CE expresses α_{1A} and α_{1D} -ARs and both receptor subtypes contribute in a complex way to the CE contraction induced by α_1 -ARs agonists. The α_{1D} modulates α_{1A} -ARs induced contraction irrespective of agonist-mediated α_{1D} activation. There is no desensitization of CE α_{1A} -ARs to oxymetazoline. The androgens were shown to play an important role in the maintenance of such α_{1A}/α_{1D} interaction as the androgen deprivation unravels the cryptic functional α_{1D} -ARs. Estrogens had no effect on α_1 -ARs mediated contraction of CE. The complex α_{1A}/α_{1D} interaction is discussed in the context of receptor heterodimerization as we showed, for the first time, heteromerization of recombinant α_{1A}/α_{1D} -ARs.

1. Introdução

1.1. Epidídimo

O epidídimo é o órgão do sistema reprodutor masculino que conecta os ductos eferentes do testículo ao ducto deferente. Formado por um túbulo único altamente enovelado o epidídimo desempenha papéis essenciais na maturação e armazenamento dos espermatozoides e é morfologicamente dividido em cabeça, corpo e cauda (Figura 1). Na porção mais distal do epidídimo, a cauda do epidídimo (CE), os espermatozoides maduros são armazenados até o momento da ejaculação.

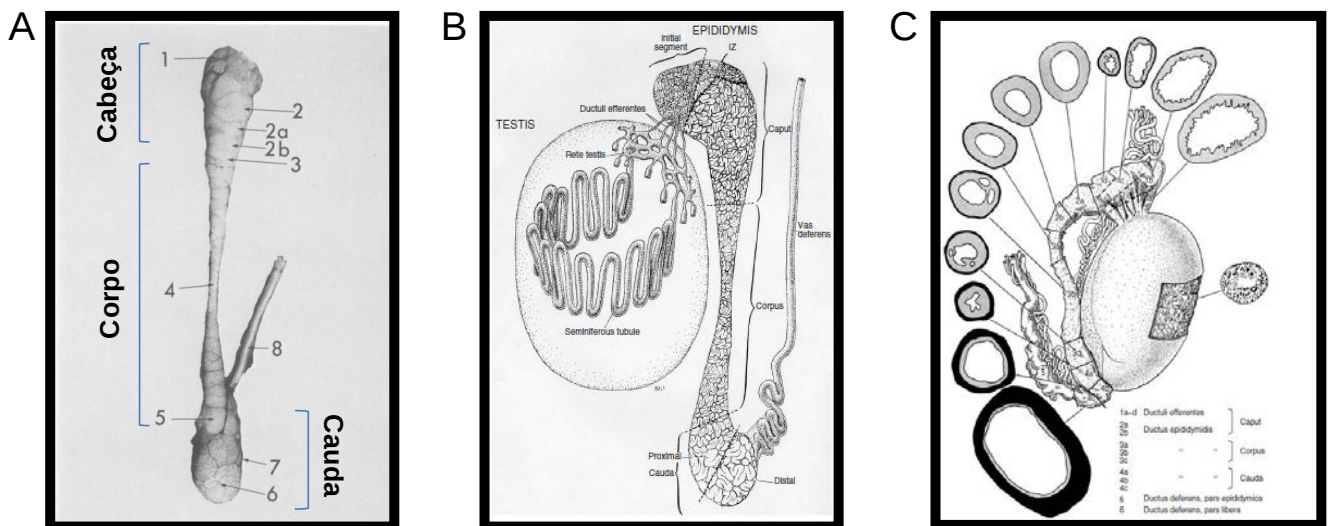


Figura 1. Fotografia e esquemas da estrutura do epidídimo. A) Fotografia do epidídimo de rato demonstrando as divisões cabeça, corpo e cauda. B) Esquema da estrutura do ducto epididimário. C) Esquema de cortes transversais do ducto epididimário de diferentes regiões ao longo do epidídimo; a porção preta envolvendo o ducto epididimário representa a camada de músculo liso. Figuras modificadas de Robaire (2006) e (Hinton *et al.*, 1979).

O epidídimo, assim como o ducto deferente, vesículas seminais e próstata depende de andrógenos para manutenção de sua estrutura e função (Murashima *et al.*, 2014; Robaire *et al.*, 2011). As concentrações epididimárias de andrógenos (testosterona + 5 α -diidrotestosterona) superam em mais de 48 vezes aquelas encontradas no plasma (Turner *et al.*, 1984) e a privação de andrógenos através da castração reduz em até 65% a massa do epidídimo além de alterar significativamente aspectos funcionais do epitélio, efeitos que podem ser prevenidos ou abrandados pela reposição de andrógenos (Fan *et al.*, 1998).

Além da testosterona, outro hormônio sexual importante para o controle da função dos órgãos do sistema reprodutor é o estradiol, um hormônio esteróide sintetizado através da biotransformação da testosterona pela enzima aromatase (Lazari *et al.*, 2009). Historicamente os estrógenos foram considerados hormônios femininos, porém diferentes investigações demonstram que o estradiol possui um papel essencial na fertilidade masculina (Eddy *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 1997).

Através da interação com receptores do tipo α (ER α), o estradiol regula a expressão de genes que realizam a reabsorção de fluido nos ductos eferentes. A inibição dos ER α pelo tratamento com o antiestrógeno ICI 182,780 ou a deleção dos ER α em camundongos nocaute inibe significativamente a reabsorção de fluido pelos ductos eferentes e causa dilatação dos ductos eferentes e rede testis, atrofia testicular e conseqüentemente, infertilidade (Hess *et al.*, 2001). Além disso, sugere-se que a redução da sinalização via ER α em células do epitélio epididimário altera a composição iônica do fluido luminal do ducto epididimário (Hess *et al.*, 2001).

No sistema reprodutor masculino, o estradiol é sintetizado pelas células de Leydig e de Sertoli e atinge o epidídimo através do lúmen do ducto epididimário (Hess *et al.*, 2001). Além disso, a enzima aromatase foi localizada no epitélio do ducto epididimário e sua atividade de síntese de estrógeno a partir de testosterona foi demonstrada na região da CE (Shayu *et al.*, 2006).

As células de músculo liso que envolvem o ducto epididimário da CE expressam ER α e receptores para andrógeno (Joseph *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2002). De fato, a castração altera a contração do epidídimo e o tratamento com testosterona impede essas modificações (Hib *et al.*, 1977). Além disso, o estrógeno regula a contração da CE através da modulação da expressão da Rho quinase e de receptores para ocitocina na musculatura lisa da CE (Fibbi *et al.*, 2009; Vignozzi *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2002).

O músculo liso do ducto epididimário na região da CE contrai durante a fase de emissão seminal do reflexo ejaculatório e propela os espermatozóides em direção ao ducto deferente (Hib *et al.*, 1982). O principal modulador da contratilidade da CE durante a ejaculação é a noradrenalina. A CE recebe densa inervação simpática que cursa através dos nervos hipogástricos e de fato, a desnervação simpática cirúrgica ou química do epidídimo retarda o trânsito e armazenamento de espermatozóides na CE de rato (Billups *et al.*, 1990; Kempinas *et al.*, 1998). A contração da CE à noradrenalina ocorre via ativação de adrenoreceptores α_1 (α_1 -ARs) (Ventura *et al.*, 1994; Ventura *et al.*, 1991). De fato, a administração dos antagonistas de α_1 -ARs prazosin e bunazosin a ratos aumenta a quantidade de espermatozóides na CE devido à redução do transporte de espermatozóides para o ducto deferente (Hibi *et al.*, 1995; Solomon *et al.*, 1997). Os α_1 -ARs são amplamente expressos no trato reprodutor masculino (Avellar *et al.*, 2009) e o papel essencial dos α_1 -ARs na fertilidade masculina é evidenciado pelo fato de que

camundongos nocaute para os três α_1 -ARs são inférteis devido a disfunção ejaculatória (Sanbe *et al.*, 2007).

1.2. Subtipos de α_1 -ARs e oligomerização

Os α_1 -ARs, receptores alvo para a noradrenalina e adrenalina, são membros da família *Rodopsina* de GPCRs (Fredriksson *et al.*, 2003). São reconhecidos três diferentes subtipos de α_1 -AR denominados α_{1A} , α_{1B} , e α_{1D} (Hieble *et al.*, 1995) cada um codificado por um gene diferente localizado nos cromossomos humanos 8 (α_{1A}), 5 (α_{1B}) e 20 (α_{1D}) (Hawrylyshyn *et al.*, 2004). Os α_{1A} -, α_{1B} - e α_{1D} -ARs são proteínas com 466, 519 e 572 aminoácidos, respectivamente (Figura 2).

extracellular

intracellular

● Common aa to the 3 α_1 -ARs subtypes

α_{1A} adrenoceptor (466aa)

Os α_1 -ARs apresentam identidade de 50% e similaridade de 70% nas suas sequências de aminoácidos (Du *et al.*, 2010).

Os três α_1 -ARs sinalizam intracelularmente através da ativação de proteínas G da família $G_{q/11}\alpha$ com conseqüente aumento da concentração intracelular de cálcio livre (Figura 3) (Zhong *et al.*, 1999).

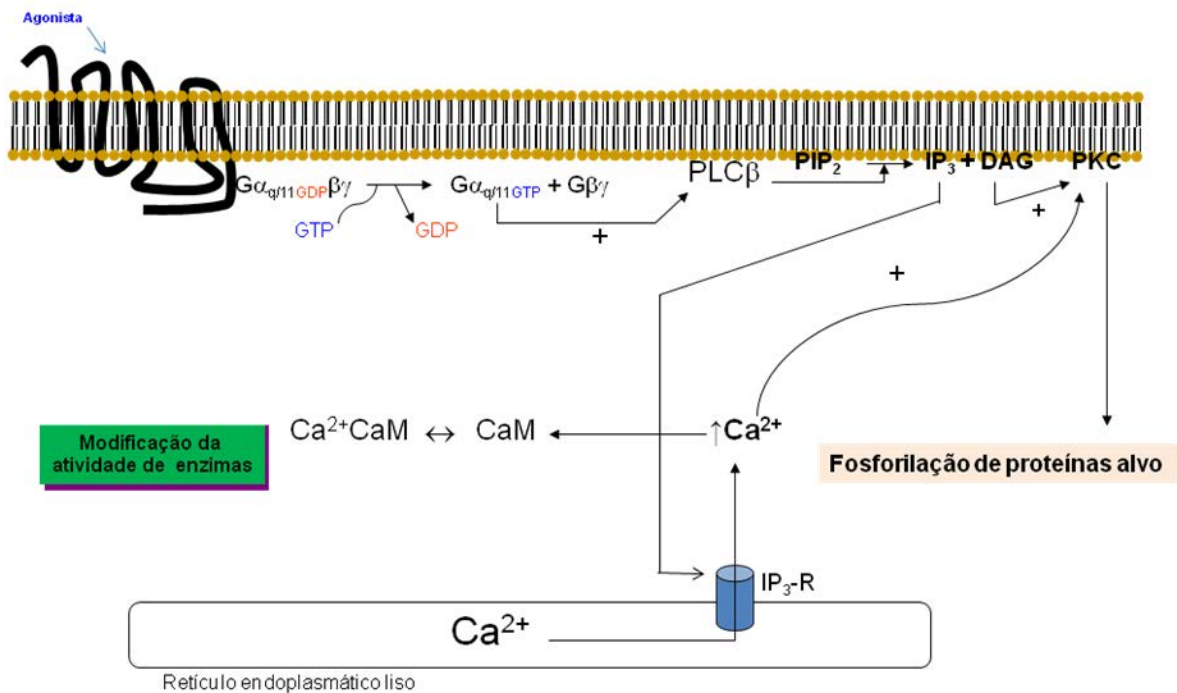


Figura 3. Esquema ilustrativo da ativação das proteínas $G_{q/11}$ pelos α_1 -ARs. Após a ativação por agonistas os α_1 -ARs induzem a troca de GDP por GTP nas subunidades α da proteína G. A $G\alpha$ ativa a fosfolipase $C\beta$ com conseqüente hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) a trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). A ativação de receptores para IP_3 no retículo endoplasmático liso libera o cálcio armazenado e aumenta as concentrações de cálcio intracelular livre com conseqüente ativação da Calmodulina (CaM). O DAG ativa proteínas quinase C (PKC) a qual fosforila proteínas alvo.

Além da ativação das proteína $G_{q/11}$, os três α_1 -ARs ativam outras vias de sinalização que incluem proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), a ativação da fosfolipase D e a liberação de ácido araquidônico (Zhong *et al.*, 1999).

Os subtipos de α_1 -ARs são distinguidos através de farmacologia subtipo específica. A tabela 1 mostra algumas das principais ferramentas farmacológicas utilizadas na caracterização da expressão e função dos diferentes subtipos de α_1 -ARs.

Tabela 1. Estimativas de afinidade (K_I) de ligantes de α_1 -ARs frente aos α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} -ARs.

	K_I (nM)			Razão de K_I		
	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}	α_{1B}/α_{1A}	α_{1D}/α_{1A}	α_{1B}/α_{1D}
<i>Prazosin</i>	0.20	0.25	0.32	1.25	1.6	0.78
<i>WB 4101</i>	0.16	2.5	0.25	15.6	1.56	10
<i>5-metilurapidil</i>	0.63	40	10	63.5	15.9	4
<i>(+)-Niguldipina</i>	0.15	55	100	367	667	0.55
<i>RS 17053</i>	0.6	16	16	26.7	26.7	1
<i>RS 100329</i>	0.25	31.6	12.6	126.4	50.4	0.04
<i>Espiperona</i>	7.9	0.5	13	0.06	1.65	0.04
<i>L-765,314</i>	420	2	34	0.005	0.08	0.06
<i>BMV 7378</i>	250	630	6.3	2.52	0.03	100
Valores de K_I apresentados na Tabela 1 de (Bremner <i>et al.</i> , 2000). As áreas sombreadas em cinza destacam os ligantes utilizados nesta tese.						

A resumida Tabela 1 ilustra a desigualdade observada na disponibilidade de ligantes seletivos para a caracterização farmacológica de α_1 -ARs. Os α_{1A} -ARs possuem

o maior número de antagonistas seletivos e com maior seletividade em relação aos α_{1B} e α_{1D} -ARs. O L-765,314 é um dos poucos antagonistas com maior seletividade para os α_{1B} (Patane *et al.*, 1998) e o BMY 7378 é o ligante com maior seletividade para os α_{1D} -ARs (Goetz *et al.*, 1995).

As imidazolinas A61603, Cirazolina e Oximetazolina comportam-se como agonistas seletivos nos α_{1A} -ARs (Horie *et al.*, 1995; Knepper *et al.*, 1995; Minneman *et al.*, 1994), enquanto que a bupirone é um agonista de baixa eficácia seletivo para os α_{1D} -ARs (Eltze *et al.*, 1999).

Experimentos empregando antagonistas seletivos demonstraram a existência de um quarto subtipo de receptor α_1 -ARs mediando a contração de vasos sanguíneos e amplamente expresso na musculatura lisa dos tecidos do trato urinário inferior (revisado em (Nishimune *et al.*, 2012)). Este quarto subtipo de α_1 -AR farmacologicamente definido foi denominado α_{1L} -AR devido à sua baixa afinidade pelo prazosin, e o uso de camundongos nocaute para o α_{1A} demonstrou que os α_{1L} são uma farmacologia diferenciada dos α_{1A} -ARs (Gray *et al.*, 2008; Muramatsu *et al.*, 2008).

A freqüente co-expressão dos três α_1 -ARs na maioria dos tecidos confere complexidade adicional na caracterização da participação individual dos subtipos de α_1 -ARs em respostas biológicas visto que a heterodimerização entre os subtipos de α_1 -ARs já foi demonstrada em sistemas heterólogos de expressão.

Embora resultados experimentais demonstrem que um único monômero de GPCRs seja capaz de ativar proteínas G heterotriméricas (Bayburt *et al.*, 2007; Kuszak *et al.*, 2009; Whorton *et al.*, 2007; Whorton *et al.*, 2008) ou recrutar arrestinas (Bayburt *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2014; Tsukamoto *et al.*, 2010) uma série de evidências

provenientes da avaliação da cooperatividade na interação de drogas em experimentos com radioligantes, da co-imunoprecipitação de receptores e na detecção da proximidade entre os receptores co-expressos levaram ao reconhecimento que os GPCRs podem se organizar como dímeros e/ou oligômeros (Rios *et al.*, 2001).

A dimerização de GPCRs foi extensivamente estudada em membros da família *Glutamato* de GPRCs da qual fazem parte os receptores GABA_B, um receptor heterodimérico obrigatório, e os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Pin *et al.*, 2009; Pin *et al.*, 2003). Atualmente, é reconhecido que membros de outras famílias de GPCRs podem existir em formas homodiméricas e heterodiméricas. De fato, a associação em dímeros é frequentemente observada em estruturas de GPCRs determinadas por difração de raios X (Huang *et al.*, 2013; Manglik *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012) (Figura 4).

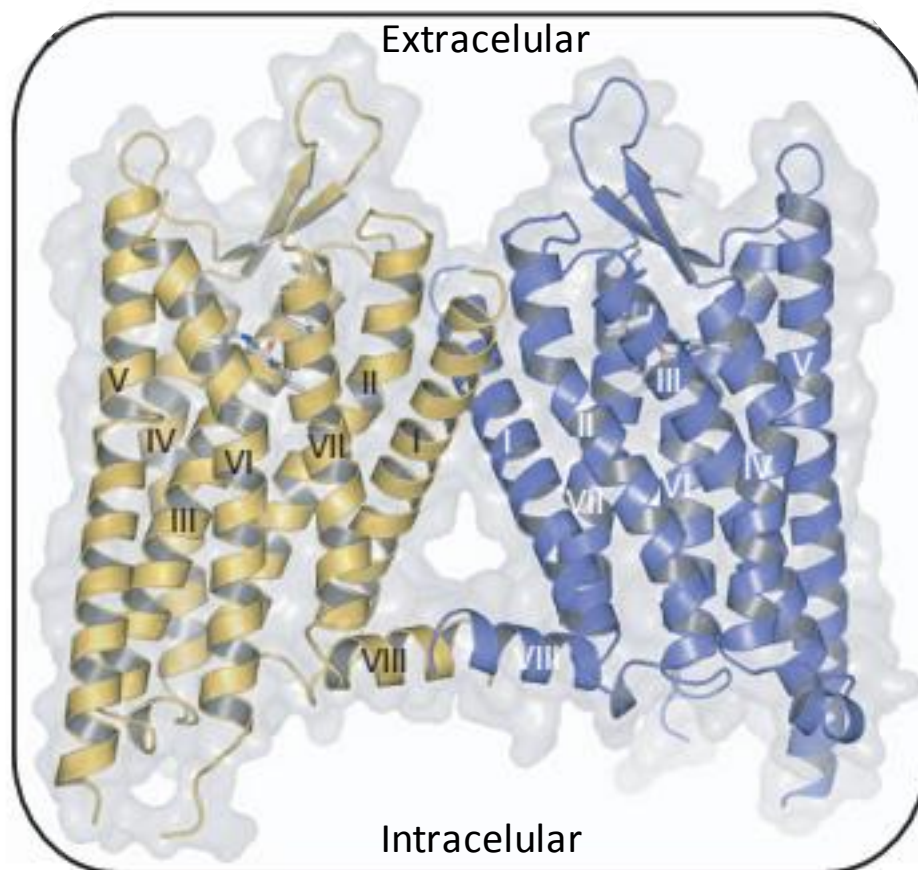


Figura 4. Estrutura do homodímero de receptores κ -opioides determinada por difração de raios X. Algarismos romanos de I a VII denotam os sete domínios hidrofóbicos transmembrana e VIII a α -hélice intracelular. Figura modificada de (Wu *et al.*, 2012).

A dimerização de GPCRs pode modular diferentes aspectos do funcionamento dos GPCRs tais como o acoplamento à proteínas G, o tráfego, a dessensibilização, a internalização e a farmacologia dos seus protômeros. Esta característica expande a diversidade farmacológica dos receptores co-expressos em uma mesma célula e dá origem a um novo nível de regulação da função dos GPCRs (Bouvier, 2001).

Grande parte dos estudos devotados à investigação da dimerização de GPCRs é realizada com receptores recombinantes em sistemas de expressão heterólogos. Porém,

alguns estudos têm apresentado evidências da existência de heterodímeros de receptores nativos (Albizu *et al.*, 2010). De fato, utilizando um agonista seletivo de heterodímeros de receptores μ/δ -opióide Waldhoer e colaboradores (2005) demonstraram a eficácia analgésica da ativação do heterodímero na medula espinhal em ratos, reforçando a importância que os dímeros de GPCRs podem ter na regulação de processos fisiológicos. Sugere-se ainda que alterações nos níveis de dímeros de GPCRs influenciam o desenvolvimento de patologias (AbdAlla *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2013a; Gomes *et al.*, 2013b)

A heterodimerização dos α_1 -ARs recombinantes humanos já foi demonstrada por co-imunoprecipitação dos diferentes subtipos de α_1 -ARs e por técnicas biofísicas que detectam a proximidade entre diferentes receptores. A heterodimerização α_{1B}/α_{1D} altera o tráfego dos receptores visto que na presença do α_{1B} os α_{1D} -ARs intracelulares são transportados para a membrana plasmática (Hague *et al.*, 2004b). Além disso, a heterodimerização α_{1B}/α_{1D} altera a farmacologia dos protômeros já que o BMY 7378, um ligante seletivo α_{1D} de alta afinidade, apresenta baixa afinidade pelo heterodímero e baixa potência ao inibir a produção de fosfoinosítídeos pelo heterodímero α_{1B}/α_{1D} (Hague *et al.*, 2006).

Heterodímeros entre os α_{1A} e α_{1B} recombinantes também foram identificados. Embora a farmacologia subtipo específica de cada protômero do heterodímero α_{1A}/α_{1B} não seja modificada, a internalização dos α_{1B} é alterada pela heterodimerização visto que o α_{1B} -AR do heterodímero α_{1A}/α_{1B} , mas não o α_{1B} -AR isolado, sofre intensa internalização após a exposição à oximetazolina (Stanasila *et al.*, 2003). Heterodímeros

entre os α_{1A} e α_{1D} -ARs recombinantes ainda não foram identificados (Hague *et al.*, 2004b; Uberti *et al.*, 2003).

1.3 Expressão dos α_1 -ARs no epidídimo

A CE expressa mRNA dos três subtipos de α_1 -ARs e experimentos de *binding* do radioligante [3 H]Prazosin demonstram a presença predominante de α_{1A} -ARs (Queiroz *et al.*, 2002). Resultados não publicados de nosso laboratório investigando o *binding* do radioligante [3 H]Prazosin a segmentos da CE de rato mostraram que a CE expressa α_{1A} -AR e α_{1D} -ARs em densidades semelhantes e experimentos de contração demonstraram que o principal subtipo de α_1 -AR responsável pela contração da CE de rato à noradrenalina é o α_{1A} . A participação dos α_{1D} -ARs na contração da CE não foi detectada.

A expressão dos α_1 -ARs em órgãos do sistema reprodutor masculino como o ducto deferente, próstata, vesículas seminais é modulada por andrógenos (Homma *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2004; Pupo, 1998). Além disso, a expressão e a função de α_{1B} -ARs no hipotálamo de rato é aumentada pelo estradiol (Karkanias *et al.*, 1996; Petitti *et al.*, 1992).

A expressão dos α_1 -ARs na CE de rato é alterada durante o amadurecimento sexual (Queiroz *et al.*, 2002), porém, a modulação androgênica e estrogênica da contração da CE induzida pelos α_1 -ARs ainda é desconhecida.

2. Objetivo

Investigar a participação de α_{1A} e α_{1D} -ARs na contração da CE e sua modulação androgênica e estrogênica.

2.1 *Objetivos específicos*

- Investigar a expressão dos subtipos de α_1 -ARs na CE de rato.
- Investigar os subtipos de α_1 -ARs envolvidos na contração in vitro da CE de rato à agonistas exógenos.
- Investigar a heterodimerização entre os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs recombinantes humanos expressos em células HEK 293 e 22Rv1.
- Avaliar o efeito da castração e reposição com 5 α -diidrotestosterona ou 17 β -estradiol sobre os subtipos de α_1 -ARs envolvidos na contração da CE de rato.

3. Material e métodos

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (protocolo nº 297/2011).

Ratos Wistar jovens (50-63 dias de idade) e adultos (120 dias de idade) provenientes do Biotério Central do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia e utilizados nos diferentes modelos experimentais. Os ratos foram mantidos sob condições controladas (temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade 30%, ciclo claro/escuro 12/12h) com livre acesso à ração comercial e água.

3.2 Estudos de contração do ducto epididimário da cauda do epidídimo (CE) in vitro

3.2.1 Isolamento de segmentos do ducto epididimário

Os ratos foram mortos por decapitação em guilhotina e ambos os epidídimos foram isolados. O ducto epididimário foi desenovelado e segmentos de aproximadamente 1.5 cm da porção distal do ducto epididimário da CE (Figura 5) foram isolados e montados em câmaras musculares sob 1 grama de tensão basal para o registro digital de desenvolvimento de tensão isométrica. Os tecidos foram mantidos em solução nutritiva Tyrode modificada com a seguinte composição (mM): NaCl 138, KCl 5.7, CaCl_2 1.8, Na_2HPO_4 0.36, NaHCO_3 15, glicose 5.5, pH 7.4, mantida a 30°C e constantemente borbulhada com mistura carbogênica (95% O_2 /5% CO_2).

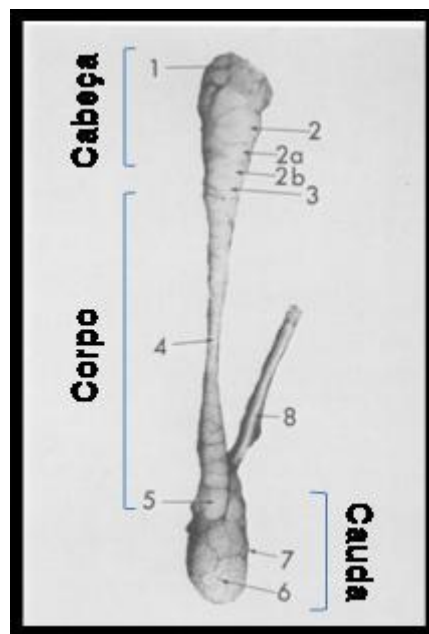


Figura 5. Fotografia de um epidídimo de rato. A divisão distal da CE de rato utilizada nos experimentos descritos nesta tese corresponde à região indicada por 7 (Modificada de (Hinton *et al.*, 1979)).

3.2.2 Avaliação da ordem de potência de agonistas de α_1 -ARs na contração da CE

Após a montagem nas cubas, os segmentos da CE foram mantidos por um período de estabilização de 30 minutos. Decorridos os 30 minutos de estabilização, a contração ao KCl 80mM foi avaliada em duas ocasiões sucessivas separadas entre si por 30 minutos para observação da viabilidade tecidual e estabilização da contração máxima. Trinta minutos após a segunda contração ao KCl uma curva concentração-resposta à noradrenalina (agonista não seletivo de α_1 -ARs), A61603 ou oximetazolina (agonistas seletivos de α_{1A} -ARs) ou bupiriona (agonista seletivo de α_{1D} -ARs) foi obtida pela adição cumulativa do agonista à câmara muscular. Todas as curvas concentração-resposta foram obtidas na presença de desipramina 0.1 μ M, corticosterona 10 μ M,

propranolol 0.1 μ M e ioimbina 0.1 μ M para o bloqueio dos sistemas de captura neuronal e extraneuronal de monoaminas e antagonismo de β - e α_2 -ARs, respectivamente. A tensão máxima desenvolvida (E_{max} , em gramas) e a sensibilidade tecidual aos agonistas (pD_2 , ou $-\log EC_{50}$) foram determinados por análise de regressão não-linear pelo software Prisma 5.0[®] (GraphPad, San Diego, USA).

3.2.3 Avaliação da potência ou afinidade de antagonistas seletivos nas contrações da CE induzidas pelos diferentes agonistas

Trinta minutos após a segunda contração ao KCl 80mM uma curva concentração-resposta ao agonista selecionado foi obtida na ausência de antagonistas e foi considerada como curva controle. Após repetidas trocas de solução para lavagem do tecido, o prazosin (seletivo α_1 , 1-30nM), WB 4101 (seletivo $\alpha_{1A/D}$, 1-30nM), 5-metilurapidil (seletivo α_{1A} , 3-100nM), RS 100329 (seletivo α_{1A} , 1-100nM), RS 17053 (seletivo α_{1A} , 1-100nM), L-765,314 (seletivo α_{1B} , 0.01, 0.1 e 1.0 μ M) ou BMY 7378 (seletivo α_{1D} , 0.01-3 μ M) foi incubado por 45 minutos (2h para o RS 17053) e novas curvas concentração-resposta ao agonista selecionado foram obtidas na presença de cada concentração do antagonista. Os deslocamentos paralelos à direita causados pelas diferentes concentrações dos antagonistas foram quantificados como CR (*concentration ratio*, a razão entre concentrações equiefetivas do agonista na presença e ausência do antagonista) e alocados graficamente como $\log (CR-1)$ versus a concentração do antagonista em um gráfico de Schild (Arunlakshana *et al.*, 1959). Os resultados alocados no gráfico de Schild foram analisados por regressão linear e a potência do antagonista, o pA_2 , foi calculada como intercepto no eixo das abscissas. Caso a

inclinação da regressão no gráfico de Schild não tenha diferido estatisticamente de 1.0, o pA_2 foi aceito como estimativa da constante de dissociação em equilíbrio (pK_B) do antagonista pelo receptor. Nos casos onde a inclinação da regressão linear no gráfico de Schild tenha diferido estatisticamente de 1 ou o antagonismo tenha sido do tipo intransponível, o pA_2 foi calculado a partir do efeito da menor concentração efetiva do antagonista com a seguinte fórmula: $pA_2 = \log(CR-1) - \log B$, na qual B representa a concentração do antagonista e CR a *concentration ratio* como descrito anteriormente.

3.2.4 Investigação da participação de α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs na contração da CE por experimentos de proteção contra os antagonistas irreversíveis fenoxibenzamina e cloroetilclonidina

A participação dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs na contração da CE do rato foi investigada através de experimentos de proteção contra a inativação dos α_1 -ARs induzida pelos antagonistas irreversíveis fenoxibenzamina (PBZ) e cloroetilclonidina (CEC). Nestes experimentos, após a construção de curvas concentração-resposta controle para a noradrenalina ou A61603, o veículo (10 μ l de água destilada), prazosin 1nM, RS 100329 1nM ou RS 17053 1nM ou o BMY 7378 10nM foram incubados com os tecidos por 45 minutos (prazosin, RS 100329, RS 17053 e BMY 7378) ou 2h (RS 17053). A solução com antagonistas foi renovada aos 45 minutos (prazosin, RS 100329 e BMY 7378) ou após 1h e 2h de incubação com RS 17053. Cinco minutos após a renovação da solução nutriente com antagonistas os tecidos foram expostos à PBZ (30nM por 10 minutos) ou CEC (10 μ M por 45 minutos) de acordo com os protocolos descritos abaixo.

3.2.4.1 Fenoxibenzamina (PBZ)

O protocolo utilizado é esquematizado na Figura 6.

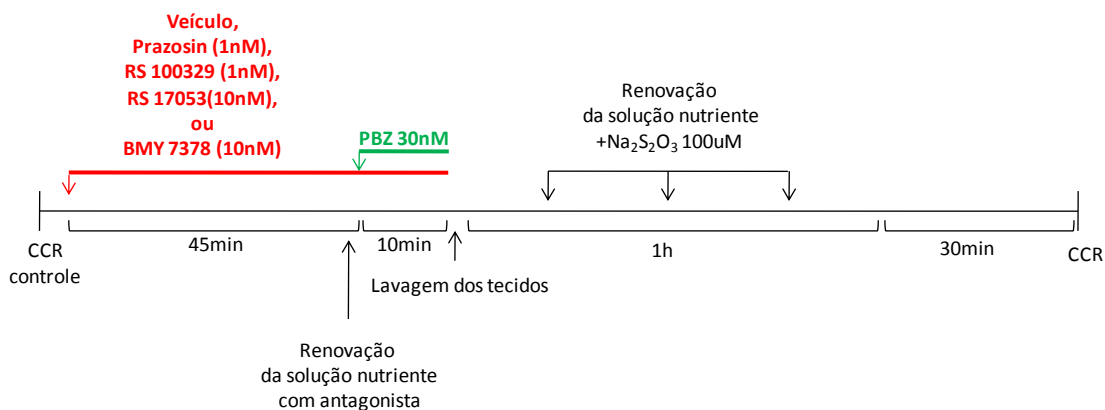


Figura 6. Esquema ilustrativo do protocolo experimental empregado para avaliação do efeito protetor dos antagonistas sobre a inativação dos α_1 -ARs induzida pela fenoxibenzamina (PBZ). CCR: curva concentração-resposta; Na₂S₂O₃: tiosulfato de sódio.

Após o período de incubação do veículo ou antagonistas, os segmentos da CE foram expostos à 30nM PBZ por 10 minutos e então lavados extensivamente (15 vezes com 15ml) para retirada das drogas remanescentes. Experimentos controle demonstraram que este protocolo de lavagens é suficiente para remoção dos antagonistas incubados. Após as lavagens, os segmentos da CE foram incubados em solução nutriente com 100 μ M tiosulfato de sódio por 1h (solução renovada a cada 20 minutos) para reduzir a inativação dos α_1 -ARs pela possível PBZ residual (Kenakin, 1984). Ao final desse período de 1h a solução de incubação foi trocada por solução nutriente sem tiosulfato de sódio e uma nova curva concentração-resposta à noradrenalina foi obtida após 30 minutos.

3.2.4.2 Cloroetilclonidina (CEC)

A Figura 7 descreve o protocolo experimental utilizado.

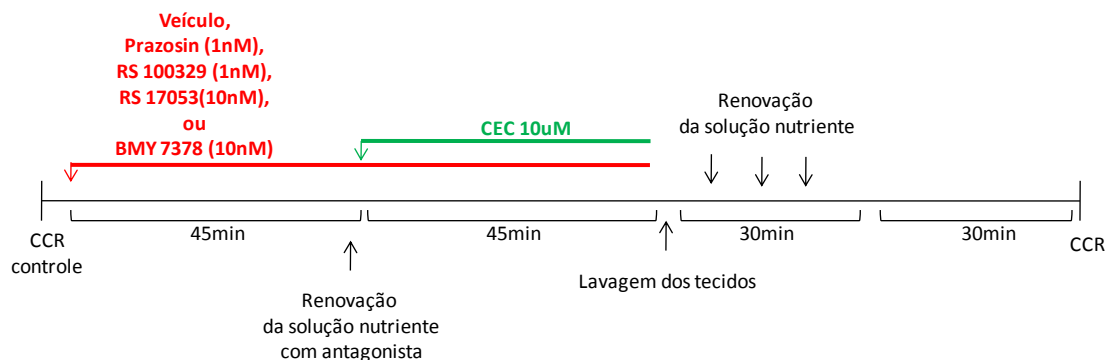


Figura 7. Esquema ilustrativo do protocolo experimental empregado para avaliação do efeito protetor dos antagonistas sobre a inativação dos α_1 -ARs induzida pela cloroetilclonidina (CEC). CCR: curva concentração-resposta.

Decorrido o período de equilíbrio dos antagonistas, os segmentos da CE foram expostos à CEC 10 μ M por 45 minutos. Os tecidos foram lavados (15 vezes com 15ml) imediatamente após os 45 minutos de incubação da CEC. Após as lavagens, os tecidos foram incubados por 30 minutos em solução nutriente regular (sem adição de qualquer composto) com renovação de solução a cada 10 minutos. Uma nova curva concentração-resposta à noradrenalina ou A61603 foi obtida 30 minutos após a terceira troca de solução.

3.2.4.3 Análise do efeito protetor dos antagonistas incubados

A intensidade da inativação dos α_1 -ARs causada pela 30nM PBZ ou 10uM CEC foi estimada pela redução na potência e/ou resposta máxima à noradrenalina ou A61603 após a exposição aos antagonistas irreversíveis.

A participação dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs nas contrações induzidas pela noradrenalina ou A61603 foi avaliada pela redução na intensidade de inativação (efeito protetor) causada pela incubação com o RS 100329/RS 17053 ou BMY 7378 quando comparada a tecidos incubados com veículo e expostos à PBZ ou CEC.

É importante ressaltar que nas concentrações selecionadas o RS 100329 e o RS 17053 ocupam seletivamente os α_{1A} -ARs (RS 100329: ocupação de 75% dos α_{1A} e 3% dos α_{1D} ; RS 17053: ocupação de 75% dos α_{1A} e 9% dos α_{1D}) enquanto o BMY 7378 ocupa seletivamente os α_{1D} -ARs (ocupação de 75% dos α_{1D} e 9% dos α_{1A}), respectivamente. As ocupações foram determinadas com a equação de isoterma de Hill-Langmuir: $\rho_{AR} = A/(A+K_A)$, na qual ρ_{AR} representa a ocupação fracional dos receptores, A representa a concentração do ligante e K_A a constante de dissociação em equilíbrio do complexo ligante/receptor (Neubig *et al.*, 2003). As constantes de dissociação em equilíbrio utilizadas foram:

RS 100329:

- α_{1A} : 0.3nM (pK_B no ducto deferente de rato)
- α_{1D} : 30nM (pK_B na aorta de rato)

RS 17053:

- α_{1A} : 0.3nM (pK_B no ducto deferente de rato)
- α_{1D} : 30nM (pK_B na aorta de rato)

BMY 7378:

- α_{1A} : 0.3 μ M (pK_B no ducto deferente de rato)
- α_{1D} : 3nM (pK_B na aorta de rato)

3.3 Avaliação da expressão dos α_1 -ARs no ducto epididimário da CE de rato

3.3.1 Experimentos de ligação do [3 H]Prazosin a segmentos intactos de ducto epididimário da CE

Os ratos foram mortos por decapitação em guilhotina e ambos os epidídimos foram isolados e imediatamente colocados em solução Krebs modificada gelada com a seguinte composição (mM): NaCl 135.7, KCl 4.9, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.0, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 10.5, dextrose 11.5, pH 7.4. Segmentos de aproximadamente 3-5 mm de comprimento da CE foram isolados, limpos do tecido aderente e dos conteúdos luminiais para ensaios de ligação do [3 H]Prazosin em segmentos intactos de tecido de acordo com o protocolo descrito em (Muramatsu *et al.*, 2005).

3.3.2 Curvas de saturação da ligação do [³H]Prazosin

Segmentos de aproximadamente 3-5mm da CE foram incubados com diferentes concentrações de [³H]Prazosin (20-2000pM) em solução Krebs modificada (composição descrita acima) a 4°C por 14-16h. A ligação não específica foi determinada na presença de fentolamina 100μM. Após o período de incubação os segmentos foram lavados com 1ml de solução Krebs modificada gelada e colocados em 300μl de solução de NaOH 0.3M a 37°C até a dissolução do tecido. Aliquotas de 100μl da solução de tecido solubilizado foram homogeneizadas com 5ml de líquido de cintilação em vials de poliestireno e a radiação retida foi avaliada em um contador de cintilação. Aliquotas de 10ul do tecido solubilizado foram utilizadas para a determinação da quantidade de proteína total pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A ligação específica de cada concentração do [³H]Prazosin foi alocada graficamente versus a respectiva concentração de [³H]Prazosin e os dados submetidos à análise de regressão não linear pelo software Prisma 5.0[©] (GraphPad, San Diego, USA). A densidade de receptores (B_{max}), normalizada pela quantidade de proteína em cada amostra, e a constante de dissociação (K_D) do [³H]Prazosin pelo sítio de ligação foram avaliadas.

3.3.3 Curvas de inibição da ligação do [³H]Prazosin a segmentos intactos da CE

Segmentos de 3-5mm do ducto epididimário foram equilibrados com diferentes concentrações de prazosin (10pM-0.1μM), RS 100329 (10pM-1μM) ou BMY 7378 (30pM-30μM) por 3h a 4°C. Após este período de incubação, foi adicionado [³H]Prazosin (350pM) a cada tubo por 14-16h a 4°C. A ligação não específica foi determinada na presença de fentolamina 100μM. Os procedimentos de lavagem dos

tecidos, dissolução tecidual, contagem da radiação e determinação da quantidade de proteína das amostras foram realizados como descritos anteriormente para os experimentos de saturação da ligação do [^3H]Prazosin.

A ligação específica do [^3H]Prazosin (350pM) aos segmentos incubados na presença das diferentes concentrações dos antagonistas foi avaliada e expressa como porcentagem da ligação específica do [^3H]Prazosin (350pM) na ausência de droga competidora. A estimativa da constante de dissociação em equilíbrio da droga competidora (pK_I) foi determinada de acordo com a equação de Cheng-Prusoff por análise de regressão não-linear pelo software Prisma 5.0[®] (GraphPad, San Diego, USA).

3.4 Avaliação da modulação androgênica e estrogênica dos subtipos de α_1 -ARs mediando contração da CE de rato

A modulação androgênica e estrogênica dos subtipos de α_1 -ARs mediando contração da CE de ratos adultos (120 dias de idade) foi investigada em ratos submetidos à castração por orquidectomia bilateral e tratados com 5 α -diidrotestosterona (DHT) ou benzoato de 17- β estradiol (E2) por 8 ou 30 dias.

Ratos adultos (120 dias de idade) foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Controle: ratos não castrados e tratados com injeção subcutânea de veículo (0.2ml de óleo de milho + 0.1ml de etanol absoluto/dia)
- Castrado+VEH: castrados por orquidectomia bilateral e tratados com injeção subcutânea de veículo (0.3ml/dia)

- Castrado+E2: castrados por orquidectomia bilateral e tratados com injeção subcutânea de benzoato de 17- β estradiol (20 μ g/kg/dia)
- Castrado+DHT: castrados por orquidectomia bilateral e tratados com injeção subcutânea de 5 α -diidrotestosterona (5mg/dia)

A DHT foi selecionada por ser considerada o principal andrógeno regulador das funções do epidídimo (Robaire *et al.*, 2006; Robaire *et al.*, 1995) e por não ser susceptível à ação da aromatase, prevenindo, desta forma, a formação de estradiol. A dose de DHT empregada no procedimento de reposição hormonal mimetiza as concentrações fisiológicas de andrógeno no epidídimo (Fan *et al.*, 1998). O estradiol na dose selecionada é efetivo na manutenção do nível de dopamina basal normal no hipotálamo de ratos machos castrados (Putnam *et al.*, 2003). No epidídimo, a dose de E2 empregada neste estudo é semelhante àquela capaz de prevenir parcialmente a redução dos níveis de angiotensinogênio no epidídimo de ratos castrados (25 μ g/kg; (Leung *et al.*, 2000)).

3.4.1 Orquidectomia bilateral

Os ratos foram anestesiados com mistura de ketamina e xilazina (70 e 15mg/kg, i.p.) e foi realizada laparotomia mediana. Os vasos sangüíneos irrigando ambos os testículos e os ductos eferentes foram amarrados com linha de algodão, seccionados e ambos os testículos foram removidos. Após a remoção dos testículos a incisão foi suturada e os ratos receberam a primeira injeção subcutânea de veículo, DHT ou E2 nas doses especificadas anteriormente.

Ratos dos diferentes grupos de tratamento foram mortos 8 ou 30 dias após o início de cada tratamento.

3.4.2 Investigação da modulação androgênica dos α_1 -ARs mediando contração da CE de ratos jovens

Ratos jovens (50-60 dias de idade) foram distribuídos em dois grupos:

- Controle: tratados com veículo (0.1ml de etanol absoluto+ 0.2ml de óleo de milho, s.c.)
- DHT: tratados com 5 α -diidrotestosterona (5mg/dia, s.c.)

Os ratos dos diferentes grupos de tratamento foram mortos no sétimo dia de tratamento e ambos os epidídimos foram isolados para a realização dos experimentos de contração como descrito anteriormente. O peso úmido da vesícula seminal, glândula de coagulação, lobo ventral da próstata e testículo foi registrado para avaliação do efeito androgênico da administração de DHT.

3.5 Investigação da dimerização entre os α_{1A} -ARs, α_{1B} -ARs e α_{1D} -ARs recombinantes humanos

Linhagens e cultura celular

Células de rim embrionário humano (HEK 293) e células humanas de tumor prostático (22Rv1) foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; HEK 293) ou RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium; 22Rv1) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em frascos de 175cm² (Greiner Bio-one) mantidos em incubadora de CO₂ a 37°C com atmosfera umidificada e 5% CO₂.

Construtos dos receptores

Os seguintes plasmídeos foram utilizados:

- pcDNA3 α_{1A} -Rluc8: α_{1A} -AR humano fundido em sua região carboxi-terminal à Renilla luciferase 8 (RLuc8) clonado em plasmídeo pcDNA3 (Mustafa *et al.*, 2012)
- pcDNA3: plasmídeo pcDNA3 “vazio” (sem inserto na região de múltiplas clonagens)
- pDT- Δ^{1-79} α_{1D} -HA: α_{1D} -AR humano sem os primeiros 79 aminoácidos da região amino-terminal fundido ao epítipo hexahistidina e FLAG na região amino-terminal (Pupo *et al.*, 2003)

- pEGFP α_{1A} , pEGFP α_{1B} , pEGFP α_{1D} e pEGFP $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} e $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ humanos fundidos em sua região carboxi-terminal à proteína fluorescente verde *enhanced* (eGFP) clonados no plasmídeo pEGFP-N3 (Hague *et al.*, 2004a)

Os plasmídeos utilizados foram gentilmente cedidos pelos seguintes professores: pcDNA3 Rluc8: Prof. Sanjiv Sam Gambhir (Dep. de Radiologia, Universidade de Stanford); plasmídeo pDT- $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA: Prof. Kenneth Paul Minneman (Emory University, Atlanta, GA, EUA); plasmídeos pEGFP α_{1A} , pEGFP α_{1B} , pEGFP α_{1D} e pEGFP $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$: Prof. Christopher Hague (Departamento de Farmacologia, Washington University, Seattle, WA, EUA).

Transfecção

As células HEK 293 ou 22Rv1 foram semeadas em placas de 6 poços (HEK 293: $0.5 \cdot 10^6$ /células poço; 22Rv1: 10^6 células/poço) em 2ml de meio de cultura completo com 5% SFB (HEK 293: DMEM; 22Rv1: RPMI) e mantidas overnight para adesão em incubadora de CO₂ (a 37°C, 5% CO₂). Aproximadamente 16h após a semeadura, o meio de cultura foi removido, as células lavadas duas vezes com Opti-MEM (Invitrogen) a 37°C e incubadas com 2ml de Opti-MEM a 37°C em incubadora de CO₂. Os diferentes construtos de DNA foram transfectados com o agente catiônico lipídico Lipofectamina 2000 (Invitrogen) na proporção DNA/lipofectamina de 1µg:3µl. A quantidade apropriada de DNA e lipofectamina 2000 foi adicionada a 750µl de Opti-MEM em tubos separados e incubados por 5 minutos. Após os cinco minutos os conteúdos de cada tubo contendo DNA ou Lipofectamina 2000 foram misturados e incubados por 20

minutos para formação do complexo DNA/Lipofectamina 2000. Decorridos o período de 20 minutos toda a mistura foi adicionada ao poço contendo as células. As células foram expostas ao complexo DNA/lipofectamina por 4h e então o meio de cultura foi removido e renovado por 2ml de meio de cultura apropriado (HEK 293: DMEM; 22Rv1: RPMI) com 5% FBS. Vinte e quatro horas após as transfecções o meio de cultura foi removido e as células foram coletadas por tripsinização, contadas em hemocitômetro e semeadas em placas apropriadas para cada tipo de experimento (especificado em cada experimento abaixo).

3.5.1 Ensaios de transferência de bioluminescência por ressonância (BRET) para detecção da dimerização de receptores

A dimerização entre os α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} -ARs foi investigada por BRET. Os ensaios de BRET são métodos biofísicos que avaliam a proximidade entre duas proteínas de interesse através da detecção da transferência não radioativa de luminescência entre uma molécula doadora e uma molécula aceptora de energia com conseqüente emissão de fluorescência pela molécula aceptora (Pfleger *et al.*, 2006). O BRET é esquematizado na Figura 8.

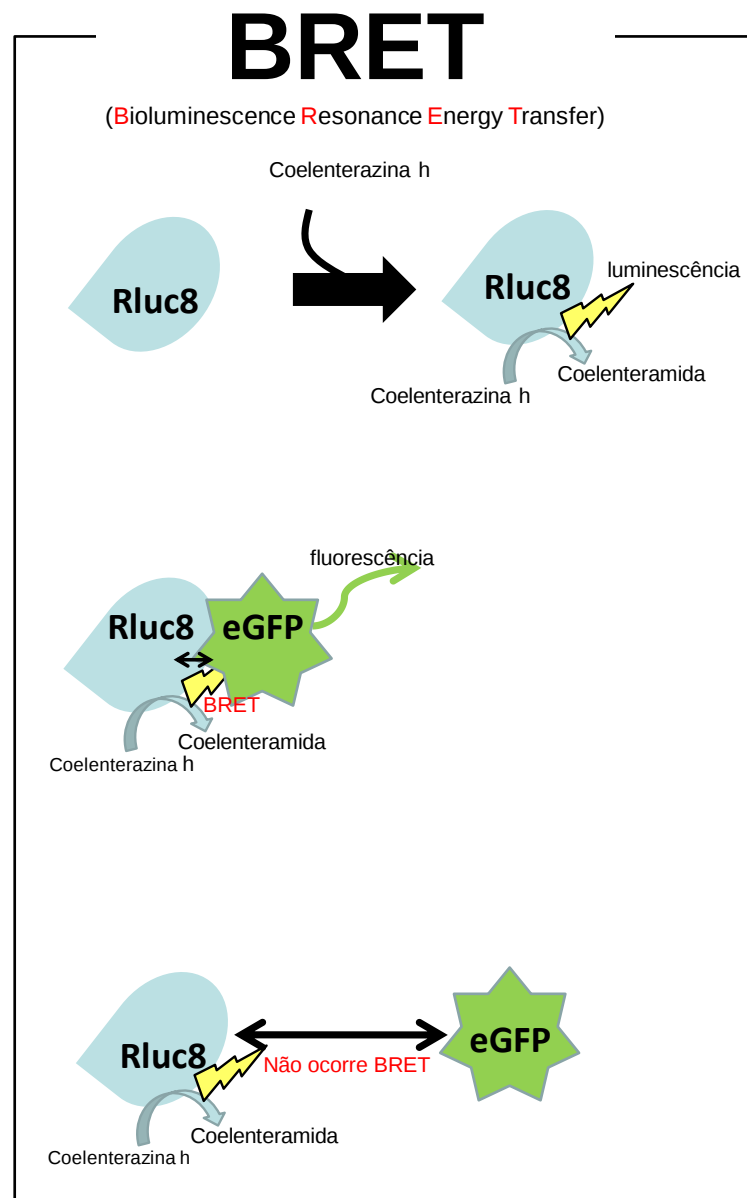


Figura 8. Esquema ilustrativo do processo da transferência de bioluminescência por ressonância (BRET) utilizando o par Rluc8/eGFP como doador/aceptor. Rluc8: Renilla luciferase 8; eGFP: proteína fluorescente verde *enhanced*; setas bidirecionais ilustram a distância entre as moléculas doadoras (Rluc8) e aceptoras (eGFP) de energia.

O primeiro evento do BRET envolve a emissão de bioluminescência após a oxidação do substrato por uma luciferase (a molécula doadora). Quando as moléculas de acceptor, comumente um dos derivados da proteína fluorescente verde (GFP), estão a menos de 10 nanômetros de distância da molécula doadora, parte da bioluminescência

emitida é absorvida pela molécula aceptora e emitida como fluorescência característica do acceptor, caracterizando assim o BRET. A transferência de energia é específica e ocorre somente entre moléculas com propriedades espectrais compatíveis, i.e. a faixa de comprimentos de onda de excitação da molécula aceptora deve ser compatível com a faixa de comprimentos de onda da luminescência emitida pela molécula doadora.

Quando o doador e acceptor estão longe da distância efetiva para a ocorrência de BRET (>10nm) não há transferência de energia e a fluorescência do acceptor não é detectada. Devido à dependência da transferência de energia na distância entre doador e acceptor, a ocorrência de BRET é aceita como evidência indireta da interação entre as proteínas fundidas ao doador e acceptor. Cabe ressaltar como exemplo que a distância entre os monômeros de dímeros da rodopsina visualizados por microscopia de força atômica é de 3.5nm (Fotiadis *et al.*, 2006).

3.5.1.1 Avaliação da dimerização entre os α_{1A} -eGFP, α_{1B} -eGFP, α_{1D} -eGFP ou Δ^{1-79} α_1 -eGFP e o α_{1A} -Rluc8 por curvas de saturação BRET

A detecção da dimerização entre os α_1 -ARs foi investigada empregando-se versões recombinantes dos α_{1A} -ARs conjugados em sua região carboxi-terminal ao doador de luminescência Renilla luciferase 8 (α_{1A} -Rluc8) ou ao acceptor fluorescente eGFP (α_{1A} -eGFP, α_{1B} -eGFP, α_{1D} -eGFP ou $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP).

Células HEK 293 foram semeadas em placa de 6 poços na densidade de 500.000 células/poço. Vinte e quatro horas após o semeamento, as células foram co-transfectadas com 250 ng de plasmídeo codificador do α_{1A} -Rluc8 e quantidades crescentes (75 – 2500 ng) dos plasmídeos codificadores dos aceptores fluorescentes

α_{1A} -eGFP, α_{1B} -eGFP, α_{1D} -eGFP ou $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP. Poços adicionais de células foram transfectadas somente com o doador de energia (250 ng de α_{1A} -Rluc8). Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram destacadas com 1 ml de DMEM sem vermelho de fenol e alíquotas em triplicata de 20 μ l de cada suspensão de células foram semeadas em placas brancas de 96 poços (Cultur Plate, Perkin Elmer) e placas pretas de 96 poços (ViewPlate, Perkin Elmer) para leitura de luminescência e fluorescência, respectivamente.

Quarenta e oito horas após a semeadura das células em placas de 96 poços, o meio de cultura das placas brancas foi removido e as células expostas à coelenterazina h (concentração final 6 μ M) em 100 μ l de DMEM sem vermelho de fenol. Imediatamente após a adição de coelenterazina h aos poços as placas foram inseridas no leitor PHERAstar FS (BMG Biotech) e a intensidade de luz emitida nos comprimentos de onda 475/30 e 530/30nm em cada poço foi registrada simultaneamente após 1 minuto da administração da coelenterazina h. A intensidade de luz emitida nos comprimentos de onda 475/30 nm e 530/30 nm das células transfectadas somente com o doador α_{1A} -Rluc8 foi registrada e a razão obtida foi subtraída da razão obtida nas co-transfecções α_{1A} -Rluc8 + acceptor nas diferentes quantidades. As razões corrigidas resultantes (BRET) representam a troca de energia entre doador e acceptor. Paralelamente, a fluorescência total da eGFP das amostras semeadas nas placas pretas (480 nm excitação, 530 nm emissão) foram obtidas. A fluorescência total da eGFP das amostras foi normalizada à luminescência total da Rluc8 das diferentes transfecções (obtida nas leituras das placas brancas) e esta razão foi considerada como estimativa relativa da expressão do acceptor e doador.

Os diferentes valores de BRET foram alocados graficamente contra a razão entre fluorescência total da eGFP e a luminescência total da Rluc8 e submetidos à análise de regressão não linear por hipérboles com um único sítio de ligação pelo software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). A partir das hipérboles foram calculados o valor de BRETmax (intensidade máxima de transferência de energia) e BRET50 (a razão entre aceptor/doador na qual ocorre 50% da transferência máxima de energia).

3.5.2 Investigação do efeito funcional da co-expressão dos α_{1A} -ARs e $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$

3.5.2.1 Aumento de cálcio intracelular livre

Quarenta e oito horas após as transfecções, o meio de cultura foi removido e os poços lavados duas vezes com 100 μ l de solução de Hanks modificada (NaCl 150mM, KCl 2.6mM, $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.18mM, D-glicose 10mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.20mM, HEPES 10mM, Probenecida 2.0mM, BSA 0.5%, pH 7.4). As células foram expostas ao indicador de cálcio Fluo-4 a 0.1% por 30 minutos em 100 μ l de solução de Hanks modificada a 37 °C para incorporação. O indicador não incorporado foi removido com duas lavagens com 100 μ l de solução Hanks modificada. Os poços foram preenchidos com 90 μ l de solução Hanks modificada e as placas foram inseridas em um leitor de microplacas FlexStation3 (Molecular Devices). O aumento de cálcio intracelular livre foi lido como aumento de fluorescência emitida em 520 nm (excitação a 485 nm) após a adição de noradrenalina, A61603, oximetazolina ou cirazolina (10pM-10 μ M cada). A fluorescência foi registrada durante 70 segundos a cada 1.5 segundos, e o agonista foi injetado automaticamente pelos dispensadores do leitor de microplacas após 17

segundos de leitura basal. O aumento de cálcio intracelular induzido pelos agonistas foi normalizado àquele induzido pela Ionomicina 1 μ M. O aumento de cálcio intracelular livre induzido pelo carbacol via ativação de receptores muscarínicos endogenamente expressos pelas células HEK 293 foi investigado em poços em paralelo de cada uma das transfecções.

3.5.2.2 Investigação do efeito funcional da expressão dos α_{1A} -ARs e Δ^{1-79} α_{1D} -ARs recombinantes humanos em células HEK 293

Células HEK 293 em 70-80% de confluência foram transfectadas com 0.5 μ g Rluc8- α_{1A} + 0.5 μ g de plasmídeo não codificante (pcDNA3) ou com 0.5 μ g Rluc8- α_{1A} + 0.5 μ g Δ^{1-79} α_{1D} -HA pelo método descrito anteriormente. Após 24 horas da transfecção, as células foram coletadas por tripsinização e semeadas em placa de 96 poços (30.000 células/poço). O aumento de cálcio intracelular livre induzido pelos diferentes agonistas foi avaliado 48 horas após a transfecção.

3.5.2.3 Investigação do efeito funcional da expressão do α_{1D} -ARs na sinalização de um α_{1A} -AR endogenamente exposto

O efeito funcional da co-expressão do Δ^{1-79} α_{1D} -HA na função de um α_{1A} -AR endogenamente exposto foi estudado em células 22Rv1. Em células 22Rv1, o aumento de cálcio intracelular livre induzido por agonistas de adrenoceptores é induzido por α_{1A} -ARs (ver resultados descritos adiante).

Células 22Rv1 em 70-80% de confluência foram transfectadas com 0.1µg de plasmídeo não codificante (pcDNA3; α_{1A} -22Rv1) ou com 0.1µg $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA (α_{1A} - $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1) pelo método descrito anteriormente. Após 24 horas da transfecção, as células foram coletadas por tripsinização e semeadas em placa de 96 poços (30.000 células/poço).

Quarenta e oito horas após as transfecções, o meio de cultura foi removido, o indicador de cálcio intracelular livre Fluo-4 foi incorporado como descrito acima e o aumento de cálcio induzido pela noradrenalina, A61603, oximetazolina e cirazolina foi investigado.

3.5.3 Avaliação da expressão de α_1 -AR por ensaios de ligação do [3 H]Prazosin

O nível de expressão de α_1 -AR foi determinado por ensaios de ligação do [3 H]Prazosin. Células HEK 293 ou células 22Rv1 foram plaqueadas a 30.000 células/poço em duplicata em placas de 96 poços pré-tratadas com poli-L-lisina. Aliquotas das transfecções foram plaqueadas de maneira idêntica em placas de 96 poços para quantificação do conteúdo de proteína total.

No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram lavadas duas vezes com tampão HEPES e incubadas com [3 H]Prazosin 1nM (78Ci/mmol; Amersham Biosciences) em 100 µl de tampão HEPES por 1 hora a 37 °C em incubadora com atmosfera com 5% CO₂. A ligação não-específica foi determinada na presença de fentolamina 100 µM. Após 1h de incubação com radioligante, as células foram lavadas três vezes com 200 µl de tampão HEPES gelado e lisadas com 100 µl de NaOH 0.2M a 50 °C por 30 minutos. O conteúdo dos poços foi adicionado à 4 ml de líquido de

cintilação (PerkinElmer) e a radiação lida em contador Beta (Tri-Carb 2910TR, PerkinElmer; eficiência de leitura de ^3H de 57.23%). A densidade de receptores foi normalizada ao conteúdo de proteína das alíquotas semeadas em placas em paralelo determinada pelo kit BCA (Thermo Scientific).

Nos experimentos de co-transfecção α_{1A}/α_{1D} a densidade dos α_{1D} -ARs foi estimada pela ligação específica do [^3H]Prazosin 1nM inibida pelo BMY 7378 30nM. A densidade dos α_{1A} -ARs foi considerada como a diferença entre a ligação específica do [^3H]Prazosin 1nM e a densidade de α_{1D} -ARs (determinada como descrito acima).

3.6 Drogas, reagentes e soluções

Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) Merck; Prazosin (Prazosin hydrochloride), propranolol (($\pm$)-propranolol hydrochloride), Ioimbina (Yohimbine hydrochloride), desipramina (desipramine hydrochloride), BMY 7378 (BMY 7378 dihydrochloride), 5-metilurapidil (5-methylurapidil), WB 4101 (WB 4101 hydrochloride), oximetazolina (oxymetazoline hydrochloride), fentolamina (phentolamine mesylate), cloroetilclonidina (chloroethylclonidine dihydrochloride) e fenoxibenzamina (phenoxybenzamine hydrochloride), Research Biochemicals International (Natick, MA, USA); noradrenalina ((L)-(-)-Norepinephrine bitartrate salt monohydrate), corticosterona (corticosterone), L-765,314 (L-765,314 hydrochloride), dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); A61603 (A61603 hydrobromide), RS 100329 (RS 100329 hydrochloride), RS 17053 (RS 17053 hydrochloride) Tocris bioscience (Ellisville, MO, USA). Todos os reagentes para cultura celular e transfecção foram obtidos da Invitrogen (Invitrogen, USA).

Soluções estoque de RS 17053 (10^{-3}M), RS 100329 (10^{-3}M) foram preparadas em DMSO puro; Corticosterona (10^{-2}M) em etanol absoluto; Fenoxibenzamina (10^{-2}M) em etanol absoluto com HCl 0.01N; Todas as demais drogas foram diluídas em água destilada.

Soluções de cloroetilclonidina e fenoxibenzamina foram preparadas imediatamente antes da utilização e o remanescente não utilizado das soluções foi descartado. Soluções estoque dos agonistas ou antagonistas foram armazenadas em geladeira a -20°C .

3.7 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (epm). Comparações estatísticas foram estabelecidas através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnet ou Tukey. Valores de $p < 0.05$ foram aceitos como significantes.

4. Resultados

4.1 Expressão dos α_1 -ARs na CE

A expressão dos α_1 -ARs na CE de rato foi investigada através de experimentos de binding do [3 H]Prazosin a segmentos intactos da CE de rato. A ligação específica do [3 H]Prazosin a segmentos intactos da CE de rato foi saturável com constante de dissociação em equilíbrio ($K_D \approx 400$ pM) consistente com a interação com α_1 -ARs (Figura 9A).

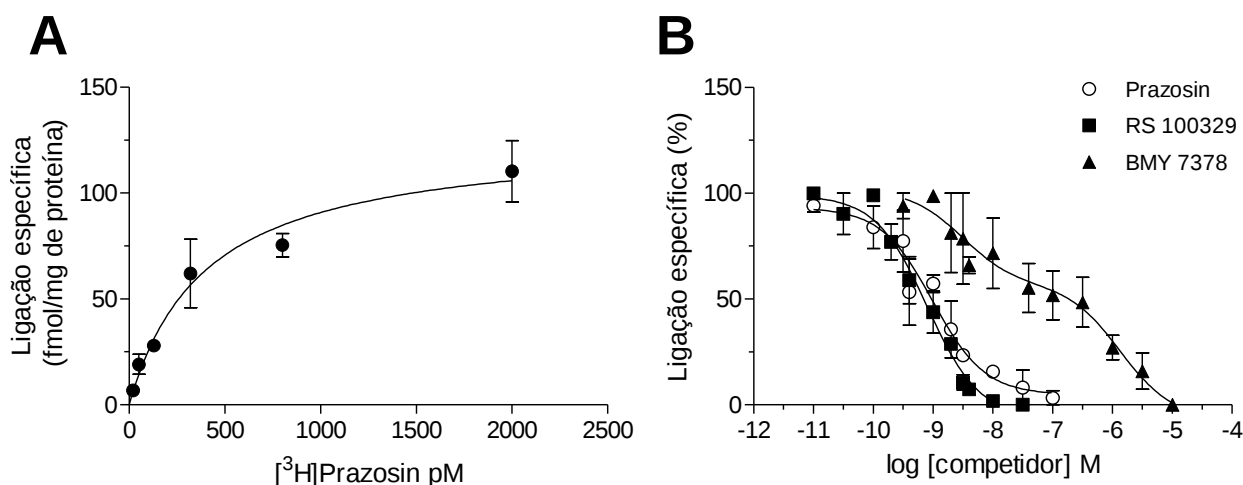


Figura 9. Binding do [3 H]Prazosin a segmentos intactos da CE de rato. A) Isoterma de saturação da ligação específica do [3 H]Prazosin. B) Curvas de inibição da ligação específica do [3 H]Prazosin 350pM a segmentos intactos da CE de rato pelos ligantes prazosin (seletivo α_1), RS 100329 (seletivo α_{1A}) e BMY 7378 (seletivo α_{1D}). Dados representam média $\pm$ epm obtidas com segmentos da CE de 4-6 ratos diferentes.

A ligação específica do [3 H]Prazosin foi completamente inibida pelo prazosin, RS 100329 e BMY 7378. As curvas de inibição da ligação específica do [3 H]Prazosin

pelo prazosin e RS 100329 foram melhor descritas pela competição com um único sítio de ligação ($p < 0.05$, teste F), enquanto que a inibição da ligação específica pelo BMY 7378 foi melhor descrita por uma curva bifásica ($p < 0.05$, teste F) (Figura 9B). As constantes de dissociação em equilíbrio do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 derivadas a partir das curvas de inibição da ligação específica do [^3H]Prazosin a segmentos intactos da CE de rato são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Constantes de dissociação em equilíbrio (pK_I) do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 derivadas das curvas de inibição da ligação específica do [^3H]Prazosin a segmentos intactos da CE de rato. Para comparação são apresentados os valores de afinidade (pK_I) derivados em experimentos de inibição da ligação específica do [^3H]Prazosin aos α_1 -ARs recombinantes humanos.

	<i>Segmentos da CE</i>		[#] pK_I		
	$pK_{I\text{ High}}$	$pK_{I\text{ Low}}$	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
Prazosin	9.30±0.15	-----	9.41	9.66	9.63
RS 100329	9.46±0.10	-----	9.60	7.50	7.90
BMY 7378	8.33±0.55	6.19±0.42	7.04	6.92	8.59
Dados representam media±epm de 4-6 diferentes ratos. [#] Valores médios da literatura (Nojimoto <i>et al.</i> , 2010; Williams <i>et al.</i> , 1999a).					

A constante de dissociação em equilíbrio do RS 100329 (≈ 9.50) indica a expressão de α_{1A} -ARs na CE de rato. O BMY 7378 identificou dois diferentes sítios em densidades semelhantes, o sítio de alta afinidade ($pK_{I\text{ high}} \approx 8.50$) é consistente com a interação com α_{1D} -ARs, enquanto o sítio de baixa afinidade ($pK_{I\text{ low}} \approx 6.00$) é consistente com a interação com α_{1A} - ou α_{1B} -ARs; porém, a alta afinidade estimada para o RS 100329 sugere que o sítio de baixa afinidade ao BMY 7378 representa α_{1A} -ARs.

4.2 Avaliação do subtipo de α_1 -ARs funcional na contração à noradrenalina exógena

A noradrenalina (agonista não seletivo), o A61603 e a oximetazolina (agonistas seletivos α_{1A}) e a bupiriona (agonista seletivo α_{1D}) contraíram de maneira concentração-dependente segmentos da CE de ratos (Figura 10A). Em comparação à noradrenalina, o A61603 comportou-se como agonista total enquanto a oximetazolina atuou como agonista parcial com atividade intrínseca de $61.06 \pm 3.02\%$. A bupiriona contraiu a CE apenas em altas concentrações. A ordem de potência dos agonistas na indução de contração na CE foi A61603>noradrenalina=oximetazolina>>bupiriona (ANOVA+Tukey).

Recentemente foi demonstrado que a oximetazolina dessensibiliza α_{1A} -ARs nativos do ducto deferente e artéria caudal de rato (Akinaga *et al.*, 2013). A dessensibilização dos α_{1A} -ARs do ducto deferente e artéria caudal foi detectada por intensa taquifilaxia das contrações em curvas concentração-resposta consecutivas à oximetazolina. Não houve taquifilaxia das contrações induzidas pela oximetazolina na CE já que curvas concentração-resposta consecutivas apresentaram potência e resposta máxima similares (Figura 10B).

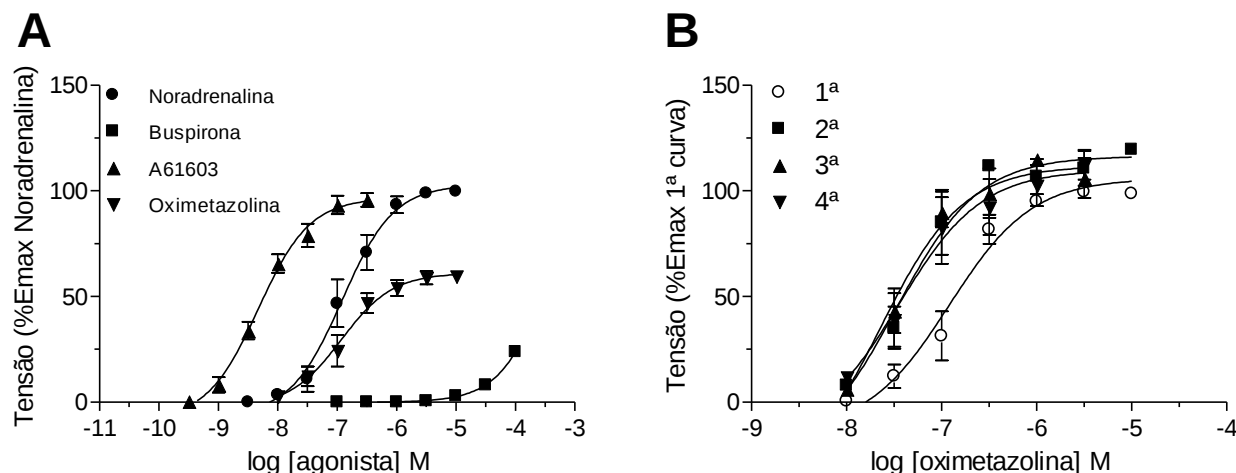


Figura 10. A) Curvas concentração-resposta para diferentes agonistas na CE de rato. B) Curvas concentração-resposta cumulativas consecutivas para oximetazolina na CE de rato. Dados representam média±epm de 4 diferentes segmentos.

O subtipo de α_1 -ARs responsável pelas contrações à noradrenalina exógena foi adicionalmente investigado com o emprego de antagonistas seletivos. A contração à noradrenalina foi antagonizada competitivamente pelo prazosin, WB 4101, 5-metilurapidil, RS 100329, RS 17053 e BMY 7378 (Figura 11A a G). Os antagonistas seletivos α_{1A} WB 4101, 5-metilurapidil, RS 100329 e RS 17053 antagonizaram as contrações induzidas pela noradrenalina com alta potência enquanto o BMY 7378 (α_{1D} -seletivo) e o L-765,314 (α_{1B} -seletivo) antagonizaram a contração induzida pela noradrenalina com baixa potência. Na Figura 11H é apresentado o gráfico de Schild e na Tabela 3 as estimativas de potência (pA_2) ou afinidade (pK_B) dos antagonistas contra as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de rato. As estimativas de afinidade ou potência dos antagonistas seletivos determinados nas contrações induzidas pela

noradrenalina na CE se correlacionam positivamente com as estimativas de afinidade determinadas em α_{1A} -ARs recombinantes, mas não α_{1B} - ou α_{1D} -ARs (Figura 12).

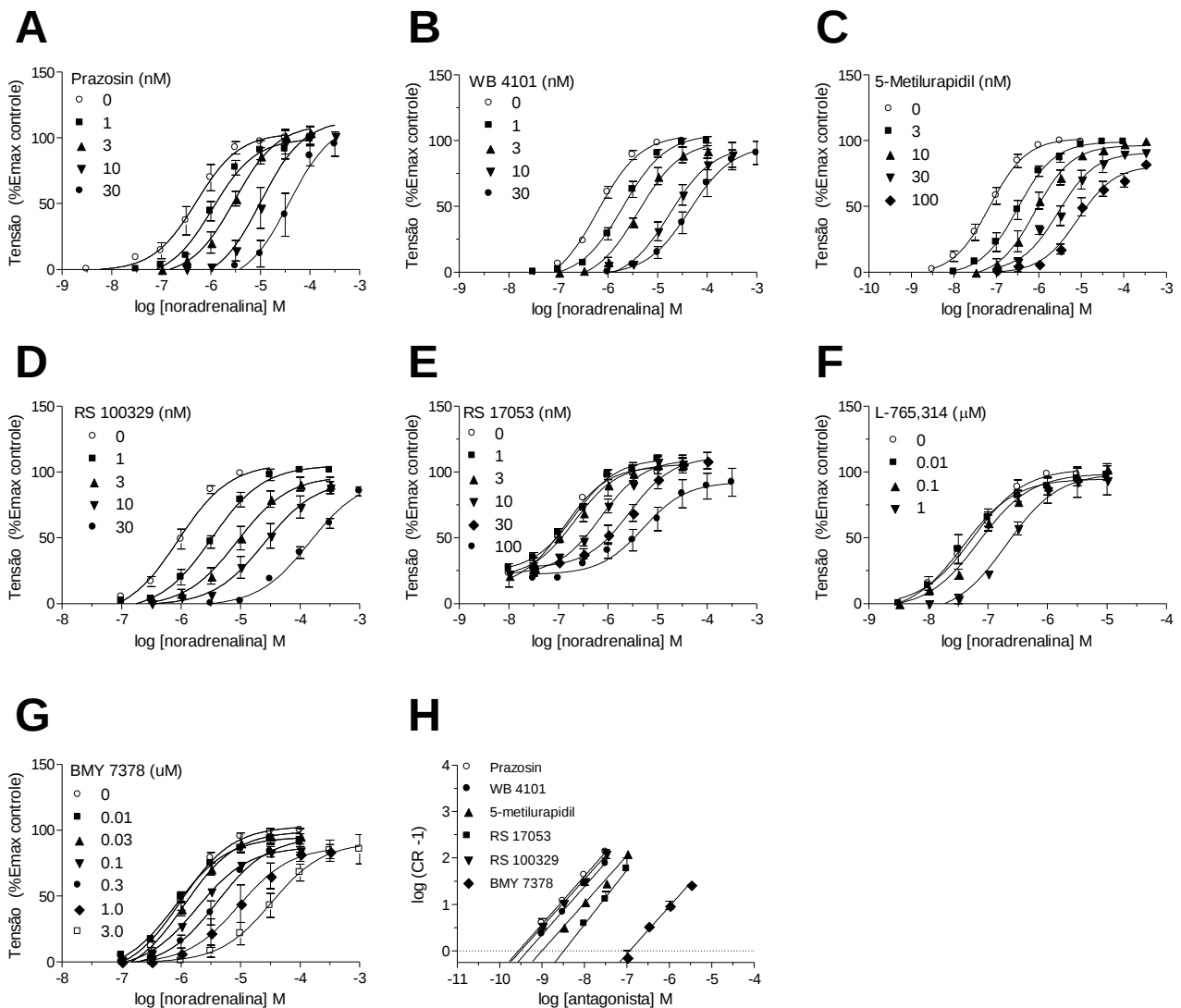


Figura 11. Caracterização do subtipo de α_1 -AR funcional envolvido na contração da CE à noradrenalina exógena. (A a G) Efeito de antagonistas seletivos nas contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de rato. (H) Gráfico de Schild para o antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina na CE de rato. Dados representam média $\pm$ epm de 3 a 5 segmentos provenientes de diferentes ratos.

Tabela 3. Estimativas de potência (pA_2) ou afinidade (pK_B) dos antagonistas seletivos contra as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de rato. As estimativas de afinidade e inclinação foram derivadas pela construção do gráfico de Schild.

	pK_B/pA_2	Inclinação
Prazosin	9.61±0.03	1.04 (0.90-1.17)
WB 4101	9.38±0.04	1.04 (0.88-1.19)
5-metilurapidil	9.03±0.03	1.02 (0.92-1.13)
RS 100329	9.54±0.04	1.02 (0.88-1.17)
RS 17053	8.63±0.07	1.17 (0.77-1.57)
BMY 7378	6.95±0.04	1.02 (0.86-1.19)
L-765,314	6.63±0.11*	---
* pA_2 calculado com o efeito do L-765,314 1µM. Dados representam a média ± epm (pK_B e pA_2) ou média e intervalo com 95% de confiança de 3-5 diferentes animais/grupo.		

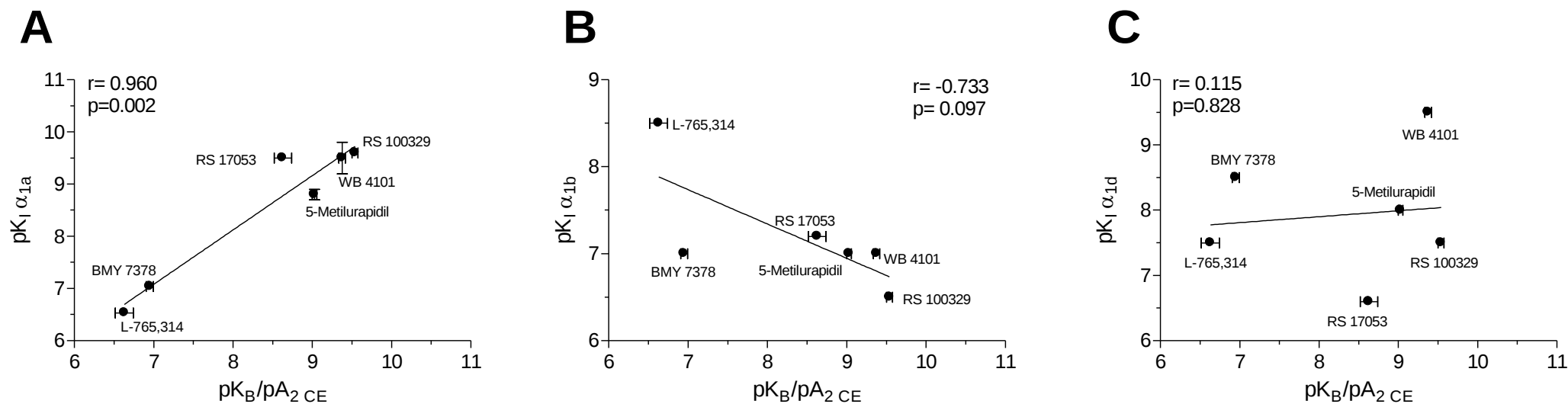


Figura 12. Gráficos de correlação entre as afinidades dos antagonistas seletivos determinadas em experimentos de inibição da ligação específica do [3 H]Prazosin nos receptores α_{1a} (A), α_{1b} (B) e α_{1d} (C) recombinantes humanos (dados de (Nojimoto *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 1999b)) e as afinidades/potências determinadas contra as contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de rato. As estimativas de potência ou afinidades dos antagonistas determinadas em experimentos de contração *in vitro* foram apresentadas na Tabela 3.

A potência dos antagonistas na inibição das contrações à noradrenalina (pK_B prazosin: 9.61 ± 0.03 ; $pK_{B \text{ RS } 100329}$: 9.54 ± 0.04 ; $pA_2 \text{ L-765,314}$: 6.63 ± 0.11 ; $n=3-5$) é idêntica àquela obtida contra as contrações induzidas pelos agonistas seletivos de α_{1A} -ARs A61603 (pK_B prazosin: 9.68 ± 0.09 ; $pK_{B \text{ RS } 100329}$: 9.67 ± 0.05 ; $pA_2 \text{ L-765,314}$: 6.33 ± 0.12 ; $n=3$) e oximetazolina (pK_B prazosin: 9.30 ± 0.06 ; $pK_{B \text{ RS } 100329}$: 9.56 ± 0.04 ; $pA_2 \text{ L-765,314}$: 6.57 ± 0.18 ; $n=3$) (Figura 13).

Juntos, estes resultados indicam a participação dos α_{1A} -ARs, mas não α_{1B} - ou α_{1D} -ARs, na contração da CE de rato à noradrenalina, oximetazolina e A61603.

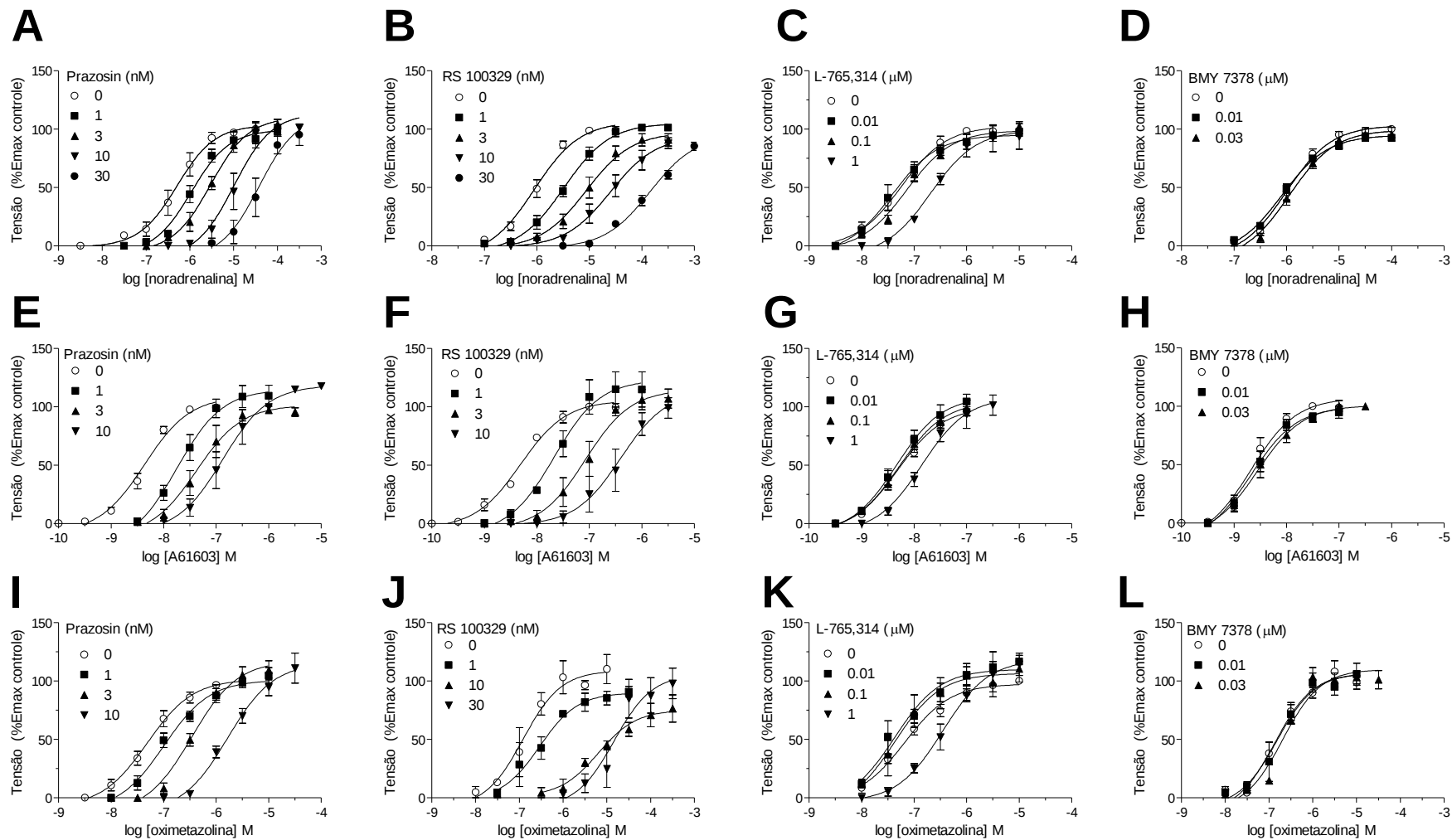


Figura 13. Antagonismo das contrações de segmentos da CE induzidas pelos agonistas α_{1A} seletivos A61603 (E a H) e oximetazolina (I a L) pelo prazosin (α_1 -seletivo), RS 100329 (α_{1A} -seletivo), L-765,314 (α_{1B} -seletivo) e BMY 7378 (α_{1D} -seletivo). Para comparação também são mostrados os efeitos dos antagonistas nas contrações da CE induzidas pela noradrenalina (A a D) apresentados na Figura 11. Dados representam média $\pm$ epm de 3-4 segmentos provenientes de diferentes ratos.

4.2.1 Avaliação do efeito protetor de antagonistas seletivos contra a inativação de α_1 -ARs da CE por antagonistas irreversíveis

Os subtipos de α_1 -ARs envolvidos na contração da CE do rato foram adicionalmente investigados através de experimentos de proteção contra a inativação induzida pelos antagonistas irreversíveis alquilantes fenoxibenzamina (PBZ) e cloroetilclonidina (CEC). Nestes experimentos, após a construção de uma curva concentração-resposta controle à noradrenalina ou A61603, o prazosin (1nM), RS 100329 (1nM) ou BMY 7378 (10nM) foram incubados por 45 minutos e então os tecidos foram expostos à PBZ ou CEC. Assim, o envolvimento de um subtipo de α_1 -AR foi avaliado pelo efeito protetor dos antagonistas seletivos contra a alquilação dos α_1 -ARs produzida pela PBZ ou CEC.

É importante ressaltar que nas concentrações selecionadas ($3 \times K_B$), é previsto que o RS 100329 ocupe seletivamente os α_{1A} -ARs (ocupação de 75% dos α_{1A} e 3% dos α_{1D}), enquanto que o BMY 7378 ocupe seletivamente os α_{1D} -ARs (ocupação de 75% dos α_{1D} e 9% dos α_{1A}).

4.2.2 Fenoxibenzamina (PBZ)

O tratamento dos segmentos da CE com PBZ 10, 30 ou 100nM por 10 minutos reduziu a potência e/ou a contração máxima induzida pela noradrenalina, indicando a presença de receptores de reserva para a noradrenalina neste tecido (Figura 14).

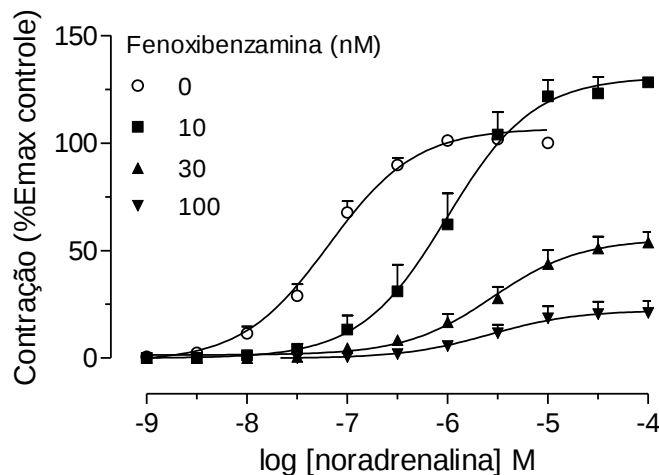


Figura 14. Efeito da PBZ sobre as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de rato. Após a construção de uma curva concentração-resposta controle à noradrenalina os segmentos da CE foram expostos a PBZ 10, 30 ou 100nM por 10 minutos e então extensivamente lavados para a retirada da droga remanescente. Trinta minutos após a lavagem, uma nova curva concentração-resposta à noradrenalina foi construída. Cada tecido foi exposto a apenas uma concentração de PBZ. Dados representam média±epm de 4 segmentos diferentes para cada concentração de PBZ.

A PBZ 10nM reduziu em quinze vezes a potência da noradrenalina (pD_2 controle: 7.18 ± 0.05 vs pD_2 PBZ 10nM: 6.00 ± 0.07 , $p < 0.05$) enquanto 30 e 100nM reduziram em 40 vezes a potência da noradrenalina (pD_2 PBZ 30nM: 5.55 ± 0.13 ; pD_2 PBZ 100nM: 5.57 ± 0.21 ; $p < 0.05$ vs pD_2 controle). A contração máxima induzida pela noradrenalina foi reduzida pela PBZ 30 e 100nM em 45 e 77% ($p < 0.05$), respectivamente. O efeito protetor dos antagonistas foi testado contra os efeitos da PBZ 30nM, um tratamento que eliminou a reserva de receptores, mas ainda assim permitiu a observação de contrações relativamente robustas à noradrenalina.

A incubação dos tecidos com o antagonista α_{1A} -seletivo RS 100329 1nM reduziu a inativação dos α_1 -ARs da CE de rato pela PBZ 30nM. Na presença de RS 100329, a PBZ reduziu a potência da noradrenalina em 8 vezes e a contração máxima à noradrenalina em 23% (Figura 15A, Tabela 4). Ambos os efeitos da PBZ na presença de RS 100329 foram significativamente reduzidos quando comparados aos efeitos da PBZ na ausência do antagonista seletivo α_{1A} ($p < 0.05$). A incubação do antagonista seletivo α_{1D} BMY 7378 10nM não foi capaz de proteger os α_1 -ARs envolvidos na contração da CE de rato contra a PBZ (Figura 15A). É importante ressaltar que o RS 100329 1nM e o BMY 7378 10nM protegeram os α_{1A} - e α_{1D} -ARs do ducto deferente e aorta torácica de rato da inativação pela PBZ 30nM, respectivamente (Figura 15B e C).

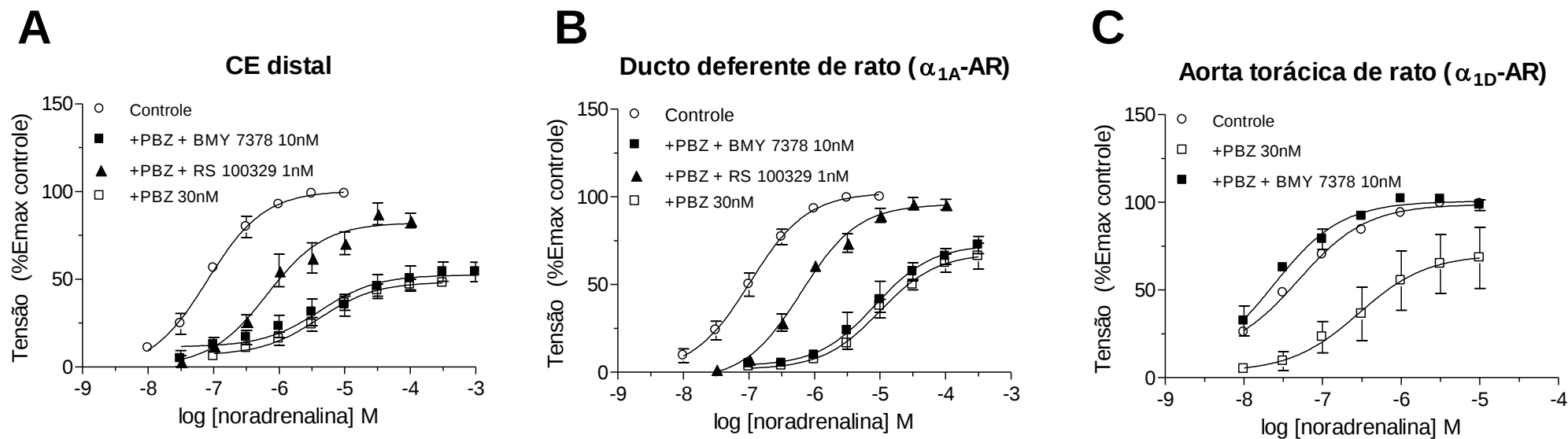


Figura 15. Proteção dos α_1 -ARs da CE (A), ducto deferente (B) ou aorta torácica (C) de rato contra a inativação induzida pela PBZ (30nM por 10 minutos).

Os antagonistas foram equilibrados por 45 minutos antes da exposição à PBZ. Dados representam média $\pm$ epm de 3 a 5 experimentos.

Tabela 4. Análise quantitativa dos efeitos da PBZ na potência (pD_2) e contração máxima (E_{max}) da noradrenalina na CE, ducto deferente ou aorta torácica de rato.

<i>Cauda do epidídimo</i>				
	<i>Controle</i>	<i>+ PBZ 30nM</i>	<i>+ PBZ 30nM +RS 100329 1nM</i>	<i>+ PBZ 30nM +BMY 7378 10nM</i>
<i>pD₂</i>	7.09±0.08 ^a	5.40±0.13 ^b	6.18±0.14 ^c	5.38±0.23 ^b
<i>E_{max}</i>	100.5±2.21 ^a	52.54±3.21 ^b	82.29±3.67 ^c	48.42±1.95 ^b
<i>Ducto deferente de rato</i>				
	<i>Controle</i>	<i>+ PBZ 30nM</i>	<i>+ PBZ 30nM +RS 100329 1nM</i>	<i>+ PBZ 30nM +BMY 7378 10nM</i>
<i>pD₂</i>	6.98±0.09 ^a	5.01±0.12 ^b	6.20±0.07 ^c	5.08±0.15 ^b
<i>E_{max}</i>	102.5±3.13 ^a	72.79±4,56 ^b	95.87±2.11 ^a	67.83±3.19 ^b
<i>Aorta torácica de rato</i>				
	<i>Controle</i>	<i>+ PBZ 30nM</i>	<i>+ PBZ 30nM +RS 100329 1nM</i>	<i>+ PBZ 30nM +BMY 7378 10nM</i>
<i>pD₂</i>	7.31±0.04 ^a	6.54±0.33 ^b	---	7.63±0.15 ^a
<i>E_{max}</i>	98.9±0.77 ^a	70.21±8.88 ^b	---	100.7±2.24 ^a
Dados representam média±epm de 3 a 5 diferentes experimentos. Letras sobrescritas diferentes denotam médias estatisticamente diferentes (p<0.05, ANOVA + Tukey).				

4.2.3 Cloroetilclonidina (CEC)

A incubação de segmentos da CE com CEC 10uM por 45 minutos reduziu em três vezes a potência da noradrenalina (pD_2 controle: 6.90 ± 0.11 , $n=4$ vs pD_2 CEC 10uM: 6.40 ± 0.17 , $n=4$; $p < 0.05$ teste t de student) sem alterar a contração máxima (Figura 16A). O tratamento dos tecidos com CEC 100uM por 45 minutos reduziu a potência da noradrenalina em três vezes (pD_2 controle: 7.07 ± 0.05 , $n=4$ vs pD_2 CEC 100uM: 6.49 ± 0.07 , $n=4$; $p < 0.05$ teste t de student) e a contração máxima induzidas pela noradrenalina em 20% (E_{max} controle: 100.30 ± 1.35 , $n=4$ vs E_{max} CEC 100uM: 79.42 ± 1.69 , $n=4$; $p < 0.05$ teste t de student) (Figura 16B).

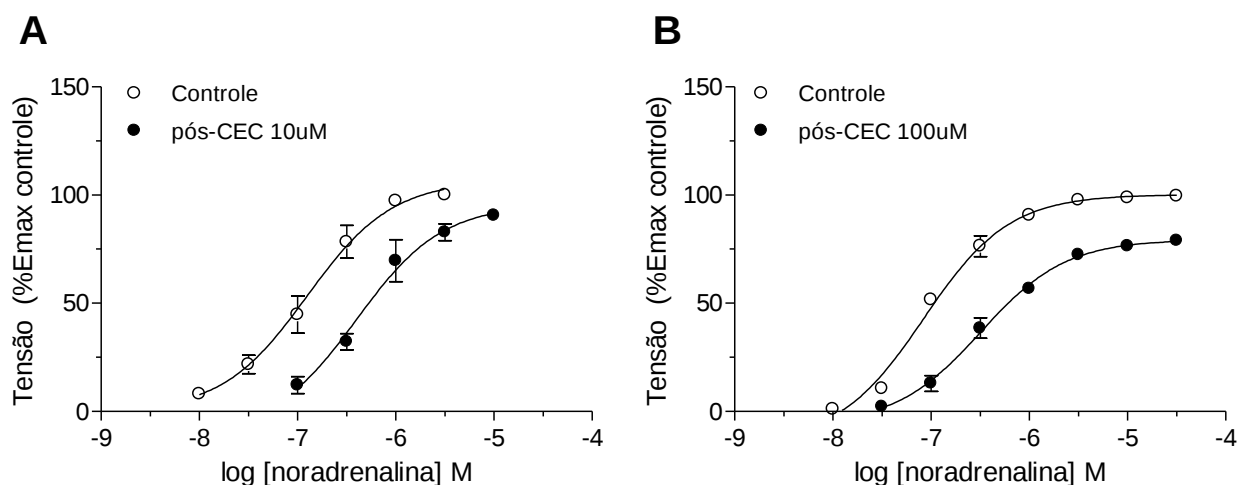


Figura 16. Efeito da CEC nas contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de rato. Segmentos foram incubados com CEC 10uM (A) ou 100uM (B) por 45 minutos, lavados extensivamente e uma nova curva à noradrenalina foi construída (pós-CEC). Dados representam média $\pm$ epm de 4 diferentes segmentos.

O efeito protetor do prazosin, RS 100329, BMY 7378 foi investigado contra a CEC 10uM (Figura 17). A CEC não foi capaz de inativar os α_1 -ARs envolvidos na contração da CE quando sua incubação foi feita na presença de prazosin 1nM. Diferente do observado quando o agente alquilante usado foi a PBZ, a inativação dos α_1 -ARs da CE pela CEC não foi alterada na presença do antagonista seletivo α_{1A} RS 100329 1nM (Figura 17C). Também diferente do que foi observado com a PBZ, o BMY 7378 10nM protegeu os α_1 -ARs da CE da inativação induzida pela CEC (Figura 17D, Tabela 5).

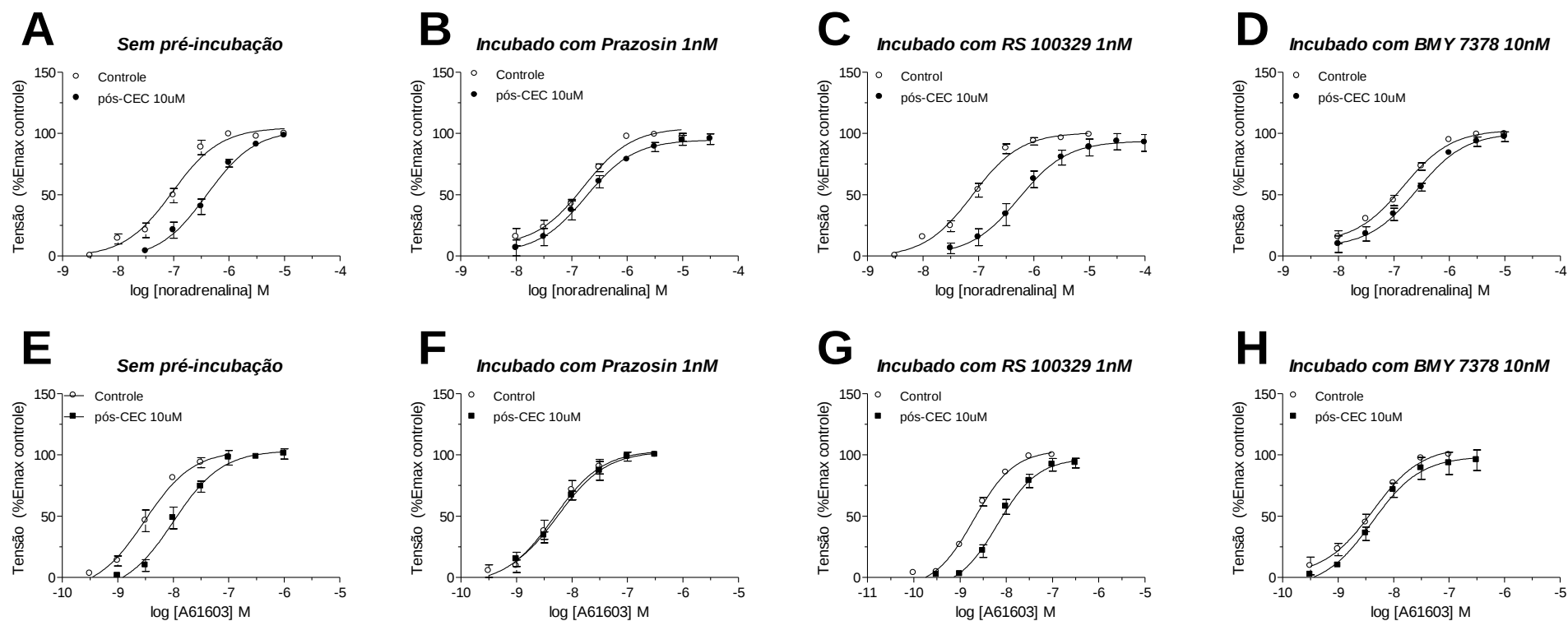


Figura 17. Investigação da proteção dos α_1 -ARs da CE de rato pelos antagonistas seletivos prazosin, RS 100329 ou BMY 7378 nas contrações induzidas pela noradrenalina (A a D) ou A61603 (E a H). Dados representam média $\pm$ epm de 3 a 4 diferentes tecidos provenientes de diferentes ratos.

Tabela 5. Análise quantitativa dos efeitos de antagonistas seletivos sobre a inativação dos α_1 -ARs mediando contração da CE de rato à noradrenalina ou A61603 pela CEC 10 μ M por 45 minutos.

Noradrenalina				
	pD ₂ controle	pD ₂ pós-CEC	log CR	
Veículo	7.02±0.10	6.40±0.10*	0.56±0.04 ^a	n = 4
Prazosin	6.83±0.11	6.74±0.10 ^{ns}	0.16±0.05 ^b	n = 4
RS 100329	7.11±0.08	6.27±0.14*	0.74±0.09 ^a	n = 4
BMY 7378	6.83±0.07	6.59±0.09*	0.26±0.02 ^b	n = 4
A61603				
	pD ₂ controle	pD ₂ pós-CEC	log CR	
Veículo	8.52±0.10	8.00±0.10*	0.55±0.08 ^a	n = 3
Prazosin	8.31±0.11	8.25±0.11 ^{ns}	0.0±0.0 ^b	n = 3
RS 100329	8.70±0.04	8.19±0.10*	0.61±0.09 ^a	n = 4
BMY 7378	8.38±0.10	8.39±0.13 ^{ns}	0.07±0.08 ^b	n = 4
Dados representam média±epm. *p<0.05 vs pD ₂ controle (teste t de student); ns: não significativo (p>0.05, teste t de student). Letras sobrescritas diferentes denotam médias de log CR estatisticamente diferentes (p<0.05, ANOVA + Tukey).				

O efeito protetor do prazosin, RS 100329 ou BMY 7378 contra a CEC foi adicionalmente investigado nas contrações induzidas pelo agonista seletivo α_{1A} A61603. De modo semelhante ao observado nas contrações induzidas pela noradrenalina, o prazosin 1nM e o antagonista seletivo α_{1D} BMY 7378 10nM preveniram a inativação dos α_1 -ARs envolvidos na contração produzida pelo A61603 (Figura 17F e H, Tabela 5). Entretanto, o antagonista seletivo α_{1A} RS 100329 1nM não alterou a inativação dos α_1 -ARs envolvidos na contração produzida pelo A61603 (Figura 17G, Tabela 5). Para investigar se a falta de proteção do antagonista seletivo α_{1A} foi específica ao RS 100329 investigamos se o RS 17053, outro antagonista seletivo α_{1A} de estrutura química não relacionada ao RS 100329, era capaz de proteger os α_1 -ARs contra a inativação pela CEC.

O RS 17053 comportou-se como antagonista competitivo dos α_1 -ARs da CE (Figura 11E), porém, o efeito funcional do RS 17053 persistiu após extensiva lavagem dos tecidos (Figura 18) sugerindo lenta dissociação dos α_1 -ARs. Portanto, controles paralelos expostos somente ao RS 17053 10nM, mas não expostos à CEC foram incluídos em cada experimento. A diferença entre o log CR observado na presença do RS 17053 e aquele causado pelo tratamento combinado com RS 17053/CEC foi utilizada como medida da intensidade da inativação dos α_1 -ARs pela CEC.

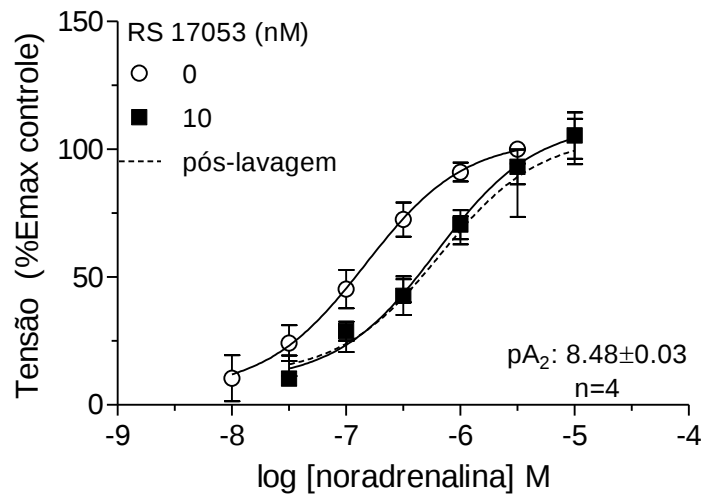


Figura 18. Antagonismo da contração da CE de rato induzida pela noradrenalina pelo RS 17053 10nM. Após o estabelecimento de uma curva concentração-resposta para noradrenalina na ausência de RS 17053 (curva 0) o RS 17053 10nM foi incubado por 2 horas e uma nova curva concentração-resposta foi obtida (curva 10). Trinta minutos após extensiva lavagem dos segmentos (15 vezes com 15 ml) uma nova curva concentração-resposta à noradrenalina foi construída (curva *pós-lavagem*). Dados representam média±epm de 4 diferentes segmentos.

A potência do A61603 foi reduzida em aproximadamente quatro vezes em segmentos da CE expostos somente ao RS 17053 10nM (log CR: 0.58 ± 0.08 , $n=4$). O tratamento combinado com RS 17053 10nM e CEC 10uM reduziu em treze vezes a potência do A61603 na indução de contração de segmentos da CE e este efeito mais intenso foi estatisticamente significativo (log CR_{RS 17053}: 0.58 ± 0.08 , $n=4$ vs log CR_{RS 17053+CEC}: 1.12 ± 0.08 , $n=4$; $p < 0.05$, teste t de student) (Figura 19). Não houve alteração na intensidade da inativação dos α_1 -ARs pela CEC 10uM na presença do RS 17053 10nM (log CR não protegido: 0.55 ± 0.08 , $n=3$ vs log CR CEC na presença de RS 17053: 0.54 ± 0.08 , $n=4$; $p > 0.05$ teste t de student).

Juntos, estes resultados demonstram que embora as contrações da CE de rato não resultem da ativação do α_{1D} -AR pela noradrenalina ou A61603 o α_{1D} -AR modula as contrações induzidas pelos α_{1A} -ARs.

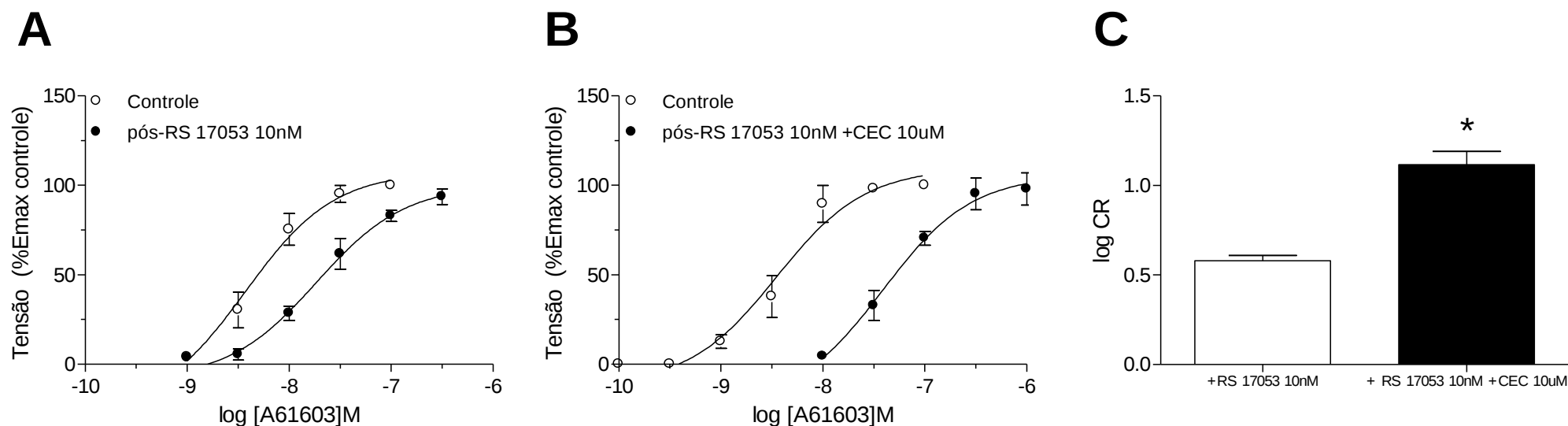


Figura 19. Avaliação do efeito do RS 17053 10nM contra a inativação dos α_1 -ARs da CE de rato pela CEC. Após a obtenção de uma curva controle ao A61603 o RS 17053 10nM foi incubado por 2 horas. Após o período de 2 horas de incubação do RS 17053 o veículo ou CEC 10uM foram adicionados às cubas e incubados por 45 minutos. Decorridos os 45 minutos de incubação RS 17053/veículo (A) ou RS 17053/CEC (B) os tecidos foram extensivamente lavados para retirada das drogas e uma nova curva concentração-resposta ao A61603 foi obtida após 30 minutos. O efeito dos diferentes tratamentos na potência do A61603, quantificado como log CR, é apresentado em (C). Dados representam média $\pm$ epm de 4 diferentes segmentos para a incubação RS 17053/veículo ou RS 17053/CEC. * $p < 0.05$ (teste t de student).

4.3 Investigação da heterodimerização dos α_{1A} e α_{1D} -ARs

4.3.1 Investigação da dimerização entre o α_{1A} -AR e os α_{1B}, α_{1D} e $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -ARs

A dimerização constitutiva (independente de ligantes) entre os α_{1A} -Rluc8 e os α_{1A} -eGFP, α_{1B} -eGFP, α_{1D} -eGFP ou $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP foi avaliada através da construção de curvas de saturação de BRET. Observa-se na Figura 20 que a co-expressão do doador de energia α_{1A} -Rluc8 (250ng de cDNA) e quantidades crescentes (75-2500ng de cDNA) dos aceptores fluorescentes α_{1A} -eGFP, α_{1B} -eGFP, α_{1D} -eGFP ou $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP resultou em crescente transferência de energia (BRET). A transferência de energia entre todos os pares α_{1A} -Rluc8/aceptor-eGFP foi saturável.

Estes resultados indicam homodimerização dos receptores α_{1A} e heterodimerização entre α_{1A}/α_{1B} , α_{1A}/α_{1D} e $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$.

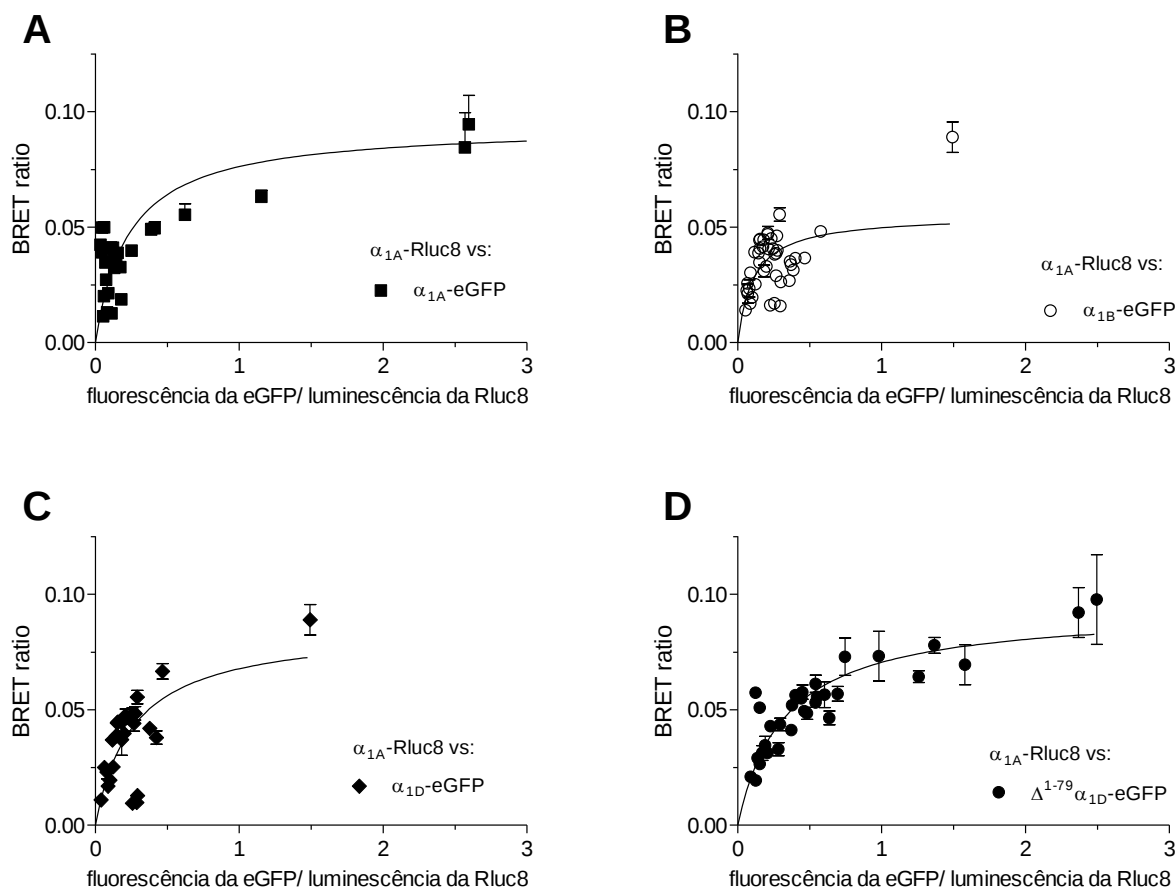


Figura 20. Curvas de saturação de BRET entre os receptores α_{1A} -Rluc8/ α_{1A} -eGFP (A), α_{1A} -Rluc8/ α_{1B} -eGFP (B), α_{1A} -Rluc8/ α_{1D} -eGFP (C) e α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP (D). Curvas foram geradas com dados de três experimentos independentes. Cada símbolo representa a média e as barras verticais, quando maiores que os símbolos, o epm das leituras em triplicata de cada experimento.

Na Tabela 6 são apresentados o BRETmax e BRET50 derivadas pela análise de regressão não linear para cada par de receptores. Não houve diferenças entre o BRETmax ou BRET50 entre as diferentes combinações de receptores testados.

Tabela 6. Análise quantitativa da interação entre os diferentes receptores

	BRETmax	BRET50
α_{1A} -Rluc8 / α_{1A} -eGFP	0.094±0.006	0.233±0.039
α_{1A} -Rluc8 / α_{1B} -eGFP	0.055±0.005	0.110±0.027
α_{1A} -Rluc8 / $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP	0.094±0.005	0.263±0.069
α_{1A} -Rluc8 / α_{1D} -eGFP	0.086±0.011	0.328±0.046
Dados representam média±epm de 3 diferentes transfecções.		

4.3.2 Avaliação do efeito funcional da co-expressão do $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -AR no aumento de cálcio intracelular livre induzido pela ativação do α_{1A} -ARs recombinantes humanos expressos em células HEK 293

Visto que heterodímeros entre os α_{1A} e α_{1D} -ARs foram detectados nos experimentos de BRET os efeitos da expressão do adrenoceptor $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ no aumento de cálcio induzido pela ativação do α_{1A} -AR foram avaliados.

Células HEK 293 foram co-transfectadas com o receptor α_{1A} -Rluc8 e plasmídeo não codificante (pcDNA3) ou α_{1A} -Rluc8 e plasmídeo codificante do receptor $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA e o aumento de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina, A61603, oximetazolina e cirazolina foram investigados (Figura 21A e B). Cabe ressaltar que em células HEK 293 não transfectadas nenhum dos agonistas testados foi capaz de elevar os níveis de cálcio intracelular livre (dados não mostrados).

Em células transfectadas somente com o α_{1A} -Rluc8 (+pcDNA3) a noradrenalina, A61603 e a cirazolina elevaram o cálcio intracelular livre de maneira concentração dependente. O A61603 e a cirazolina se comportaram como agonistas parciais em relação à noradrenalina. O aumento de cálcio induzido pela oximetazolina foi pequeno e variável e, portanto, não foi analisado estatisticamente (Figura 21A). A potência da noradrenalina em células co-expressando os receptores α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA foi 28 vezes maior quando comparada à células expressando somente o adrenoceptor α_{1A} -Rluc8 (Figura 21C). A resposta máxima da noradrenalina em células expressando somente o adrenoceptor α_{1A} -Rluc8 ou co-expressando os receptores α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA foi semelhante ($p>0.05$). A potência ou resposta máxima do A61603 e cirazolina em células expressando somente o adrenoceptor α_{1A} -Rluc8 ou co-expressando os receptores α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA foram semelhantes ($p>0.05$) (Figura 21D e E; Tabela 7).

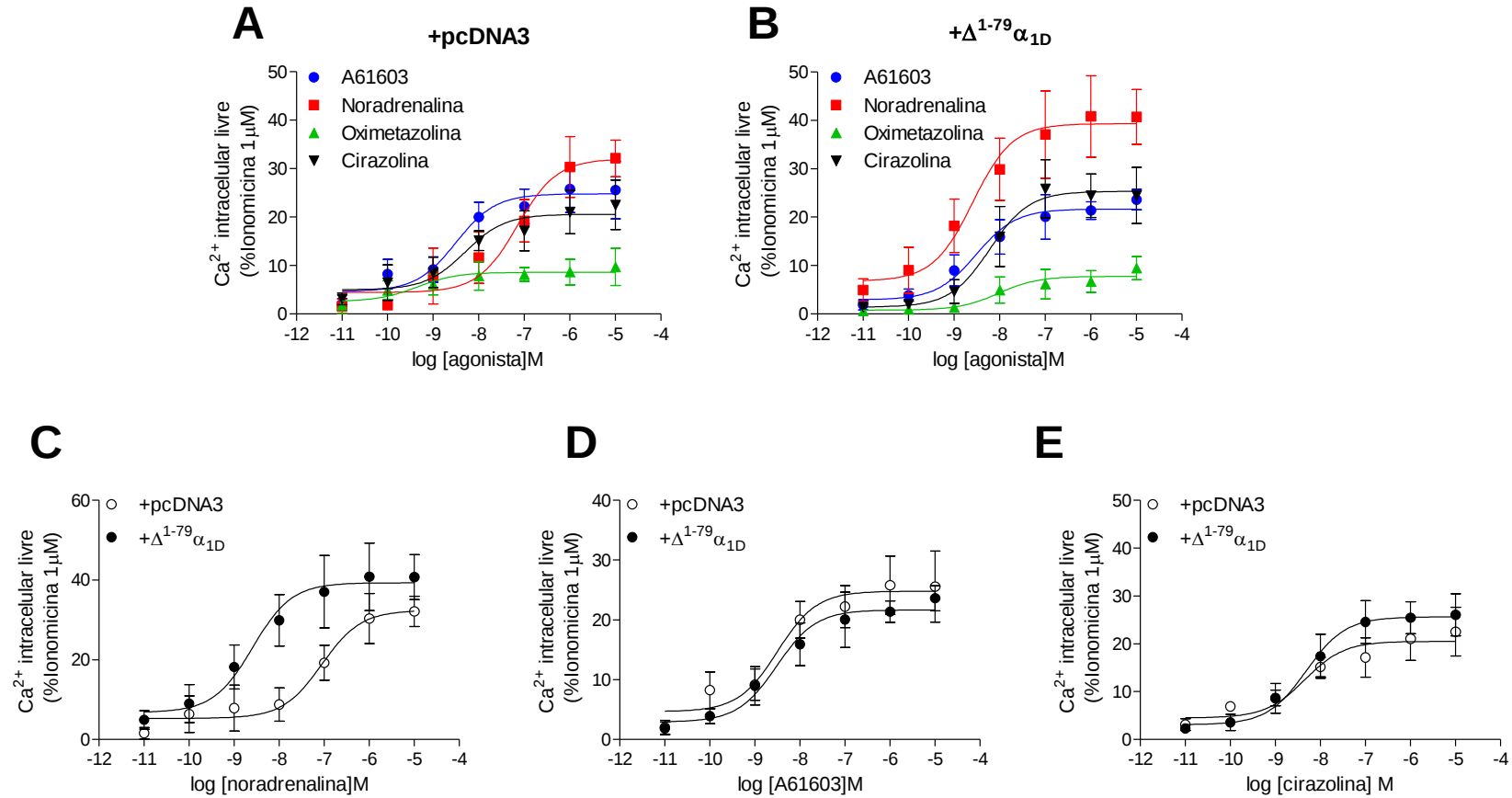


Figura 21. Curvas concentração-resposta médias para noradrenalina, A61603, cirazolina e oximetazolina em células HEK 293 expressando α_{1A} -Rluc8 (+pcDNA3) (A) ou α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA (+ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$) (B). Em (C a E) apresentamos as curvas concentração-resposta para os diferentes agonistas separadamente. Dados representam média $\pm$ epm de 3 transfecções independentes.

Tabela 7. Potência (pD₂) e resposta máxima (Emax) da noradrenalina, A61603 e cirazolina no aumento de cálcio intracelular livre em células HEK 293 expressando o receptor α_{1A} -Rluc8 ou co-expressando os receptores α_{1A} -Rluc8/ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA.

	α_{1A} -Rluc8		α_{1A} -Rluc8+ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
Noradrenalina	32.40±3.44	7.15±0.31	39.32±3.34 ^{ns}	8.59±0.38*
A61603	24.81±2.09	8.50±0.39	22.00±2.00 ^{ns}	8.53±0.38 ^{ns}
Cirazolina	20.53±2.01	8.34±0.44	25.63±1.91 ^{ns}	8.31±0.29 ^{ns}
Dados representam média±epm de 3 transfecções independentes. ns: não significativo p>0.05 ; *p<0.05 vs células expressando somente o receptor α_{1A} (teste t de student).				

4.3.3 *Investigação do efeito da expressão dos adrenorreceptores $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA no aumento de cálcio intracelular livre induzido por um α_{1A} -AR endogenamente expresso em células 22Rv1*

O efeito da expressão do receptor $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA na sinalização de um α_{1A} -AR endogenamente expresso foi investigado através da expressão do receptor $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA em células humanas 22Rv1.

Experimentos de *binding* do [3 H]Prazosin demonstraram que as células 22Rv1 expressam endogenamente α_1 -ARs (49.0 ± 6.9 fmol/mg proteína). A ligação específica do [3 H]Prazosin em células 22Rv1 foi inibida pelo antagonista seletivo α_{1A} RS 17053, mas não pelo antagonista seletivo α_{1D} BMY 7378 (dados não mostrados).

A noradrenalina, A61603 e a cirazolina elevaram a concentração de cálcio intracelular livre via ativação do α_1 -AR endogenamente expresso em células 22Rv1 (Figura 22A). O A61603 e a cirazolina se comportaram como agonistas parciais em relação à noradrenalina e a oximetazolina não foi capaz de aumentar cálcio intracelular livre em células 22Rv1.

O aumento de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina em células 22Rv1 foi inibido pelo prazosin (1nM), 5-metilurapidil (10nM), RS 17053 (1-10nM) mas não pelo BMY 7378 (10nM) (Figura 22B a E). A potência inibitória dos antagonistas contra a elevação do cálcio intracelular em células 22Rv1 foi prazosin ($pIC_{50}: 9.36 \pm 0.15$) > RS 17053 ($pIC_{50}: 8.26 \pm 0.15$) > 5-metilurapidil ($pIC_{50}: 7.91 \pm 0.19$) >> BMY 7378 ($pIC_{50} > 6.00$) (Figura 22F). Estes resultados demonstram que os α_{1A} -ARs expressos endogenamente em células 22Rv1 mediam o aumento de cálcio intracelular livre à noradrenalina.

O efeito da co-expressão α_{1A}/α_{1D} foi investigado através da transfecção do plasmídeo codificante do adrenoceptor $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -HA em células 22Rv1 ($\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1). Células transfectadas com plasmídeo não codificante (pcDNA3) foram utilizadas como controle (α_{1A} -22Rv1).

Experimentos de *binding* do [3 H]Prazosin em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 demonstraram que o nível médio de expressão do adreceptor $HA-\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ foi de 288 fmol/mg de proteína. Desta maneira, a razão de expressão entre $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ variou de 1:4 a 1:6 nas diferentes transfecções realizadas. Cabe ressaltar que o nível de expressão do α_{1A} -AR em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 (37.2fmol/mg de proteína) não foi diferente daquele determinado em células α_{1A} -22Rv1 (44fmol/mg de proteína).

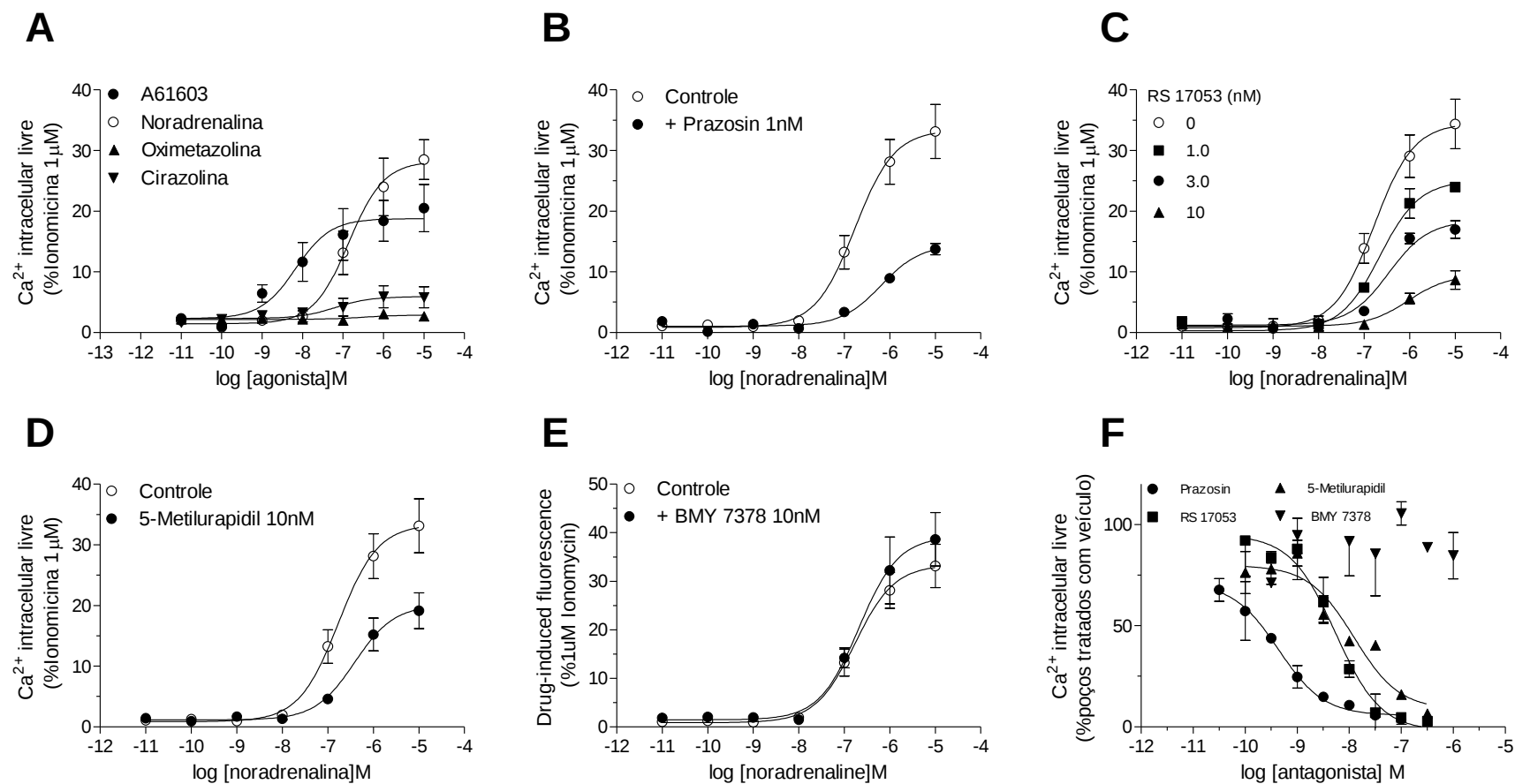


Figura 22. Caracterização farmacológica dos α_1 -ARs endogenamente expressos mediante aumento de cálcio intracelular livre em células 22Rv1 à noradrenalina. (A) Curvas concentração-resposta médias à noradrenalina, A61603, cirazolina e oximetazolina. (B a E) Avaliação do antagonismo do aumento de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina pelo prazosin, 5-metilurapidil ou BMY 7378. (F) Curvas de inibição do aumento de cálcio intracelular induzido pela noradrenalina 1 μM . Dados representam média $\pm$ epm de 3-6 experimentos independentes.

Na Figura 23 apresentamos as curvas concentração-resposta para o aumento de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina, A61603, oximetazolina e cirazolina em células α_{1A} -22Rv1 (+ pcDNA3) ou $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 (+ $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$).

A resposta máxima da noradrenalina, A61603 e cirazolina foi significativamente aumentada em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 quando comparada às células α_{1A} -22Rv1 (Figura 23C a F). A potência do A61603 na elevação de cálcio intracelular livre em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 foi reduzida em 9 vezes quando comparado à células α_{1A} -22Rv1 (pD_2 $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$: 7.50 ± 0.18 , $n=5$ vs pD_2 α_{1A} : 8.44 ± 0.34 , $n=5$; $p<0.05$). A oximetazolina, incapaz de elevar cálcio intracelular em células α_{1A} -22Rv1 atuou como agonista parcial em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 (Figura 23F). A expressão dos adrenosceptores $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ não alterou a capacidade do carbacol, um agonista de receptores muscarínicos, elevar cálcio intracelular livre em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 (Figura 23G).

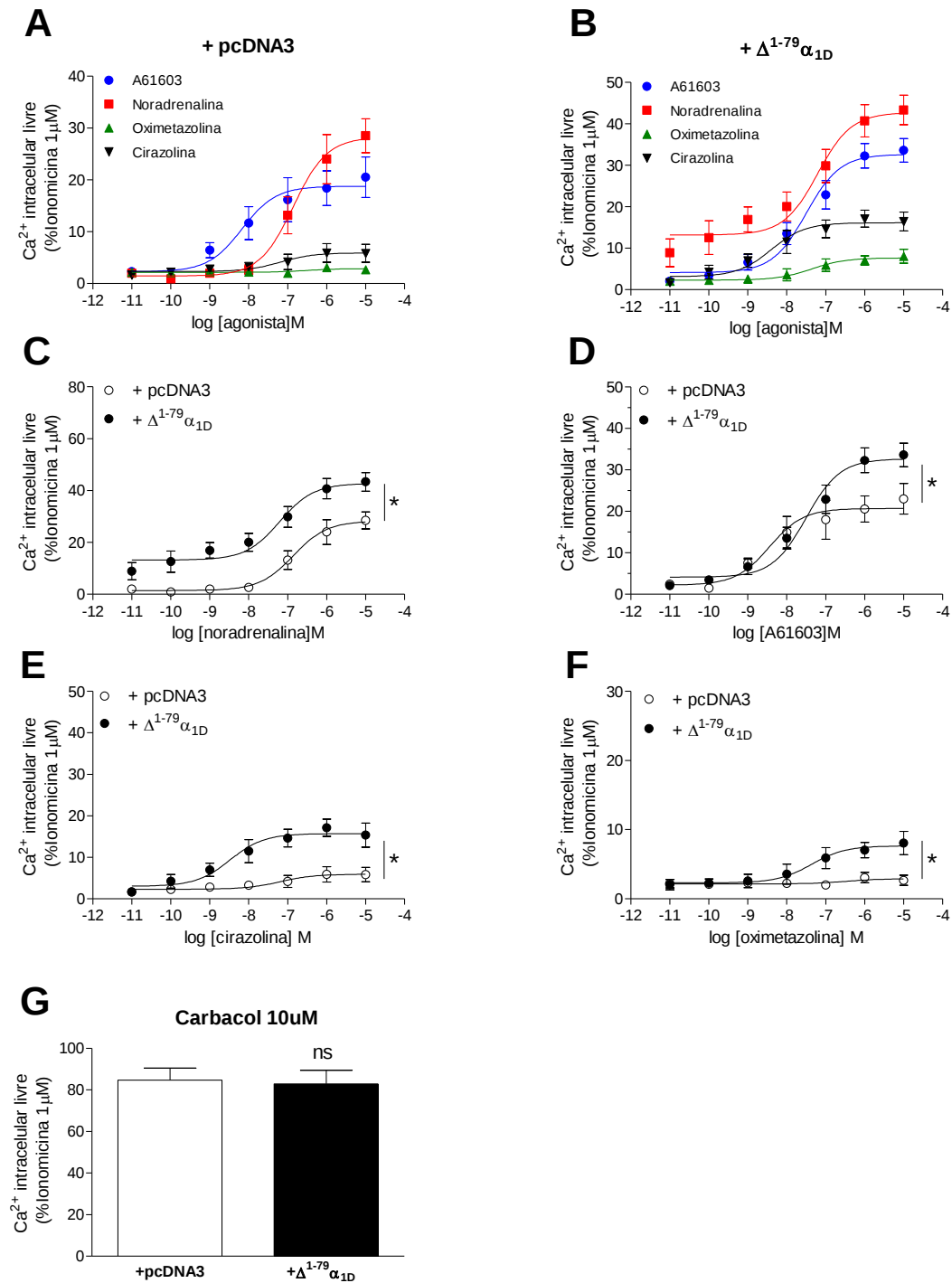


Figura 23. Curvas concentração-resposta à noradrenalina, A61603, cirazolina ou oximetazolina em células 22Rv1 expressando somente o α_{1A} -AR (A, +pcDNA3) ou co-expressando os $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -ARs (B, + $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$). (C a F) Curvas concentração-resposta médias para a noradrenalina, A61603, cirazolina e oximetazolina. (G) Aumento de cálcio intracelular induzido pelo carbacol 10uM em células 22Rv1 expressando somente o adrenoceptor α_{1A} (A, +pcDNA3) ou co-expressando os adrenoceptores $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ (B, + $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$). Dados representam média±epm de 4-5 diferentes transfecções. * $p < 0.05$ vs Emax de células expressando somente o α_{1A} -AR (teste t de student). ns: não significativo ($p > 0.05$, teste t de student).

A participação dos α_{1A} -AR e $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ no aumento de cálcio induzido pela noradrenalina, A616003, oximetazolina e cirazolina em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 foi avaliada pelo efeito do RS 17053 (seletivo α_{1A} , 10nM) e BMY 7378 (seletivo α_{1D} , 10nM) sobre as curvas concentração-resposta aos diferentes agonistas (Figura 24). Nas concentrações selecionadas o RS 17053 e o BMY 7378 antagonizam seletivamente os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs, respectivamente.

O RS 17053 10nM reduziu em 31 e 40% a resposta máxima à noradrenalina e ao A61603, respectivamente (Figura 24A e B). O pD_2 da noradrenalina não foi alterado pelo RS 17053 enquanto o pD_2 do A61603 foi reduzido em 14 vezes (Tabela 8). O tratamento com BMY 7378 reduziu em 8 vezes a potência da noradrenalina sem qualquer efeito sobre a resposta máxima. O BMY 7378 não alterou a potência ou a resposta máxima do A61603 (Figura 24B).

A elevação de cálcio intracelular induzida pela oximetazolina e cirazolina não foi afetada pelo RS 17053 mas foi completamente inibida pelo BMY 7378, portanto, o aumento de cálcio induzido por estes dois agonistas em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1 é mediado pela ativação de adrenoceptores $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ (Figura 24C e D).

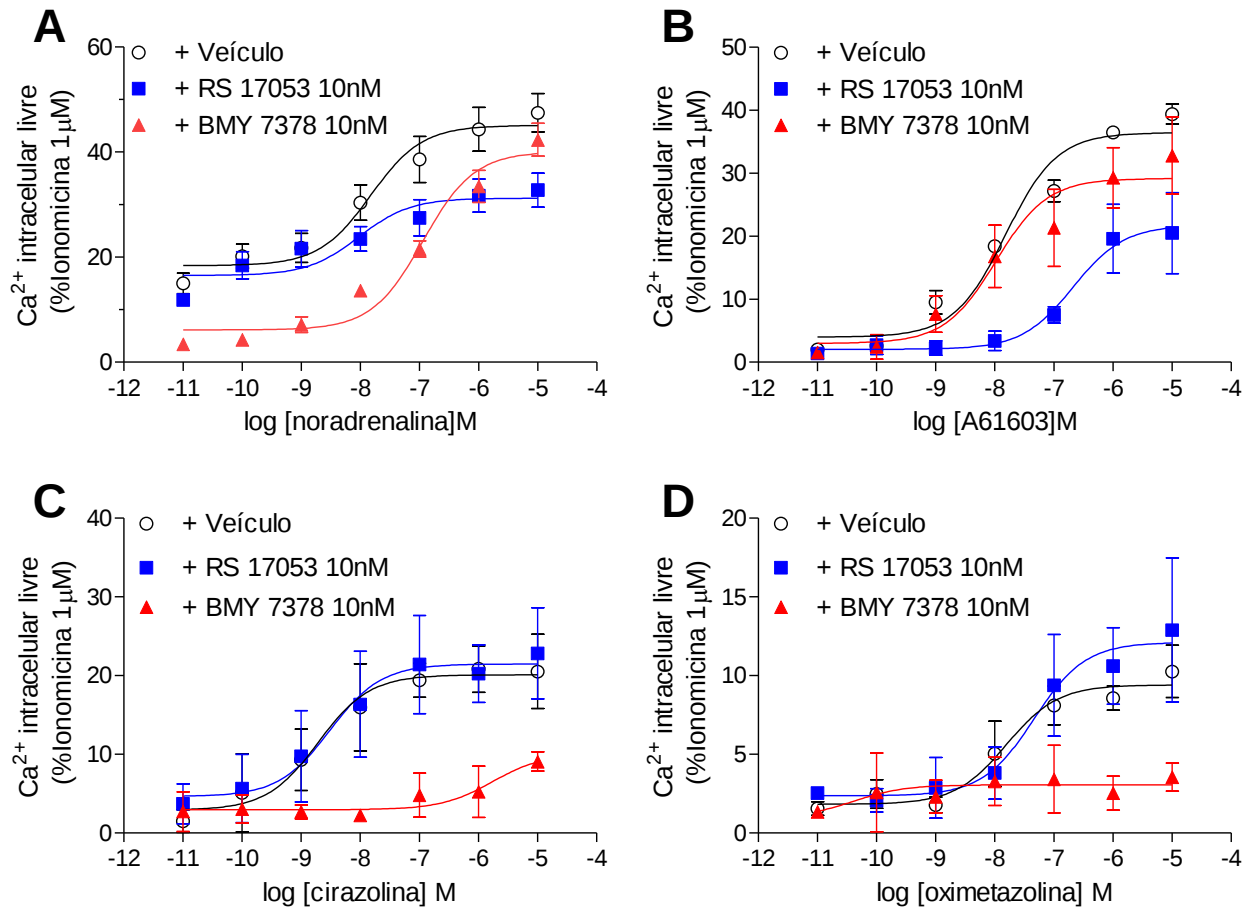


Figura 24. Antagonismo do aumento de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina (A), A61603 (B), cirazolina (C) e oximetazolina (D) em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1. O antagonista seletivo α_{1A} RS 17053 10nM ou seletivo α_{1D} BMY 7378 10nM foram incubados durante 30 minutos antes da administração dos agonistas. Dados representam média $\pm$ epm de 3-6 diferentes transfecções.

Tabela 8. Análise quantitativa do efeito do RS 17053 e BMY 7378 sobre a elevação de cálcio intracelular livre induzido pela noradrenalina ou A61603 em células $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -22Rv1.

<i>Noradrenalina</i>			
	+Veículo	+RS 17053 10nM	+BMY 7378 10nM
<i>pD₂</i>	7.83±0.26	8.08±0.34 ^{ns}	6.94±0.13*
<i>E_{max}</i>	45.08±2.16	31.23±1.89*	40.10±1.92 ^{ns}
<i>A61603</i>			
	+Veículo	+RS 17053 10nM	+BMY 7378 10nM
<i>pD₂</i>	7.82±0.13	6.68±0.34*	7.98±0.32 ^{ns}
<i>E_{max}</i>	36.44±1.38	21.75±2.91*	29.16±2.73 ^{ns}
Dados representam média±epm de 3-6 diferentes transfecções. *p<0.05 vs Veículo; ns: não significativo (p>0.05).			

4.4 Investigação da modulação androgênica e estrogênica da plasticidade dos subtipos de α_1 -ARs mediando contração da CE de rato

O peso corpóreo final dos ratos dos grupos controle (418.2 ± 12.3 g, $n=11$), castrados+VEH (442.5 ± 13.2 g, $n=8$) e castrados+DHT (469.0 ± 20.3 g, $n=5$) não foi estatisticamente diferente ($p > 0.05$, ANOVA). A castração por orquidectomia bilateral por 8 dias reduziu significativamente o peso de órgãos do sistema reprodutor masculino dependentes de andrógeno e este efeito foi prevenido pela administração de DHT (Figura 25).

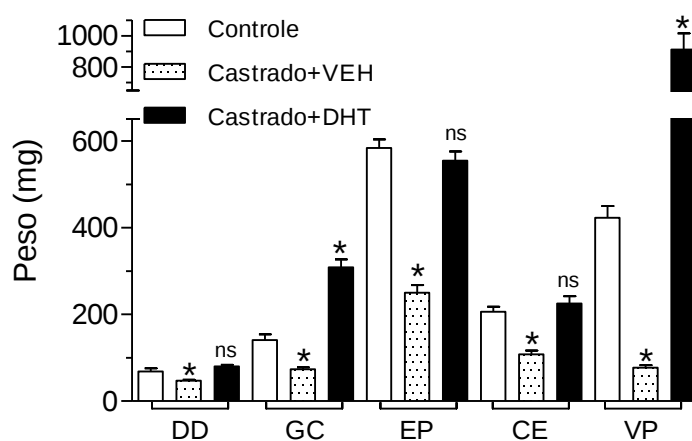


Figura 25. Efeito da castração e da reposição com DHT (5mg/dia/7dias) sobre o peso de órgãos dependentes de andrógeno do sistema reprodutor masculino de ratos. O peso do ducto deferente (DD), glândula de coagulação (GC), epidídimo (EP), cauda do epidídimo (CE) e lobo ventral da próstata (VP) são apresentados. Dados representam média $\pm$ epm de órgãos de 5-11 ratos/grupo. * $p < 0.05$ vs controle não castrado (ANOVA+Tukey); ns:não significativo ($p > 0.05$ vs controle não castrado, ANOVA).

4.4.1 Orquidectomia bilateral por 8 dias

4.4.1.1 Expressão dos α_1 -ARs na CE

O nível de expressão dos α_1 -ARs determinado por experimentos de ligação do [3 H]Prazosin (Bmax) ou a afinidade do [3 H]Prazosin pelos α_1 -ARs da CE (K_D) não foram alterados pela castração por 8 dias (Figura 26, Tabela 9).

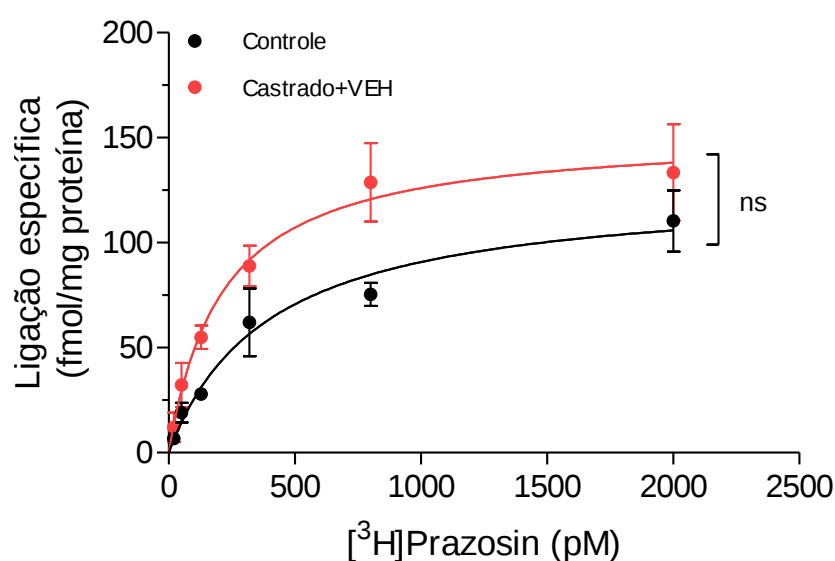


Figura 26. Isotermas de saturação da ligação do [3 H]Prazosin a segmentos da CE de ratos controle e castrados. Dados da ligação do [3 H]Prazosin a segmentos da CE de ratos controle foram apresentados na Figura 9. Dados representam média $\pm$ epm de segmentos da CE de 5 (controle) e 4 (castrado+VEH) diferentes ratos. ns: não significativo ($p > 0.05$, teste t de student).

Tabela 9. Densidade de receptores (B_{max}) e afinidade (K_D) da ligação específica do [3H]Prazosin a segmentos da CE de rato.

	<i>Controles</i>	<i>Castrados</i>
<i>B_{max}</i> <i>(fmol/mg de proteína)</i>	126.9 ± 6.5	152.8 ± 16.1 ^{ns}
<i>K_D</i> (pM)	398.2 ± 150.4	212.8 ± 76.2 ^{ns}
Dados representam a média ± epm de 5 (controle) ou 4 (castrados) animais/grupo. ns: não significativo (p>0.05, teste t de student).		

Os subtipos de α_1 -ARs expressos na CE foram investigados através de experimentos de inibição da ligação específica do [3H]Prazosin a segmentos da CE de ratos controle não castrados e castrados+VEH (Figura 27). O prazosin inibiu a ligação específica do [3H]Prazosin em segmentos da CE de ratos controle e castrados+VEH de maneira monofásica com estimativa de afinidade ($pK_I \approx 9.50$) consistente com a interação com α_1 -ARs. A inibição da ligação específica do [3H]Prazosin em segmentos da CE de ratos de ambos os grupos pelo BMY 7378 foi melhor descrita por curvas com dois sítios de ligação ($p < 0.05$). O sítio de alta afinidade ao BMY 7378 ($pK_I \approx 9.00$) é consistente com a expressão de α_{1D} -ARs enquanto o sítio de baixa afinidade representa α_{1A} -ARs ou α_{1B} -ARs. O perfil de inibição da ligação específica do [3H]Prazosin pelo RS 100329 apresentou comportamento complexo dependente do grupo experimental

avaliado. Em segmentos da CE de ratos controle a curva de inibição da ligação específica do [³H]Prazosin pelo RS 100329 foi monofásica e de alta afinidade ($pK_I \approx 9.50$) consistente com a interação com α_{1A} -ARs. Por outro lado, o RS 100329 discriminou um sítio de alta afinidade ($pK_{high} \approx 10.00$) e um sítio de baixa afinidade ($pK_{low} \approx 7.50$) em segmentos da CE de ratos castrados+VEH (Tabela 10). O sítio de alta afinidade demonstrado pelo RS 100329 é consistente com a interação com α_{1A} -ARs e o sítio de baixa afinidade é consistente com interação com α_{1B} -ARs ou α_{1D} -ARs. A identificação de α_{1D} -ARs na CE pelo BMY 7378 sugere que o sítio de baixa afinidade ao RS 100329 seja o α_{1D} -AR.

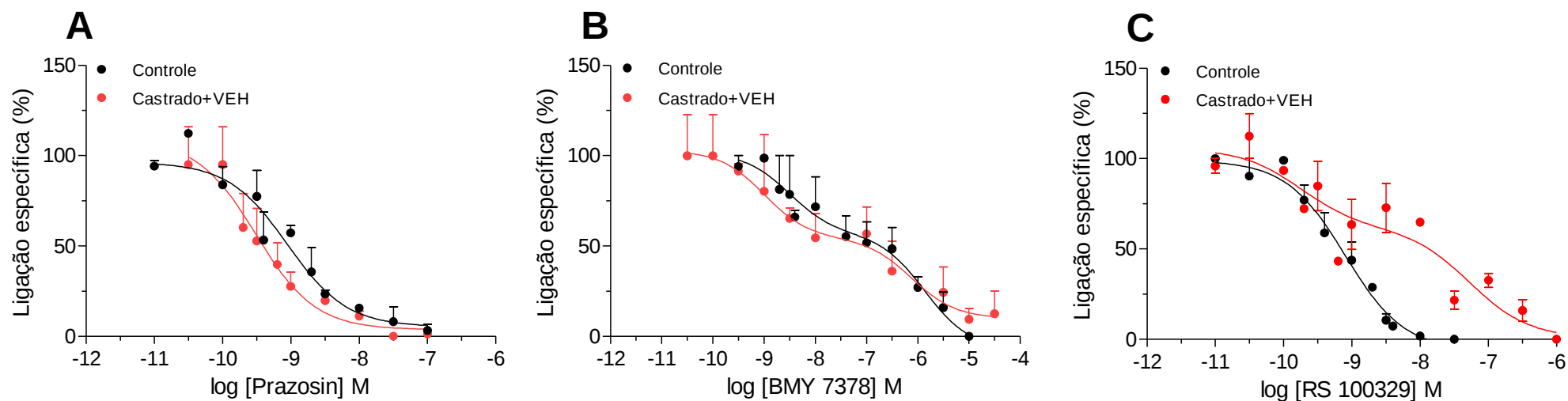


Figura 27. Curvas de inibição da ligação específica do $[^3\text{H}]\text{Prazosin}$ a segmentos da CE de ratos controle e castrados+VEH. Dados da ligação do $[^3\text{H}]\text{Prazosin}$ a segmentos da CE de ratos controle foram apresentados na Figura 9. Símbolos representam a média e as barras verticais, quando maiores que os símbolos, o epm de 3-5 animais/grupo.

Tabela 10. Estimativas de afinidade (pK_I) obtidas por análise de regressão não-linear das curvas de inibição da ligação do [3H]Prazosin a segmentos da CE de ratos controle e castrados+VEH. Para comparação também são apresentadas estimativas de afinidade do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 obtidos em experimentos de inibição da ligação do [3H]Prazosin aos receptores α_1 humanos clonados e expressos em células HEK 293 ou CHO-K1.

	Controle		Castrado+VEH		pK_I^*		
	$pK_{I\text{ (high)}}$	$pK_{I\text{ (low)}}$	$pK_{I\text{ (high)}}$	$pK_{I\text{ (low)}}$	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
Prazosin	9.30 ± 0.15	---	9.83 ± 0.22	---	9.41	9.66	9.63
RS 100329	9.46 ± 0.10	---	10.07 ± 0.55	7.59 ± 0.36	9.60	7.50	7.90
BMY 7378	8.83 ± 0.55	6.19 ± 0.42	9.32 ± 0.81	6.44 ± 0.97	7.04	6.92	8.59
$pK_{I\text{ (high)}}$: sítio de alta afinidade; $pK_{I\text{ (low)}}$: sítio de baixa afinidade. Dados representam a média $\pm$ epm de 3-5 diferentes animais/grupo. *Dados retirados de (Nojimoto <i>et al.</i> , 2010; Williams <i>et al.</i> , 1999b)							

4.4.1.2 Efeitos da castração por orquidectomia por 8 dias na contração do ducto epididimário da CE

Segmentos da CE de ratos controle foram quiescentes durante todo o período de estabilização enquanto que tecidos derivados de animais castrados+VEH apresentaram contrações espontâneas rítmicas de frequência e amplitude variável. O tratamento com DHT preveniu o aparecimento de contrações espontâneas em órgãos de animais castrados (Figura 28A, B e C). A adição cumulativa de noradrenalina ao banho induziu contrações de maneira concentração-dependente em segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento. As contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de animais controle e castrados+DHT foram sustentadas até a administração de concentrações sucessivas de noradrenalina. Segmentos da região distal da CE de ratos castrados contraíram de maneira predominantemente fásica incapazes de serem sustentadas durante administrações sucessivas de noradrenalina (Figura 28D, E e F).

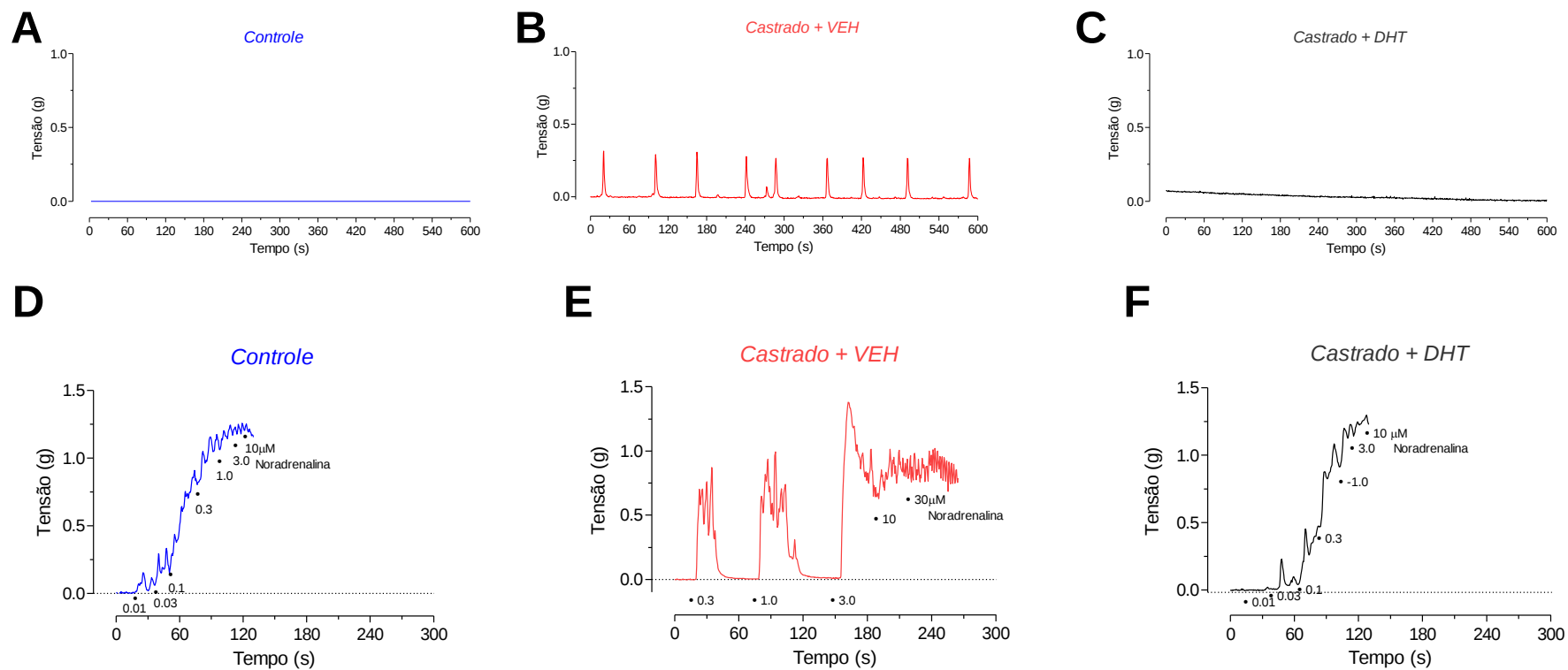


Figura 28. Registros representativos da tensão basal (A, B e C) e das contrações induzidas pela noradrenalina (D, E e F) da CE de ratos controle, castrados+VEH e castrados+DHT.

A castração reduziu a potência da noradrenalina na indução de contrações na CE e este efeito foi prevenido pela administração de DHT a ratos castrados (Figura 29, Tabela 2).

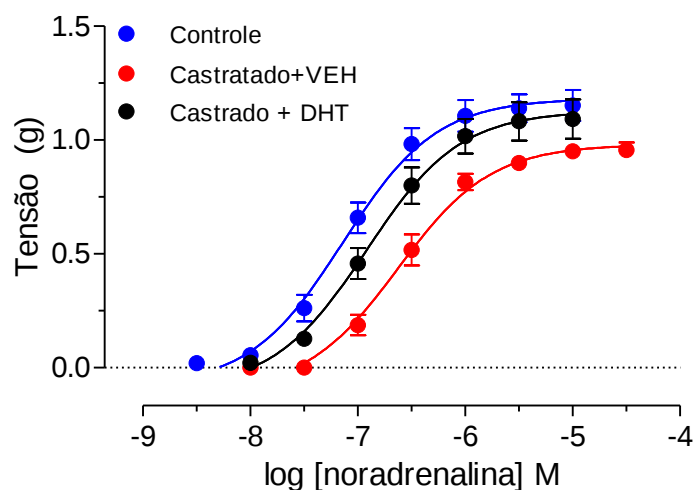


Figura 29. Curvas concentração-resposta médias para as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de ratos controle, castrados+VEH e castrados+DHT. Símbolos representam a média e as barras verticais, quando maiores que os símbolos, o epm de 7-10 segmentos.

O prazosin, RS 100329 e BMY7378 antagonizaram de maneira competitiva as contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos dos grupos controle, castrados+VEH e castrados+DHT (Figura 30). As estimativas de afinidade (pK_B) dos antagonistas pelos α_1 -ARs mediando a contração da CE à noradrenalina nos diferentes grupos de tratamento foram derivadas pela análise do gráfico de Schild e são apresentadas na Tabela 11.

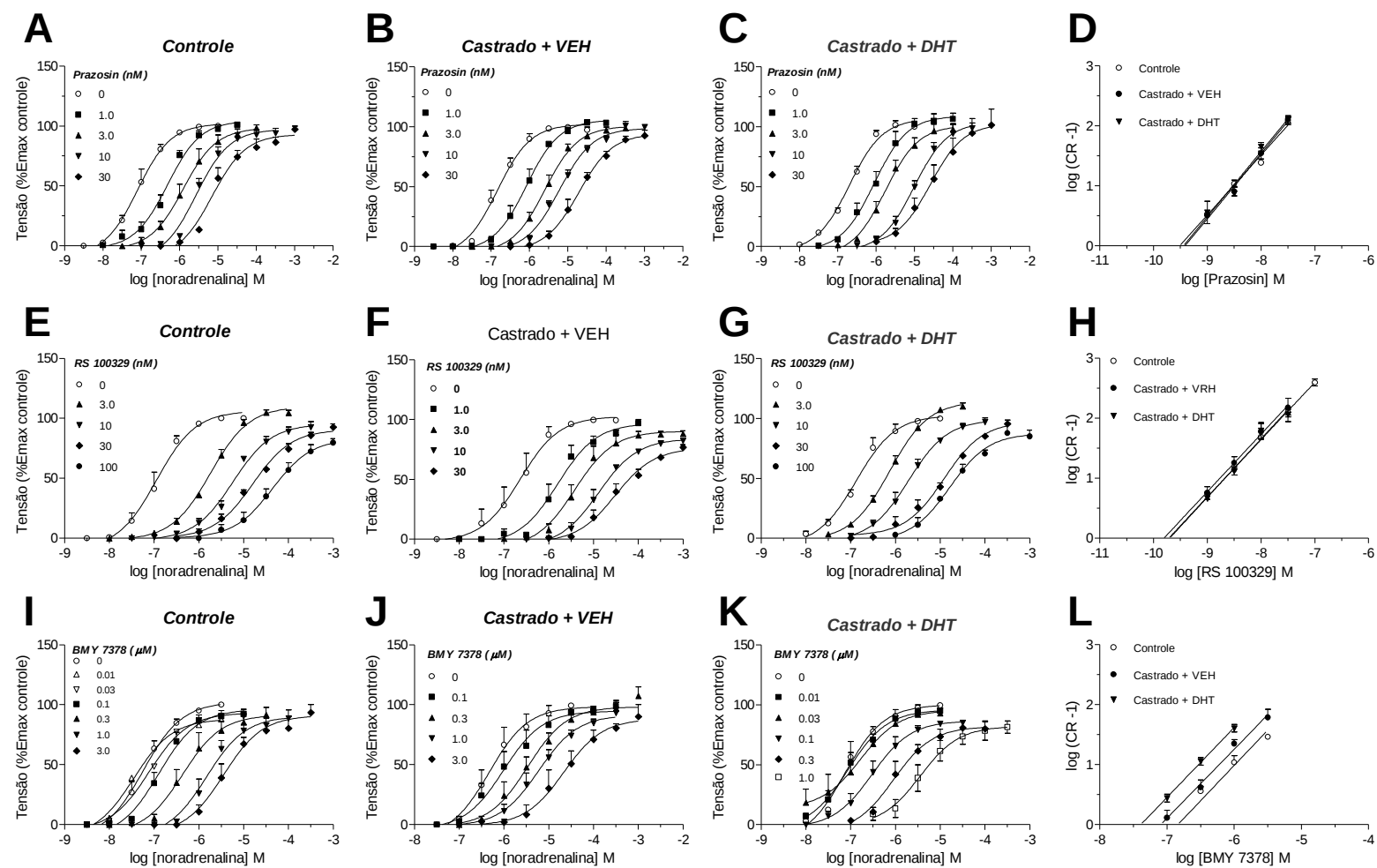


Figura 30. Antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos controle, castrados+VEH e castrados+DHT pelo prazosin (A, B, C), RS 100329 (E, F, G) e BMY7378 (H, I, J). Em (D, H, L) são apresentados os gráficos de Schild para o antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina. Dados representam média±epm de 3-6 diferentes ratos/grupo.

Tabela 11. Estimativas de afinidade (pK_B) do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 determinados a partir da construção de gráficos de Schild do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de animais controle, castrados+VEH e castrados+ DHT. Para comparação também são apresentadas estimativas de afinidade do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 obtidos em experimentos de inibição da ligação do [3H]Prazosin aos receptores humanos clonados e expressos em células HEK 293 ou CHO-K1 (pK_I).

	Controle		Castrado+VEH		Castrado+DHT		pK_I^*		
	pK_B	Inclinação	pK_B	Inclinação	pK_B	Inclinação	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
Prazosin	9.50 ± 0.04	0.99 (0.88- 1.11)	9.50 ± 0.04	1.08 (1.09- 0.94-1.23)	9.55 ± 0.05	1.09 (0.87- 1.31)	9.41	9.66	9.63
RS 100329	9.63 ± 0.02	0.96 (0.88- 1.03)	9.74 ± 0.06	0.96 (0.73- 1.18)	9.66 ± 0.05	0.97 (0.77- 1.17)	9.60	7.50	7.90
BMY 7378	6.97 ± 0.05	1.18 (0.90- 1.46)	7.22 ± 0.06	1.15 (0.93- 1.37)	7.53 ± 0.04	1.17 (0.97- 1.36)	7.04	6.92	8.59
Dados representam a média $\pm$ epm (pK_B) ou média e intervalo com 95% de confiança (inclinação) de 3-6 diferentes animais/grupo. *Dados retirados de (Nojimoto <i>et al.</i> , 2010; Williams <i>et al.</i> , 1999b).									

A alta afinidade do RS 100329 e a baixa afinidade do BMY 7378 no antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos dos três grupos de tratamento demonstram a participação de α_{1A} -ARs, mas não dos α_{1D} , na contração da CE. Portanto, a castração por orquidectomia por 8 dias não foi capaz de alterar o subtipo de α_1 -ARs responsável pela contração da CE de rato.

É conhecido que o fluido intraluminal do ducto epididimário contém grande quantidade de proteína ligadora de andrógenos (ABP) que mantém a concentração de andrógeno em níveis mais elevados que o nível sérico. De fato, oito dias após a castração o ducto epididimário na CE continha quantidade significativa de secreção. Turner e colaboradores demonstraram que são necessários 21 dias para o esvaziamento do ducto epididimário após oclusão dos ductos eferentes (Turner *et al.*, 1971). Juntas, estas observações sugerem que 8 dias de castração seriam insuficientes para a investigação da falta de andrógenos testiculares sobre a contração da CE. Investigamos, portanto, o efeito da castração por orquidectomia bilateral por 30 dias sobre a contração da CE.

4.4.2 Orquidectomia bilateral por 30 dias

Ratos adultos (120 dias de idade) foram distribuídos em quatro grupos: controle (não castrados tratados com veículo), castrados+VEH (castrados por orquidectomia bilateral e tratados com veículo), castrados+E2 (castrados por orquidectomia bilateral e tratados com 17- β -estradiol 20ug/kg) ou castrados+DHT (castrados por orquidectomia bilateral e tratados com diidrotestosterona 5mg/dia). Trinta dias após a castração ou

início do tratamento os ratos dos diferentes grupos foram mortos e as diferentes avaliações realizadas.

A castração ou a combinação de castração e administração de E2 ou DHT não afetaram o peso corpóreo final dos ratos (controle: $452.3 \pm 21.92\text{g}$, castrado+VEH: 420.4 ± 13.71 , castrado+E2: 401.6 ± 16.46 , castrado+DHT: $447.3 \pm 20.83\text{g}$; $p > 0.05$ entre todos os grupos, ANOVA + Tukey). O peso de órgãos do sistema reprodutor masculino dependentes de andrógenos foi significativamente reduzido pela castração e este efeito foi prevenido pela administração de DHT, mas não de E2 (Figura 31).

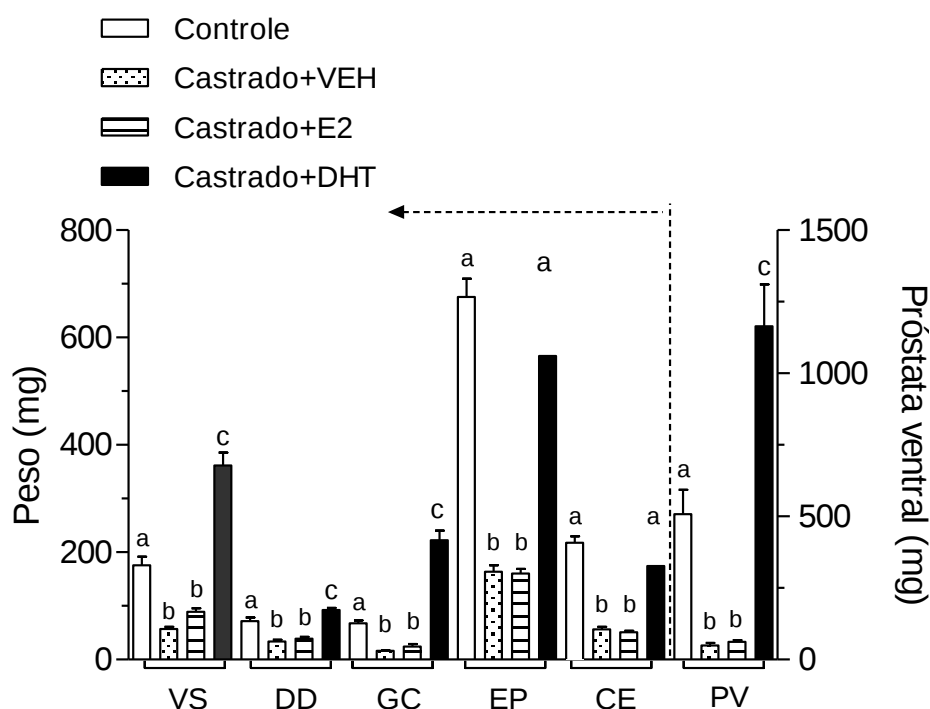


Figura 31. Efeito da castração e administração de E2 ou DHT sobre o peso de órgãos sexuais acessórios de rato. O peso da vesícula seminal sem secreção (VS), ducto deferente (DD), glândula de coagulação (GC), epidídimo (EP), cauda do epidídimo (CE) e do lobo ventral da próstata (PV) são apresentados. Dados representam média±epm de órgãos de 4 a 5 ratos por grupo. O peso médio de cada órgão foi comparado entre os diferentes grupos de tratamento e letras diferentes denotam médias estatisticamente diferentes ($p < 0.05$, ANOVA + Tukey).

4.4.2.1 *Contração da CE de ratos castrados por orquidectomia bilateral por 30 dias*

Segmentos da CE de ratos controle foram quiescentes durante todo o período de equilíbrio sem administração de drogas. Tecidos provenientes de ratos castrados+VEH e castrados+E2 apresentaram contração espontânea de frequência e amplitude variáveis sem qualquer estímulo exógeno. Não foram observadas contrações espontâneas em segmentos da CE de ratos castrados+DHT (Figura 32).

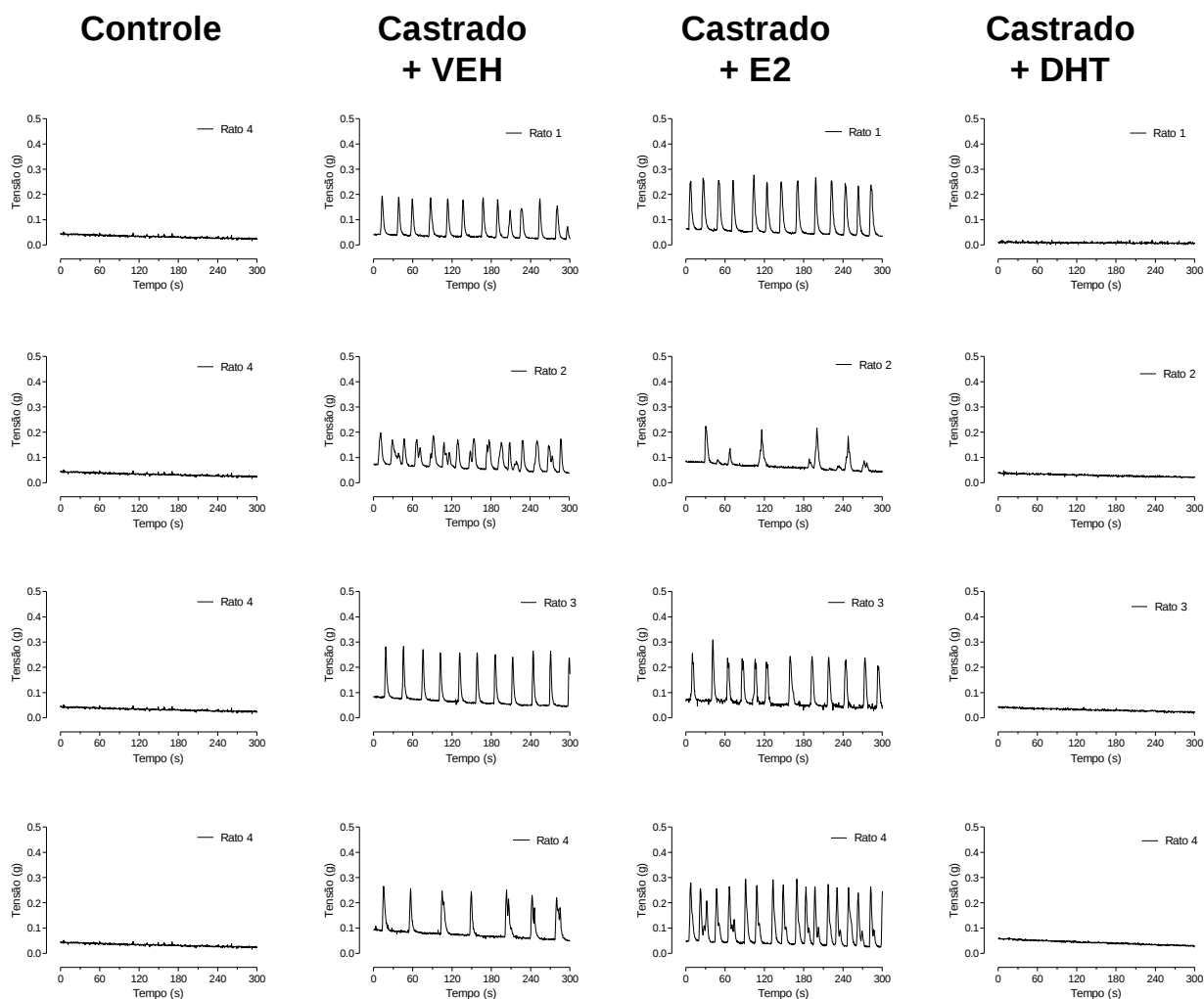


Figura 32. Registro da tensão basal de segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento. Registros representativos de 4 diferentes ratos de cada grupo de tratamento são apresentados.

A noradrenalina induziu contração de maneira concentração-dependente em segmentos da CE distal de ratos de todos os grupos de tratamento. A contração da CE de ratos castrados+VEH foi predominantemente fásica, além disso, a castração reduziu

em 78% a contração máxima induzida pela noradrenalina em segmentos da CE sem alteração da potência da noradrenalina (Figura 33). A contração máxima da CE induzida pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos castrados+DHT foram semelhantes aquela observada em ratos controle. A potência da noradrenalina na CE de ratos castrados+DHT foi aumentada em quatro vezes quando comparada ao grupo controle não castrado. Os efeitos da castração na contração à noradrenalina não foram prevenidos pela administração de E2 a ratos castrados (Figura 33, Tabela 12).

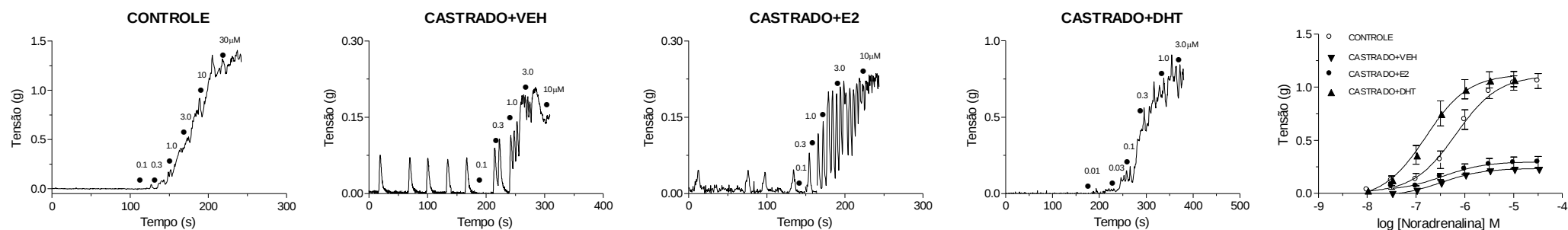


Figura 33. Registros representativos da contração induzida pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento. Pontos representam o instante aproximado da administração de noradrenalina e os números acima dos pontos a concentração final de noradrenalina na cuba. Curvas concentração-resposta médias são apresentadas à direita. Símbolos representam a média e as barras verticais, quando maiores que os símbolos, o epm de 4-6 ratos/grupo.

Tabela 12. Contração máxima (Emax, em gramas de tensão) e potência (pD₂) da noradrenalina na indução de contração na CE de ratos dos diferentes grupos.

	CONTROLE (n=6)	CASTRADO+VEH (n=6)	CASTRADO+E2 (n=6)	CASTRADO+DHT (n=4)
Emax (g)	1.11±0.05 ^a	0.24±0.01 ^b	0.30±0.03 ^b	1.12±0.05 ^a
pD₂	6.18±0.13	6.49±0.17	6.45±0.49	6.80±0.13 [#]
Dados representam média±epm de 4-6 ratos/grupo. *p<0.05 vs CONTROLE (ANOVA+Dunnet a posteriori); [#] p<0.05 vs CONTROLE (teste t de Student). Letras sobrescritas diferentes denotam médias estatisticamente diferentes (p<0.05, ANOVA + Tukey).				

O subtipo de α_1 -ARs responsável pela contração da CE à noradrenalina exógena na CE dos ratos dos diferentes grupos foi investigado utilizando-se os antagonistas seletivos WB 4101 (seletivo $\alpha_{1A/D}$ -ARs), RS 100329 (seletivo α_{1A} -ARs) e BMY 7378 (α_{1D} -ARs). O prazosin, um antagonista seletivo de α_1 -ARs antagonizou de maneira competitiva e com alta potência as contrações à noradrenalina ($pK_B \approx 9.50$ em todos os grupos) demonstrando que sob as condições empregadas a contração à noradrenalina exógena nos diferentes grupos de tratamento é mediada pela ativação de α_1 -ARs (Figura 34 A a D).

O efeito dos antagonistas seletivos nas curvas concentração-resposta à noradrenalina e as estimativas de potência/afinidade dos antagonistas são apresentados na Figura 34 e Tabela 13, respectivamente.

As contrações à noradrenalina foram antagonizadas competitivamente pelo WB 4101 (34F a I) e RS 100329 (34K a N) com alta potência, consistente com a participação de α_{1A} -ARs nas contrações da CE em todos os grupos. O antagonista seletivo de α_{1D} -ARs BMY 7378 antagonizou competitivamente as contrações de segmentos da CE dos grupos controle e castrado+DHT com baixa potência, consistente com o não envolvimento de α_{1D} -ARs nas contrações da CE nestes grupos (Figura 34P e S). No entanto, a contração à noradrenalina nos grupos castrado+VEH e castrado+E2 foram antagonizadas de maneira não competitiva pelo BMY 7378 (Figura 34Q e R). Na tabela 9 apresentamos as estimativas de potência (pA_2) ou afinidade (pK_B) e as inclinações das regressões de Schild dos diferentes antagonistas contra as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento.

Figura 34

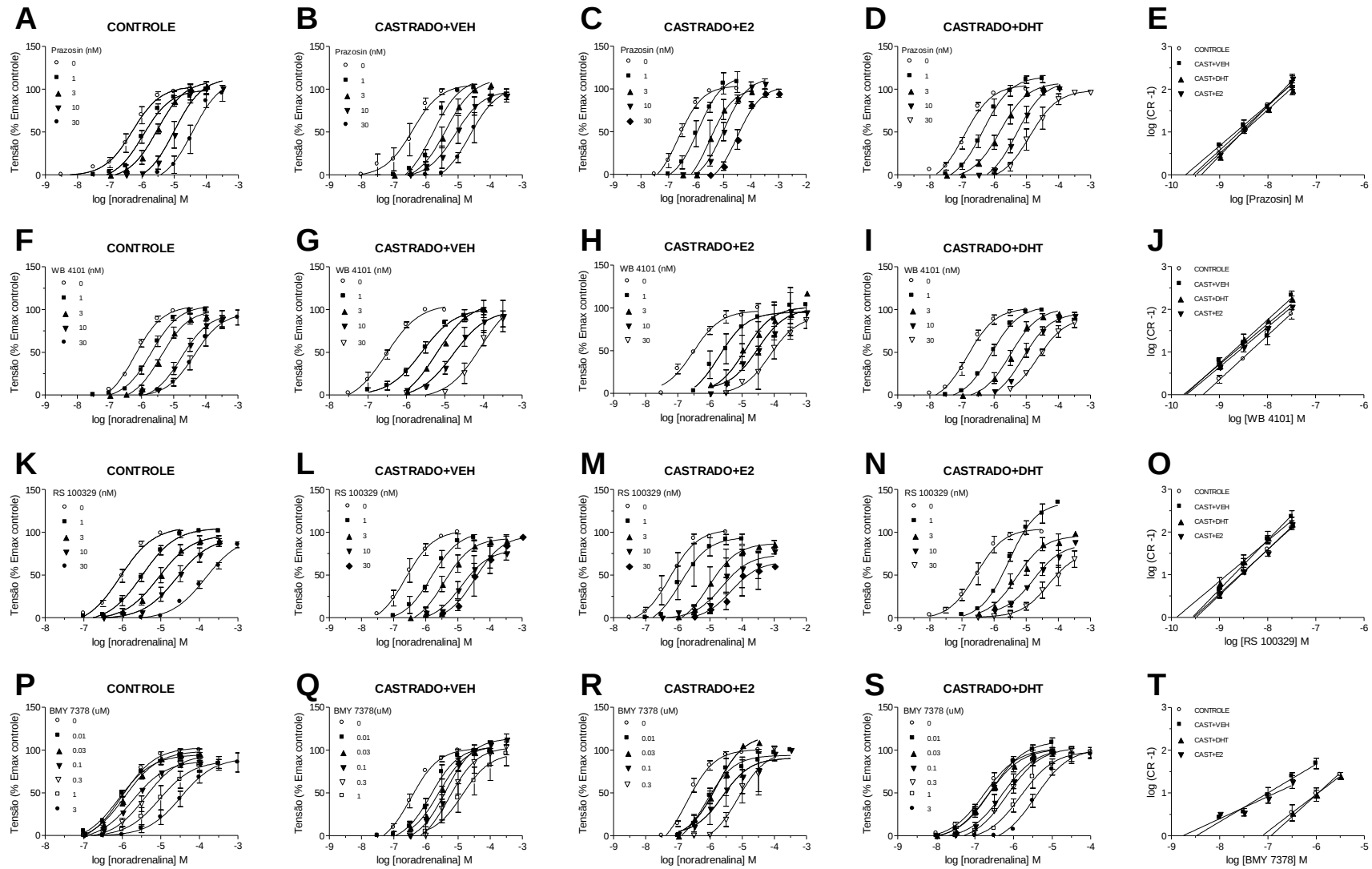


Figura 34. Curvas concentração-resposta à noradrenalina na indução de contração de segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento na presença dos antagonistas competitivos de α_1 -ARs prazosin, RS 100329, WB 4101 e BMY 7378. À direita são apresentados os gráficos de Schild do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da região distal da CE. Símbolos representam a média e as barras verticais o epm obtidos com segmentos de 4-6 ratos/grupo.

Tabela 13. Potências e afinidades dos antagonistas de α_1 -ARs no antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento. Para comparação são apresentadas os valores de afinidade (pK_i) dos diferentes antagonistas nos α_1 -ARs obtidos em experimentos de inibição da ligação do [3 H]prazosin à preparações de membrana de células HEK 293 ou CHO-K1 expressando os receptores α_1 -ARs humanos recombinantes.

	CONTROLE		CASTRADO + VEH		CASTRADO + E2		CASTRADO + DHT	
	pK _B /pA ₂	Inclinação	pK _B /pA ₂	Inclinação	pK _B /pA ₂	Inclinação	pK _B /pA ₂	Inclinação
Prazosin	9.63±0.05	1.00 (0.78-1.21)	9.65±0.05	0.96 (0.76-1.15)	9.58±0.05	1.18 (1.00-1.33)	9.52±0.04	1.02 (0.87-1.17)
WB 4101	9.38±0.04	1.04 (0.88-1.19)	9.76±0.06	0.96 (0.71-1.21)	9.60±0.03	0.94 (0.85-1.03)	9.75±0.04	1.02 (0.88-1.17)
RS 100329	9.54±0.04	1.02 (0.87-1.17)	9.82±0.09	1.09 (0.79-1.52)	9.58±0.04	1.07 (0.91-1.23)	9.81±0.07	0.95 (0.67-1.23)
BMY 7378	7.02±0.05	1.00 (0.80-1.19)	8.44±0.07*	<u>0.67 (0.51-0.83)</u>	8.51±0.06*	<u>0.52 (0.32-0.72)</u>	6.98±0.07	0.90 (0.50-1.28)
pK _I								
	α _{1A}		α _{1B}		α _{1D}			
Prazosin	9.41		9.66		9.63			
WB 4101	9.50		8.20		9.20			
RS 100329	9.60		7.50		7.90			
BMY 7378	7.04		6.92		8.59			
Dados apresentados como média±epm (pK _B /pA ₂) ou média e intervalo com 95% de confiança (Inclinação) de 4-6 ratos/grupo. *pA ₂ calculado com o efeito do BMY 7378 10nM.								

O componente de alta potência do BMY 7378 contra as contrações à noradrenalina na CE de ratos castrados+VEH e castrados+E2 ($pA_2=8.50$) é idêntico à afinidade do BMY 7378 nos adrenoreceptores α_{1D} da aorta de rato ($pK_B=8.47\pm0.03$, $n=4$) e cerca de 100 vezes menor que o pK_B deste antagonista nos α_{1A} -ARs do ducto deferente de rato ($pK_B=6.40\pm0.02$, $n=3$).

Adicionalmente, o BMY 7378 antagonizou com alta potência as contrações da CE de ratos castrados+VEH e castrados+E2 induzidas pela noradrenalina, um agonista não seletivo de α_1 -ARs, porém não afetou as contrações induzidas pelo A61603, um agonista seletivo de adrenoreceptores α_{1A} (Figura 35). A buspirona (agonista seletivo de α_{1D} -ARs não induziu contração em segmentos da CE de nenhum dos grupos de tratamento.

Conclui-se a partir dos resultados dos experimentos de castração e reposição hormonal que os andrógenos possuem papel preponderante na regulação da plasticidade dos α_1 -ARs mediando contração da CE de rato.

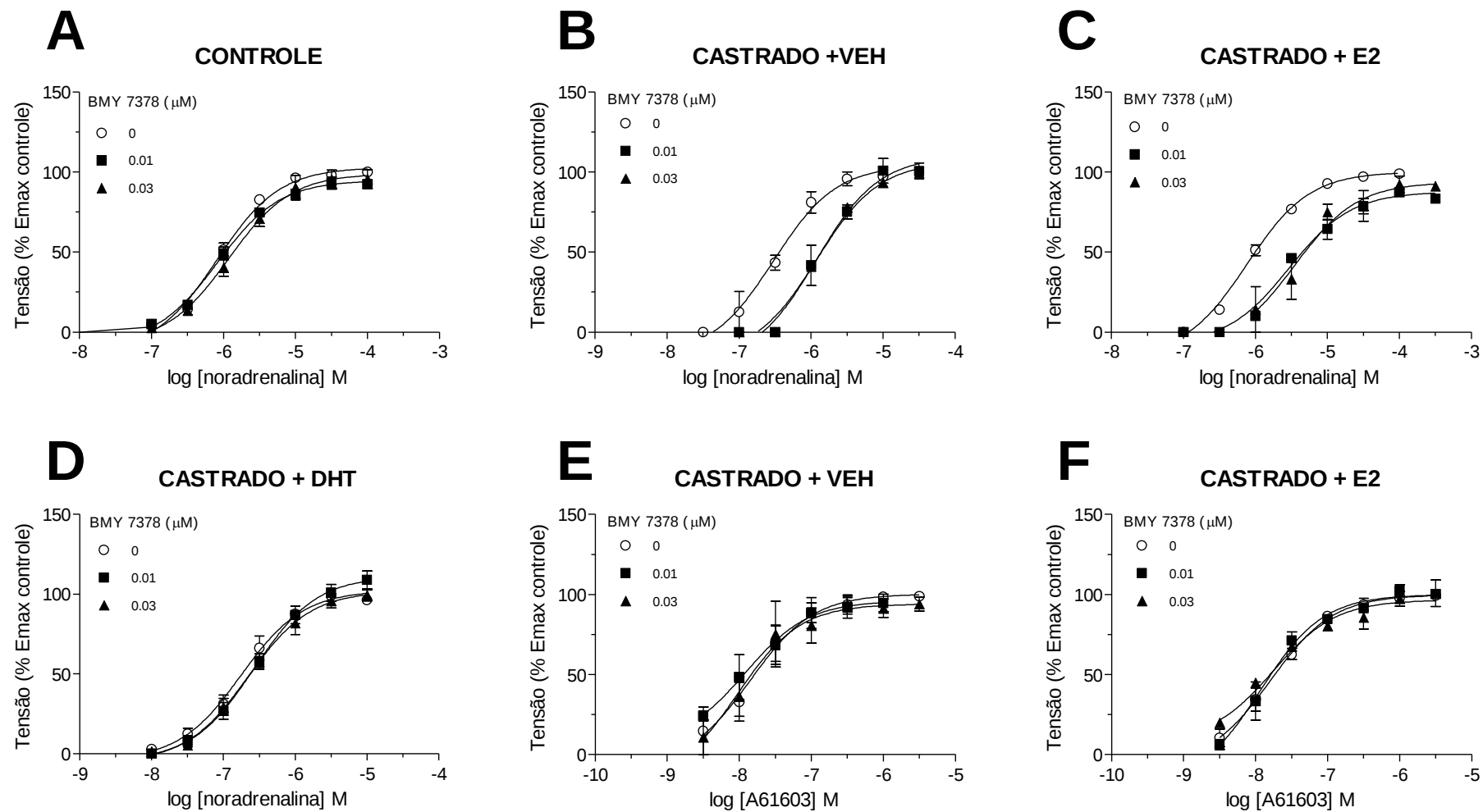


Figura 35. Efeito do antagonista seletivo de α_{1D} -ARs BMY 7378 sob as curvas concentração-resposta à noradrenalina (A, B, C e D) ou ao A61603 (E e F) em segmentos da CE de ratos dos diferentes grupos de tratamento. Símbolos representam a média e as barras verticais o epm de 3 ratos/grupo.

O papel dos andrógenos na regulação da plasticidade dos α_1 -ARs mediando contração da CE foi investigado adicionalmente utilizando ratos jovens (50-60 dias de idade) como outro modelo experimental. Os níveis de transcritos do α_{1A} -ARs na CE são elevados na transição entre ratos jovens (60 dias de idade) a adultos (120 dias de idade) e este efeito é observado após o estabelecimento dos níveis adultos de testosterona próximo aos 60 dias (Queiroz *et al.*, 2002). Estas observações nos levaram a investigar o papel do andrógeno na regulação do subtipo de α_1 -ARs mediando contração da CE de ratos jovens.

4.4.3 Contratilidade da CE de ratos jovens

4.4.3.1 Contratilidade da CE de ratos jovens tratados com veículos

Segmentos da CE de ratos jovens (53-60 dias de idade) não apresentaram contração espontânea. As contrações à noradrenalina foram antagonizadas com alta potência pelo RS 100329 ($pA_2: 9.63 \pm 0.13$, $n=4$) e pelo BMY 7378 (pA_2 controle: 8.31 ± 0.04 , $n=4$) demonstrando a participação dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs. O L-765,314 possui baixa potência contra as contrações induzidas pela noradrenalina ($pA_2: 6.68 \pm 0.18$, $n=4$) excluindo a participação dos α_{1B} -ARs (Figura 36).

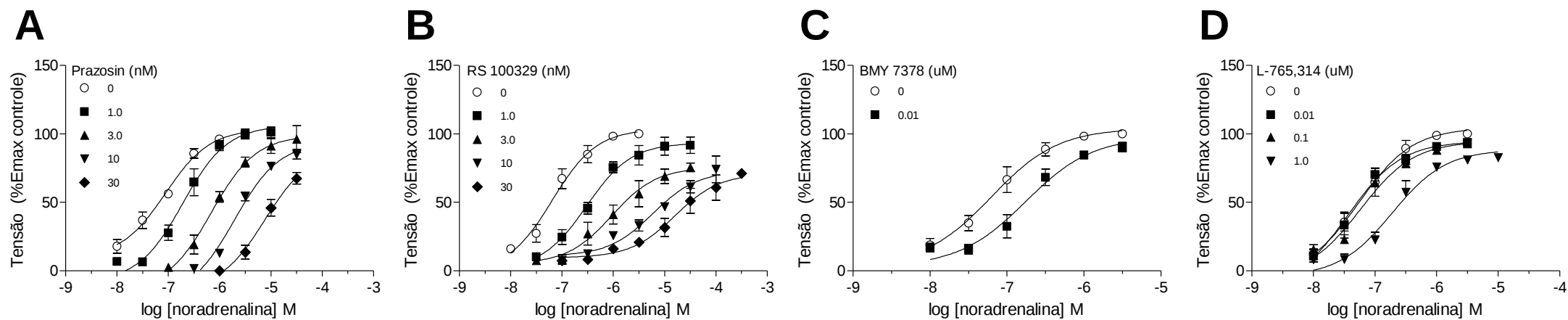


Figura 36. Antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos jovens (53-61 dias de idade) tratados com veículo pelo prazosin (A), RS 100329 (B), BMY 7378 (C) ou L-765,314 (D). Dados representam média±epm de 4 diferentes ratos por grupo.

O efeito dos andrógenos nos subtipos de α_1 -ARs mediando contração da CE foi investigado através da administração de DHT (5mg/dia/7dias) a um grupo separado de ratos jovens.

O peso corpóreo de ratos jovens tratados com DHT foi significativamente reduzido ao final do período de tratamento quando comparado aos ratos tratados com veículo (DHT: $284.50 \pm 11.20g$, $n=4$ vs veículo: $327.30 \pm 7.98g$, $n=6$; $p<0.05$, teste t de student). Adicionalmente, o tratamento com DHT aumentou significativamente o peso de órgãos dependentes de andrógeno do sistema reprodutor masculino (Figura 37). O peso do epidídimo não foi alterado pelo tratamento com DHT, porém o peso da CE foi significativamente reduzido quando comparado aos ratos tratados com veículo.

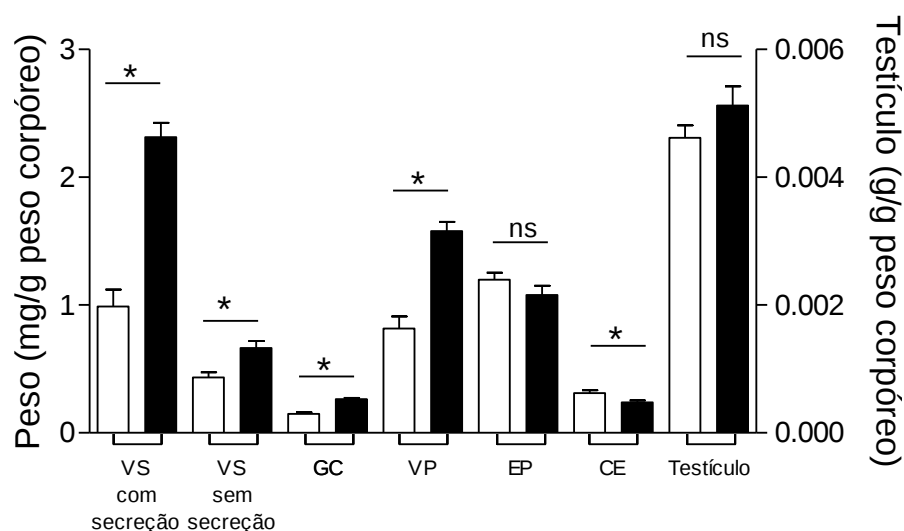


Figura 37. Peso relativo de órgãos andrógeno-dependentes de ratos jovens (53-60 dias de idade) tratados com veículo (0.3ml/dia/7dias, sc) ou DHT (5mg/dia/7dias, sc). O peso da vesícula seminal (VS), glândula de coagulação (GC), lobo ventral da próstata (VP), epidídimo inteiro (EP), cauda do epidídimo (CE) e testículo foram normalizados ao peso corpóreo. Valores médios representam peso de órgãos ÚNICOS. Dados representam média±epm de órgãos de 5-6 ratos tratados com veículo ou 4 ratos tratados com DHT. ns: não significativo ($p > 0.05$, teste t de student); * $p < 0.05$ (teste t de student).

4.4.3.2 Efeito do tratamento com andrógeno na contratilidade da CE de ratos jovens

A noradrenalina induziu contrações de maneira concentração-dependente em segmentos da CE de ratos jovens tratados com DHT com potência similar ao grupo controle ($pD_{2 \text{ veículo}}: 7.15 \pm 0.08$ vs $pD_{2 \text{ DHT}}: 7.26 \pm 0.14$; $p > 0.05$, teste t de student). A contração máxima induzida pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos tratados com DHT foi reduzida ($E_{\text{max}} \text{ controle}: 0.71 \pm 0.02\text{g}$, $n=16$ vs $E_{\text{max}} \text{ DHT}: 0.62 \pm 0.02\text{g}$, $n=15$; $p < 0.05$, teste t de student) (Figura 38).

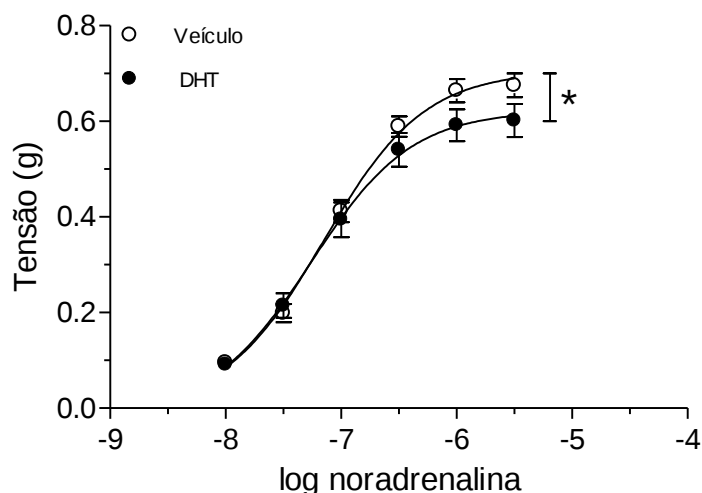


Figura 38. Curvas concentração-resposta para noradrenalina na CE de ratos jovens tratados com veículo ou DHT (5mg/dia/7 dias). Dados representam média±epm de 16 segmentos de 6 diferentes ratos (veículo) ou 15 segmentos de 4 diferentes ratos (DHT). * $p < 0.05$ (teste t de student).

Na Figura 39 apresentamos o efeito dos antagonistas seletivos prazosin, RS 100329, BMY 7378 e L-765,314 sobre as contrações induzidas pela noradrenalina na CE de ratos jovens tratados com DHT (5mg/dia/7dias).

As contrações à noradrenalina da CE de ratos tratados com DHT foram antagonizadas de maneira intransponível pelo RS 100329. A potência do RS 100329 na CE de ratos tratados com DHT foi semelhante à observada em tecidos dos ratos tratados com veículo (pA_2 controle: 9.63 ± 0.13 , $n=4$ vs pA_2 DHT: 9.54 ± 0.06 , $n=4$; $p > 0.05$, teste t de student) e consistente com a participação de adrenoreceptores α_{1A} nas contrações induzidas pela noradrenalina. O BMY 7378 10nM não antagonizou as contrações à noradrenalina na CE de ratos tratados com DHT. O antagonista seletivo α_{1B} antagonizou com baixa potência a contração à noradrenalina ($pA_2 = 6.79 \pm 0.09$, $n=3$).

A ordem de potência dos antagonistas demonstra a participação dos α_{1A} -ARs, mas não do α_{1D} -ARs, na contração da CE de ratos jovens tratados com DHT.

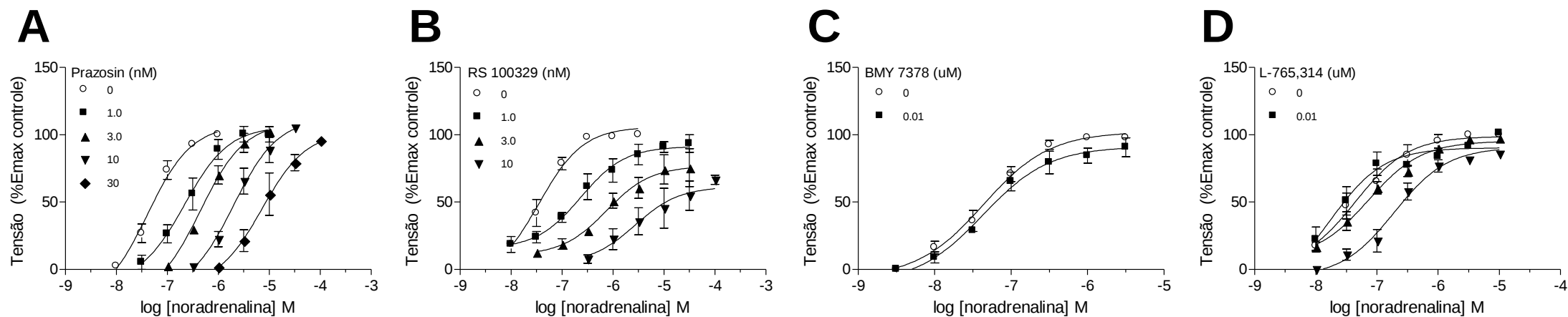


Figura 39. Antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em segmentos da CE de ratos jovens tratados com DHT (5mg/dia/7dias) pelo prazosin (A), RS 100329 (B), BMY 7378 (C) ou L-765,314 (D). Dados representam média $\pm$ epm de 4 diferentes ratos por grupo.

5. Discussão

A presente tese investigou: 1) a participação dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs na contração da CE de rato; 2) a heterodimerização entre os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs humanos recombinantes expressos em sistemas heterólogos e 3) a modulação androgênica e estrogênica da expressão dos subtipos de α_1 -ARs envolvidos na contração da CE;

Experimentos de competição da ligação do [3 H]Prazosin mostraram que a CE expressa α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs em densidades semelhantes. A existência de uma população heterogênea de receptores composta por α_{1A} e α_{1D} -ARs foi demonstrada pelo ligante seletivo α_{1D} BMY 7378 (seletividade α_{1A}/α_{1D} de $\cong 30$ vezes), mas não com o RS 100329, um ligante seletivo α_{1A} que possui seletividade α_{1A}/α_{1D} de $\cong 50$ vezes. Este fato intrigante não é uma característica específica do RS 100329, uma vez que resultados prévios do laboratório mostraram que o 5-metilurapidil, um outro ligante seletivo α_{1A} inibiu a ligação específica do [3 H]Prazosin na CE de maneira monofásica com afinidade consistente com a interação com α_{1A} -ARs sem evidência para a existência de α_{1D} -ARs (Pacini, ESA; Dissertação Mestrado, 2012). É interessante observar que em experimentos de competição pelo *binding* do radioligante [3 H]Prazosin o RS 100329 foi capaz de detectar uma população heterogênea de α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs do ducto deferente de ratos submetidos à simpatectomia pela 6-OH-dopamina (Cleary *et al.*, 2004). Porém, o RS 100329 demonstrou a presença de α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs em experimentos de competição pelo *binding* do [3 H]Prazosin na CE de ratos castrados. Estas observações indicam que a incapacidade do RS 100329 discriminar a população heterogênea dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs expressos na CE (em ratos controle não castrados) é uma característica do tecido estudado e não do RS 100329.

A participação dos α_{1A} -ARs nas contrações da CE foi prontamente demonstrada utilizando agonistas e antagonistas seletivos. Recentemente, foi demonstrado que os α_{1A} -ARs nativos do ducto deferente e artéria caudal do rato e os α_{1A} -ARs humanos recombinantes são dessensibilizados pela oximetazolina (Akinaga *et al.*, 2013). No ducto deferente e artéria caudal a dessensibilização dos α_{1A} -ARs pela oximetazolina foi acompanhada por intensa taquifilaxia das contrações. No entanto, não foi observada taquifilaxia das contrações da CE à oximetazolina. A taquifilaxia das respostas à oximetazolina mediadas pela ativação de α_{1A} -ARs é dependente da fosforilação pela GRK2 (Akinaga *et al.*, 2013); assim, a ausência de taquifilaxia na CE poderia resultar da ausência da GRK2 na CE. Entretanto, a GRK2 é ubiquamente expressa (Aragay *et al.*, 1998; Evron *et al.*, 2012) e o mRNA para a GRK2 é expresso no epidídimo, particularmente no segmento inicial e na CE (<http://mrgd.org/index.cgi>; Mammalian Reproductive Genetics Database, University of Washington).

O BMY 7378, um antagonista seletivo de alta afinidade dos α_{1D} -ARs (Goetz *et al.*, 1995), não identificou este subtipo de receptor na contração da CE de ratos não castrados, embora tenha detectado a expressão dos α_{1D} -ARs em experimentos de binding do radioligante [3 H]Prazosin. O papel dos α_{1D} -ARs na contração da CE foi evidenciado utilizando-se a cloroetilclonidina, um agente alquilante que inativa irreversivelmente com maior velocidade os α_{1B} - e α_{1D} -ARs do que os α_{1A} -ARs (Xiao *et al.*, 1998). A ação da cloroetilclonidina na contração da CE se deve à inativação de α_{1D} -ARs já que seu efeito inibitório na contração foi prevenido pelo BMY 7378 em uma concentração que ocupa seletivamente este subtipo. Além disso, a participação dos α_{1B} -ARs não foi detectada utilizando-se o antagonista seletivo α_{1B} L-765,314 ou o WB 4101, um antagonista seletivo $\alpha_{1A/D}$ capaz de demonstrar a participação de α_{1B} -ARs na

contração da cápsula testicular de rato e no ducto deferente de ratos castrados (Jurkiewicz *et al.*, 2006; Pupo, 1998).

No entanto, a participação dos α_{1D} -ARs na contração da CE não foi observada quando o antagonista irreversível empregado no protocolo de proteção foi a fenoxibenzamina, que inativa não seletivamente os três subtipos de α_1 -ARs. Em princípio, era esperado que o BMY 7378 protegesse parte dos α_1 -ARs da CE da inativação produzida pela fenoxibenzamina, uma vez que α_{1D} -ARs participam da contração deste tecido em resposta à noradrenalina. Além disso, na mesma concentração empregada nos experimentos de proteção na CE, o BMY 7378 preveniu a inativação dos α_{1D} -ARs da aorta torácica de rato pela fenoxibenzamina, indicando sua efetividade na proteção destes receptores.

De modo surpreendente, a inativação dos α_{1D} -ARs reduziu a contração da CE de rato mesmo quando as contrações ao agonista exógeno foram induzidas pelo A61603, um agonista seletivo de α_{1A} -ARs. Portanto, os resultados dos experimentos de contração demonstram uma interação complexa entre os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs na contração da CE de rato. Ao menos três hipóteses devem ser consideradas para explicar essas observações: 1) a contração da CE de rato pode resultar da soma do estímulo gerado pela ativação concomitante dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs pelos agonistas exógenos testados; 2) a contração da CE de rato desencadeada pela ativação dos α_{1A} -ARs pode ser aumentada por α_{1D} -ARs constitutivamente ativos; 3) a contração da CE é mediada por heterodímeros entre os α_{1A} e α_{1D} . As três hipóteses serão discutidas adiante.

Os três subtipos de α_1 -ARs ativam proteínas G da família q/11 com conseqüente ativação da fosfolipase C β , formação de trisfosfato de inositol (IP $_3$) e diacilglicerol e

aumento nos níveis de cálcio intracelular livre (Zhong *et al.*, 1999). Dessa maneira, a ativação concomitante dos diferentes subtipos em uma população heterogênea de α_1 -ARs por agonistas não-seletivos pode resultar em respostas provenientes do *cross-talk* das vias de sinalização de cada receptor ativado isoladamente. Este fenômeno de *cross-talk* foi demonstrado em células HEK 293 co-expressando os α_{1A} -ARs e α_{1B} -ARs recombinantes humanos (Israilova *et al.*, 2004) e pode ser observado na contração de tecidos que expressam mais de um subtipo de α_1 -ARs (Jurkiewicz *et al.*, 2006; Kamikihara *et al.*, 2005; Taki *et al.*, 2004). Porém, modulação dos α_{1A} -ARs pelos α_{1D} -ARs na contração da CE de rato também foi demonstrada quando o A61603, um agonista seletivo de α_{1A} -ARs foi empregado. Diferentemente da noradrenalina, o A61603 não ativou α_{1D} -ARs da população heterogênea de α_{1A} e α_{1D} na CE de ratos castrados por 30 dias. Deste modo, parece seguro sugerir que as contrações induzidas pelo A61603 na CE não envolvem a ativação dos α_{1D} -ARs e que a interação entre α_{1A} - e α_{1D} -ARs demonstrada neste estudo não resulta da soma do estímulo gerado pela ativação concomitante dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs pelos agonistas exógenos.

Também cabe considerar um possível *cross-talk* entre os α_{1A} -ARs ativados pelo agonista exógeno e a sinalização de uma população hipotética de α_{1D} -ARs constitutivamente ativos na CE. De fato, os α_{1D} -ARs recombinantes podem apresentar atividade constitutiva com conseqüente aumento da síntese de fosfoinosítídeos e elevação dos níveis de cálcio intracelular livre, ativação de ERK além da associação com a β -arrestina 1 (Garcia-Sainz *et al.*, 1999a; McCune *et al.*, 2000; Perez-Aso *et al.*, 2013). Ainda, estudos de contração da aorta de rato forneceram a primeira evidência experimental para a existência de α_{1D} -ARs nativamente expressos com atividade

constitutiva levando a aumento da síntese de fosfoinosítídeos e contração da musculatura lisa deste tecido (Gisbert *et al.*, 2000).

Na presença de α_{1D} -ARs constitutivamente ativos na CE, o estímulo gerado pela ativação dos α_{1A} -ARs pelos agonistas exógenos se somaria ao estímulo da sinalização constitutiva dos α_{1D} -ARs produzindo, desta forma, contrações de maior magnitude. Assim, a redução na contração induzida pelos agonistas exógenos via α_{1A} -ARs após a inativação dos α_1 -ARs pela CEC resultaria da diminuição da intensidade do estímulo gerado pela menor quantidade de α_{1D} -ARs constitutivamente ativos.

A ativação constitutiva dos α_{1D} -ARs também poderia estar envolvida na ausência de taquifilaxia das contrações da CE à oximetazolina. Como citado anteriormente, a dessensibilização e internalização dos α_{1A} -ARs pela oximetazolina depende da fosforilação dos α_{1A} -ARs pela GRK2 (Akinaga *et al.*, 2013). Entretanto, é sabido que para a maioria dos GPCRs a fosforilação pelas GRKs é somente o primeiro passo do processo de dessensibilização, o qual envolve ainda o recrutamento das β -arrestinas com conseqüente redução do acoplamento à proteínas G e internalização dos receptores (Walther *et al.*, 2013). Portanto, a ação conjunta de GRKs e β -arrestinas desempenha um papel crucial no processo de dessensibilização de GPCRs. Os α_1 -ARs recombinantes constitutivamente ativos recrutam de maneira constitutiva a β -arrestina 1 (McCune *et al.*, 2000). Nesta situação, o seqüestro das β -arrestinas livres pela associação com os α_{1D} -ARs constitutivamente ativos poderia reduzir o nível de β -arrestinas disponíveis para interação com os α_{1A} -ARs impedindo a dessensibilização pela oximetazolina e a taquifilaxia das contrações da CE. Evidência experimental recente demonstra a operação deste mecanismo de regulação da sinalização de GPCRs.

A co-expressão de receptores CXCR7 reduz o recrutamento de β -arrestina2 pelo receptor CXCR4 e este efeito pode ser atenuado pelo aumento da disponibilidade de β -arrestina através da expressão da β -arrestina recombinante (Coggins *et al.*, 2014).

Embora a farmacologia complexa observada para os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs da CE possa ser adequadamente descrita pelo quadro acima, a ausência de efeito de baixas concentrações de BMY 7378 (10 e 30nM) nas contrações à noradrenalina ou A61603 enfraquecem a hipótese de interação entre α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs constitutivamente ativos na contração da CE. O BMY 7378 se comporta como um agonista inverso na produção de fosfoinosítídeos por α_{1D} -ARs e inibe a contração da aorta de rato induzida pelos α_{1D} -ARs constitutivamente ativos com alta potência ($pIC_{50} \approx 9.0$) (Gisbert *et al.*, 2000). Entretanto, na CE de rato o BMY 7378 10 e 30nM (10-30x pIC_{50} na aorta de rato) não afetou as contrações induzidas pelo A61603 ou noradrenalina. Caso o BMY 7378 (10 e 30nM) atuasse como agonista inverso, a sinalização constitutiva dos α_{1D} -ARs seria reduzida e ele deveria produzir efeitos funcionais semelhantes aos da CEC, ou seja, reduzir as contrações da CE aos agonistas exógenos. Ainda mais, a incapacidade do BMY 7378 proteger os α_1 -ARs da CE da inativação pela fenoxibenzamina argumenta contra a existência do cross-talk proveniente da ativação de α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs, sejam estes α_{1D} -ARs constitutivamente ativos ou não.

A dimerização de GPCRs é um evento bem estabelecido e capaz de alterar a função e a farmacologia dos receptores (Bouvier, 2001; Rios *et al.*, 2001; Terrillon *et al.*, 2004). Homodímeros/homo-oligômeros dos três α_1 -ARs e heterodímeros entre α_{1A}/α_{1B} -ARs e α_{1B}/α_{1D} -ARs já foram caracterizados em sistemas heterólogos de expressão

(Lopez-Gimenez *et al.*, 2007; Pupo *et al.*, 2003; Uberti *et al.*, 2003; Vicentic *et al.*, 2002).

Experimentos de co-imunoprecipitação foram incapazes de detectar heterodímeros entre α_{1A}/α_{1D} , apesar de demonstrarem a heterodimerização entre α_{1A}/α_{1B} e α_{1B}/α_{1D} (Uberti *et al.*, 2003). Na presente tese, foram detectados heterodímeros α_{1A}/α_{1D} em experimentos de BRET empregando receptores α_{1A} -Rluc8 e α_{1D} -eGFP ou $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -eGFP. Resultados conflitantes a respeito da dimerização entre receptores não são incomuns (AbdAlla *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2009; Mustafa *et al.*, 2012; Trettel *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005). A incapacidade de detectar o heterodímero α_{1A}/α_{1D} nos estudos de Uberti e colaboradores (2003) poderia estar relacionada ao rompimento de interações importantes entre os receptores α_{1A}/α_{1D} durante o procedimento de solubilização das proteínas de membrana para posterior co-imunoprecipitação. De fato, o aumento da estabilidade de complexos protéicos por meio da exposição das células ou membranas a agentes químicos que estabelecem ligações cruzadas (*crosslinking*) entre proteínas antes do processo de solubilização facilita a visualização de dímeros ou oligômeros de GPCRs em experimentos de co-imunoprecipitação (Angers *et al.*, 2000; Cvejic *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2008).

Em contraste aos experimentos de co-imunoprecipitação, o ensaio de BRET utilizado neste estudo permitiu a investigação de interações proteína/proteína no ambiente nativo da membrana, de modo que interações de curta duração podem ser detectadas mais eficientemente (Bouvier, 2001). Estudos recentes empregando visualização em tempo real dos receptores na membrana de células intactas mostraram que a dimerização de GPCRs é um processo dinâmico, no qual monômeros e dímeros associam-se e dissociam-se com taxas na escala de segundos, fortalecendo dessa

maneira o uso do BRET para a detecção destas interações de curta duração (Hern *et al.*, 2010; Kasai *et al.*, 2011).

Evidências bioquímicas, de microscopia e de simulações computacionais indicaram que uma única proteína G heterotrimérica é recrutada por dímero de GPCR (Baneres *et al.*, 2003; Filipek *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2013; Jastrzebska *et al.*, 2013). Estas observações em conjunto com resultados experimentais demonstrando que a ativação de um único protômero dos dímeros de GPCRs é capaz de recrutar proteínas G deram origem à hipótese de funcionamento assimétrico de dímeros de GPCRs (Maurice *et al.*, 2011). De fato, simulações computacionais propõem que devido ao tamanho das proteínas G heterotriméricas o acoplamento de duas proteínas G exige tetrâmeros de GPCRs, ou seja, dois pares de receptores diméricos (Filipek *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2013).

A simulação computacional do acoplamento da proteína G_t à estrutura do dímero de rodopsina propôs que resíduos de aminoácidos de ambos protômeros contribuem para a interação como a proteína G_t , porém, o domínio de ativação da proteína G (domínio Ras-like) interage somente com um dos protômeros do dímero sugerindo dominância de um dos protômeros no processo de ativação da proteína G. Esta hipótese é corroborada por resultados experimentais. A ativação de proteínas Gs por receptores dopaminérgicos D1 no heterodímero D1/D2 é inibida por antagonistas seletivos D1 mas não é afetada por um antagonista D2. O inverso é verdadeiro, já que o recrutamento de proteínas G_i pelo receptor D2 no heterodímero D1/D2 não é inibido por um antagonista D1 (Urizar *et al.*, 2011). A produção de fosfoinosítídeos induzida pela noradrenalina via ativação do receptor α_{1A} no heterodímero $\alpha_{1A}/CXCR2$ é inibida pelo antagonista de

adrenoceptores α_1 terazosin, mas não é afetada pelo antagonismo de receptores CXCR2 (Mustafa *et al.*, 2012).

Com base nas observações acima, a interação funcional entre os receptores α_{1A} e α_{1D} na contração da CE de rato em resposta a agonistas exógenos seria consistente com o envolvimento de um heterodímero α_{1A}/α_{1D} . Nesta hipótese, a ativação de vias de sinalização que culminam na contração da CE (provavelmente através de proteínas $G_{q/11}$) deve resultar da ativação do receptor α_{1A} devido aos perfis de potência dos agonistas e antagonistas nas contrações. A ausência de efeito do antagonismo do receptor α_{1D} (BMY 7378 10-30nM) é análoga à situação demonstrada por Urizar e colaboradores (2011) e Mustafa e colaboradores (2012) na qual o recrutamento de proteínas G por um dos protômeros não é afetado por um antagonista neutro do outro protômero do dímero. Han e colaboradores (2009) demonstraram que a inativação de um dos protômeros de um dímero de GPCRs através de mutação sítio dirigida reduz significativamente a capacidade do protômero não mutado ativar proteínas G. Desta forma, a inativação dos receptores α_{1D} no dímero α_{1A}/α_{1D} pela cloroetilclonidina reduziria a eficiência do recrutamento ou ativação de proteínas $G_{q/11}$ pelo receptor α_{1A} .

A utilização de dois agentes alquilantes de seletividade distinta possibilitou a elaboração de uma hipótese a respeito da dominância entre os protômeros α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs do putativo heterodímero α_{1A}/α_{1D} -ARs da CE. É sabido que a CEC inativa os três subtipos de α_1 -ARs; porém, a taxa de inativação dos α_{1A} -ARs é cerca de sete vezes mais lenta que aquela dos α_{1B} -ARs e α_{1D} -ARs (Xiao *et al.*, 1998). Quando a CE foi exposta à CEC, houve alquilação preferencial dos receptores α_{1D} -ARs já que este efeito

foi prevenido pelo BMY 7378. Nesta situação a função do dímero foi preservada visto que os α_{1A} -ARs não foram inativados (Figura 40).

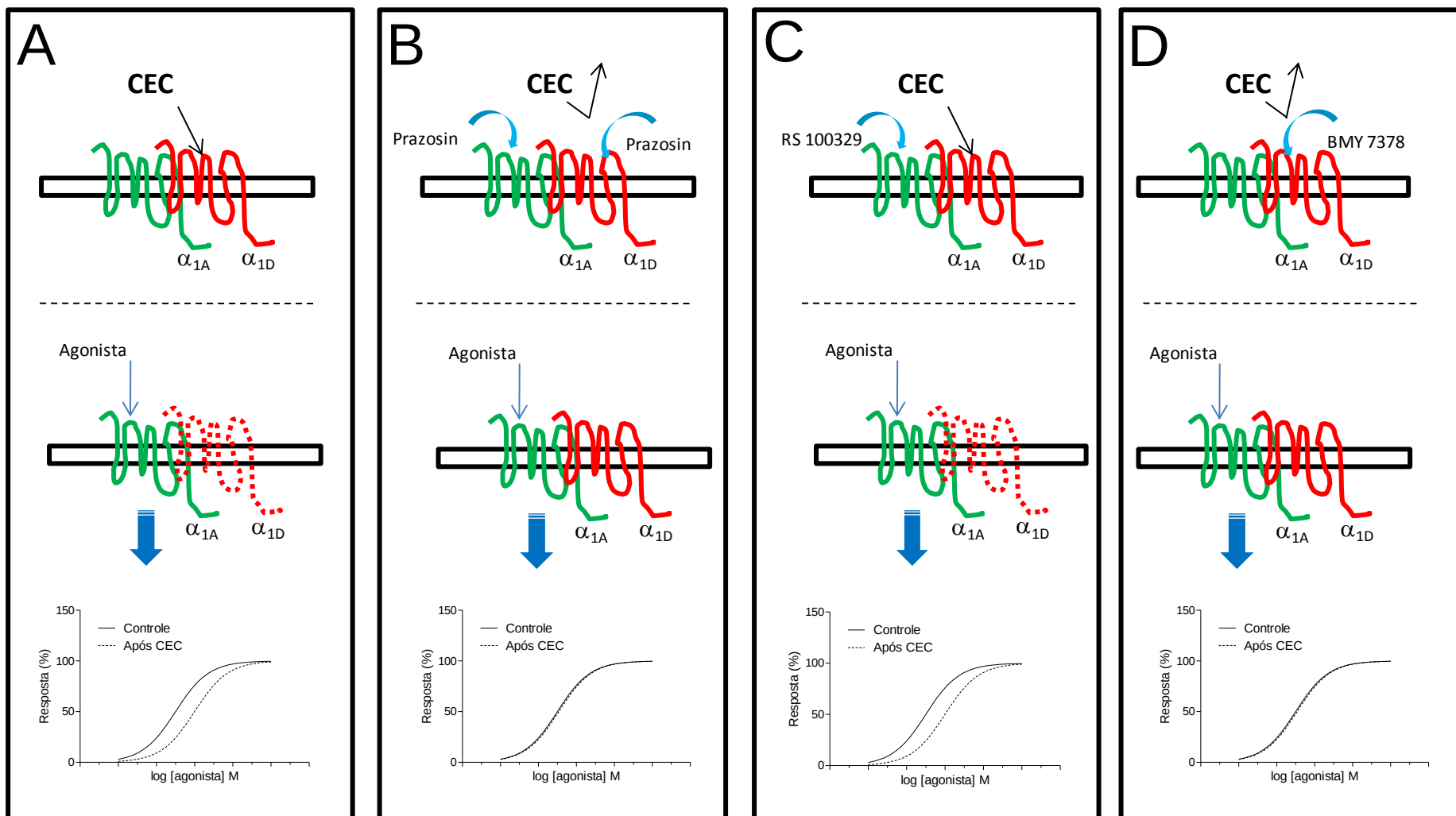


Figura 40. Hipótese para os efeitos funcionais da CEC nas contrações da CE de rato.

A exposição da CE à PBZ inativa os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs de maneira não seletiva. Portanto, a proteção dos α_{1D} -ARs não impede a inativação dos α_{1A} -ARs e conseqüentemente provoca a perda de função do dímero, razão pela qual não detectamos proteção pelo BMY 7378 sozinho. O RS 100329 confere proteção do α_{1A} -ARs e conseqüentemente protege contra a inativação pela PBZ (Figura 41). Estes resultados demonstram a dominância do protômero α_{1A} -ARs do heterodímero na ativação da proteína $G_{q/11}$, explicando desta forma a ordem de potência dos agonistas e antagonistas nas contrações da CE (Figura 41).

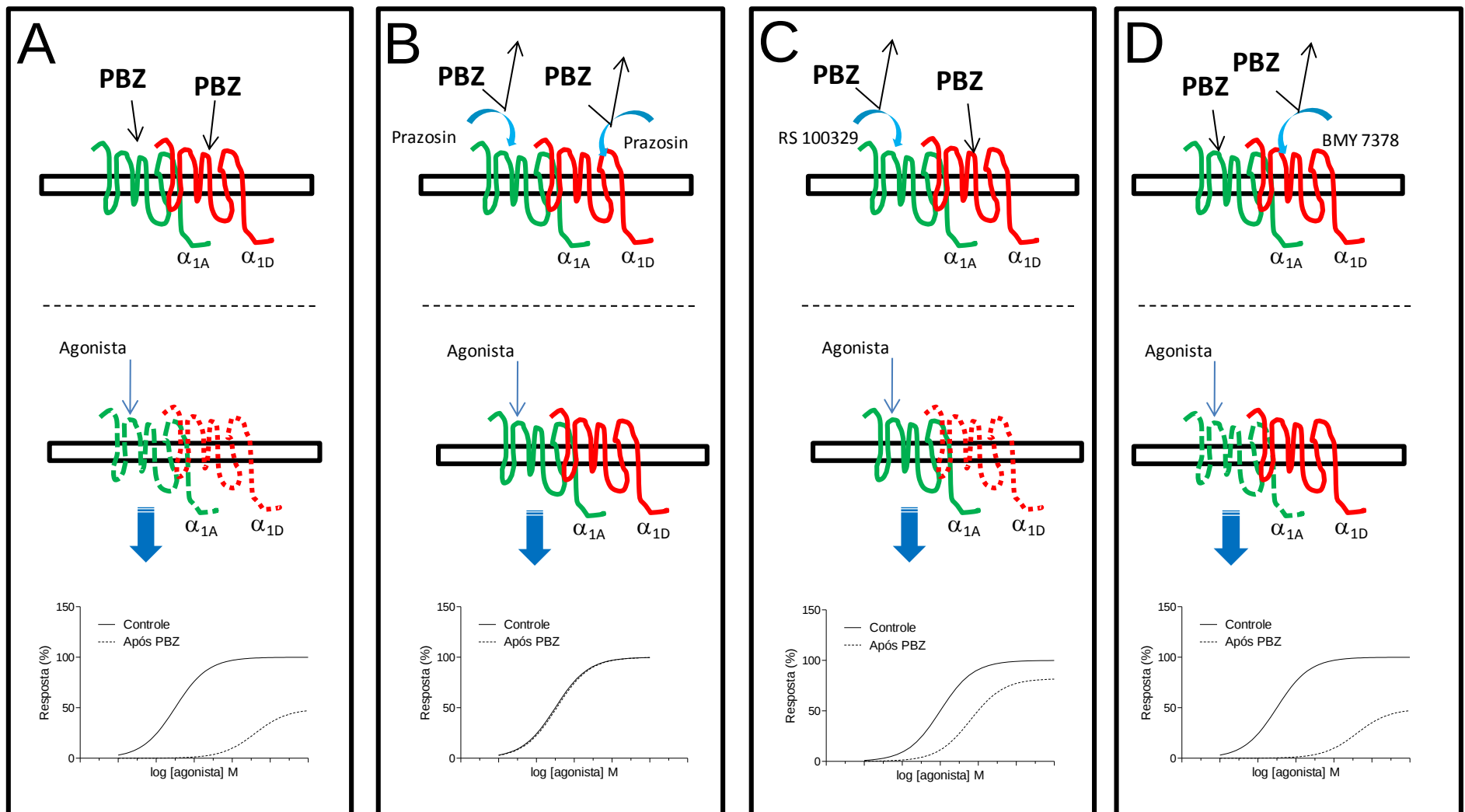


Figura 41. Hipótese para os efeitos funcionais da PBZ nas contrações da CE de rato.

A dessensibilização de GPCRs é outra característica modificada pela dimerização. Por exemplo, receptores α_{2A} são fosforilados pela GRK2 e recrutam β -arrestina; entretanto, ambos efeitos são reduzidos quando os receptores α_{2A} heterodimerizam com os receptores α_{2C} (Small *et al.*, 2006). Similarmente, a internalização dos receptores β_2 -AR é inibida pela heterodimerização β_2/β_3 -AR (Breit *et al.*, 2004). De nota, o recrutamento da β -arrestina 2 e a internalização do α_{1A} -AR são modificados pela heterodimerização com os receptores CXCR2 (Mustafa *et al.*, 2012). Assim, a ausência de dessensibilização dos α_1 -ARs da CE de rato pela oximetazolina seria causada pela redução da fosforilação dos α_{1A} -ARs pelas GRK2 no heterodímero.

Demonstramos que a heterodimerização entre α_{1A} e α_{1D} -ARs não depende dos primeiros 79 aminoácidos da região amino-terminal visto que o BRET entre os α_{1A}/α_{1D} ou $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ foi idêntico. Este resultado não é surpreendente visto que a ausência dos primeiros 79 aminoácidos da região amino-terminal não prejudica a formação de homodímeros ou oligômeros de α_{1D} -ARs ou a capacidade dos α_{1D} -ARs heterodimerizar com α_{1B} -ARs (Hague *et al.*, 2004a; Uberti *et al.*, 2003). Além disso, a dimerização de GPCRs classe A depende da interação entre os segmentos hidrofóbicos transmembrana e não da região amino-terminal (Fanelli *et al.*, 2013; Gorinski *et al.*, 2012; Johnston *et al.*, 2011; Stanasila *et al.*, 2003).

O efeito funcional da heterodimerização α_{1A}/α_{1D} dos α_1 -ARs recombinantes humanos foi investigado através da avaliação do aumento de cálcio intracelular livre, uma vez que os três α_1 -ARs são capazes de ativar proteínas $G\alpha_{q/11}$ (Zhong *et al.*, 1999). A co-expressão dos $\alpha_{1A}/\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -ARs em células HEK 293 aumentou a potência do agonista não-seletivo noradrenalina, porém a potência ou resposta máxima dos

agonistas seletivos α_{1A} cirazolina e A61603 não foi modificada. Respostas induzidas por agonistas seletivos em células HEK 293 co-expressando α_{1A} -ARs e α_{1B} -ARs também não são modificadas (Israilova *et al.*, 2004).

A ausência de efeito funcional observado com os receptores expressos em células HEK 293 contrasta com aquele observado quando os receptores $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -ARs foram co-expressados com um receptor α_{1A} endogenamente expresso em células 22Rv1. Em células 22Rv1 a eficácia do A61603 foi significativamente aumentada pela co-expressão do $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ -AR. Esta discrepância pode ter sido causada pela diferença no nível de expressão atingido pelas transfecções nos dois tipos celulares visto que a razão de expressão dos receptores α_{1A}/α_{1D} atingida em células 22Rv1 (1:6) foi maior que aquela atingida em células HEK 293 (1:3). É evidente que em ambos os tipos celulares os efeitos funcionais da heterodimerização α_{1A}/α_{1D} -ARs no aumento de cálcio intracelular livre foram observados em níveis de expressão α_{1A}/α_{1D} muito desiguais. Entretanto, é importante ressaltar que os dois tipos celulares empregados não expressam endogenamente ambos os receptores α_{1A}/α_{1D} ; portanto, é possível que células HEK 293 e 22Rv1 não expressem proteínas acessórias importantes para a heterodimerização. Neste contexto, foi demonstrado recentemente que a proteína de transporte de receptores 4 (RTP4) desempenha um papel central no tráfego dos heterodímeros μ/δ -opióide para a membrana plasmática (Decaillet *et al.*, 2008).

Na última etapa desta tese foram investigados possíveis fatores moduladores do balanço funcional entre α_1 -ARs envolvidos na contração da CE de rato. Neste contexto, a avaliação do efeito do andrógeno e estrógeno é relevante dada a importância destes hormônios esteróides na expressão dos α_1 -ARs e na manutenção da estrutura e função

do epidídimo (Campos *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 1997; Homma *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2004; Pupo, 1998; Robaire *et al.*, 2011; Thiagarajan *et al.*, 2002).

A castração alterou a contração da CE. O aparecimento de contrações espontâneas na CE de ratos castrados é um efeito similar ao descrito previamente no epidídimo, ducto deferente e glândulas de coagulação de rato (Din-Udom *et al.*, 1985; MacDonald *et al.*, 1980; Markus *et al.*, 1981; Pupo, 1998). As contrações espontâneas de ducto deferente de cobaio após a castração são causadas por despolarização da membrana das células de músculo liso e sugere-se que sejam causadas por alterações nos fluxos celulares de cálcio e potássio provavelmente resultantes de alteração na expressão de canais iônicos (Boselli *et al.*, 1994; Markus *et al.*, 1980). A despolarização do potencial de membrana das células de músculo liso do ducto deferente de cobaio é prevenida pela reposição de testosterona (Markus *et al.*, 1980). A expressão e a função de canais de potássio Kv1.5 na musculatura lisa da aorta de rato é reduzida pela castração e a reposição de testosterona previne estas alterações (Zhou *et al.*, 2008). Portanto, as contrações espontâneas da CE podem estar relacionadas a aumento da excitabilidade da musculatura lisa resultante de redução da condutância ao potássio decorrente da redução de andrógeno.

A amplitude da contração da CE induzida pela ativação de α_1 -ARs foi intensamente reduzida pela castração. A contração da CE em resposta à ativação de α_1 -ARs é dependente do influxo de cálcio via canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L (L-VDCC; dados não publicados); portanto, a redução na amplitude de contração da CE em ratos castrados pode estar relacionada à diminuição da densidade de L-VDCC assim como observado no ducto deferente de rato (Castillo *et al.*, 1992). De fato, a contração da CE ao KCl, um agente que induz contração por despolarizar a membrana e

promover influxo de cálcio extracelular através de L-VDCC foi reduzida em 66%. A prevenção da redução da contração da CE à ativação de α_1 -ARs e ao KCl pela reposição de DHT é consistente com a reconhecida modulação androgênica da expressão dos L-VDCC (Liu *et al.*, 2000).

A castração promoveu plasticidade no subtipo de α_1 -ARs responsável pela contração da CE de rato. É sabido que a expressão dos α_1 -ARs no ducto deferente, vesículas seminais e próstata é modificada pela castração e é modulada pela testosterona (Campos *et al.*, 2003; Homma *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2004; Pupo, 1998; Thiagarajan *et al.*, 2002). No ducto deferente e vesícula seminal de rato a castração induz o aparecimento de α_{1B} -ARs nas contrações à agonistas exógenos (Campos *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2004; Pupo, 1998). No entanto, a baixa potência do antagonista seletivo α_{1B} -ARs L-765,314 e o antagonismo competitivo de alta afinidade do antagonista seletivo α_{1A} -ARs/ α_{1D} -ARs WB 4101 sugere que os α_{1B} -ARs não participam na contração da CE de ratos castrados. O antagonismo complexo apresentado pelo BMY 7378 nas contrações induzidas pela noradrenalina exógena na CE de ratos castrados demonstrou a participação dos α_{1D} -ARs.

O E2 não preveniu nenhuma das alterações da contração da CE causadas pela castração. Os estrógenos desempenham importantes papéis na manutenção da fertilidade masculina e os receptores ER α e ER β são expressos ao longo do epidídimo (Hess *et al.*, 2001; Lazari *et al.*, 2009). Além disso, a expressão dos α_1 -ARs pode ser regulada pelo estradiol. Na glândula submandibular, hipotálamo e no ovário de ratas o E2 aumenta a expressão e a função dos α_{1A} -ARs e α_{1B} -ARs (Anesini *et al.*, 2003; Manni *et al.*, 2005; Petitti *et al.*, 1992). Em contraste, nas células de músculo liso da uretra de ratas, a

exposição ao E2 reduz significativamente a expressão dos α_{1A} -ARs (Banie *et al.*, 2008) sugerindo que o efeito do E2 sobre a expressão dos α_1 -ARs depende do contexto celular. De fato, a modulação transcricional da expressão pelos receptores nucleares para o estradiol (ER α e ER β) depende do recrutamento de inúmeros co-fatores que podem apresentar expressão tecido-específica.

Embora o papel dos estrógenos na reprodução masculina tenha sido demonstrado (Hess *et al.*, 1997), poucos estudos investigaram o papel de estrógenos na expressão ou função de α_1 -ARs no sistema reprodutor masculino. Em células DDT1 MF-2, uma linhagem celular de músculo liso derivada de ducto deferente de hamster sírio, o E2 foi incapaz de alterar a expressão de α_{1B} -ARs expresso endogenamente (Phillippe *et al.*, 1991).

O tratamento com E2 não foi capaz de prevenir nenhuma das alterações na contratilidade da CE. Além disso, o E2 não afetou o subtipo de α_1 -ARs responsável pela contração da CE à agonistas exógenos, sugerindo deste modo que os estrógenos não sejam importantes para a regulação dos α_1 -ARs envolvidos na contração da CE. Oliveira e colaboradores (2004) demonstraram que a reposição de E2 (75 μ g/kg, por 15 dias) a ratos castrados reduz os níveis de ER α dos ductos eferentes. Desta forma, a ausência de efeito do E2 sobre a contração da CE poderia estar relacionada à redução da sensibilidade das células do epidídimo ao E2. Entretanto, a dose de E2 utilizada nesta tese é 3.75 vezes menor que aquela empregada por Oliveira e colaboradores (2004) e a reposição com E2 50 μ g/kg (2.5 vezes mais elevada que a utilizada nesta tese) foi capaz de restabelecer os níveis plasmáticos de E2 semelhantes aos de ratos não castrados.

A razão entre estrógeno/andrógeno é um importante determinante na fisiologia da próstata (Ellem *et al.*, 2010). Além disso, a expressão de receptores para o E2 no epidídimo de rato é regulada pela testosterona (Kaushik *et al.*, 2012). Portanto, embora o E2 administrado isoladamente não tenha apresentado efeito sobre a contração da CE, o efeito do tratamento combinado de andrógeno+estradiol sobre a contratilidade da CE merece investigação adicional.

A administração de DHT preveniu todas as alterações induzidas pela castração na contratilidade da CE demonstrando que os andrógenos desempenham papel essencial na regulação da função dos α_1 -ARs na contração da CE. O papel do andrógeno na regulação da população de α_1 -ARs mediando a contração da CE foi adicionalmente demonstrado utilizando-se ratos jovens (60 dias de idade) como modelo experimental. A CE de ratos jovens expressa mRNA dos três subtipos de α_1 -ARs e os níveis de transcritos α_{1A} e α_{1D} são dominantes quando comparados aos transcritos α_{1B} (Queiroz *et al.*, 2002). Os níveis de mRNA dos α_{1B} -ARs e α_{1D} -ARs atingem os níveis adultos aos 60 dias enquanto o mRNA dos α_{1A} -ARs aumenta entre os 60 e 120 dias de idade, coincidentemente com o estabelecimento dos níveis adultos de testosterona plasmática (Queiroz *et al.*, 2002). Portanto, é provável que o aumento da expressão dos α_{1A} -ARs entre os 60 e 120 dias seja mediado por andrógenos. De fato, a contração da CE do epidídimo de ratos jovens, nos quais a expressão do mRNA dos α_{1A} -ARs ainda não atingiu os níveis adultos, é mediada por α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs. Em contraste, em ratos jovens tratados com DHT a contração da CE é mediada somente por α_{1A} -ARs de maneira semelhante ao observado na CE de ratos de 120 dias, nos quais o nível adulto de mRNA dos α_{1A} -ARs estão estabelecidos. Portanto, nossos resultados indicam que os andrógenos participam do estabelecimento do subtipo de α_1 -ARs funcional na CE de

ratos adultos. Além disso, os resultados da presente tese sugerem que os andrógenos impedem a participação dos α_{1D} -ARs na contração da CE e que este efeito pode estar relacionado à elevação da expressão dos α_{1A} -ARs. De fato, a dependência androgênica da expressão dos α_{1A} -ARs foi demonstrada na próstata de rato e em linhagens celulares de tumor prostático nos quais a depleção de andrógenos reduz o nível de mRNA dos α_{1A} -ARs enquanto os níveis de mRNA dos α_{1D} -ARs nestes dois modelos não foram alterados (Homma *et al.*, 2000; Hori *et al.*, 2011).

A freqüente co-expressão dos α_1 -ARs em diferentes tecidos (Scofield *et al.*, 1995) sugere que a regulação da função dos α_{1A} -ARs pelo α_{1D} -AR pode ter impacto em outros sistemas além do sistema reprodutor masculino. Os α_1 -ARs regulam a pressão arterial através da contração da musculatura lisa vascular (Docherty, 2010) e o α_{1A} -AR é considerado o principal subtipo regulador da contração dos vasos de resistência (Rokosh *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1997). Entretanto, evidência crescente sugere a participação dos receptores α_{1D} na contração da musculatura lisa vascular e regulação da pressão arterial (Garcia-Sainz *et al.*, 1999b; Tanoue *et al.*, 2002).

Os α_1 -ARs envolvidos na contração da CE apresentam uma farmacologia semelhante àquela encontrada nos α_1 -ARs responsáveis pela contração da musculatura lisa do leito vascular mesentérico de camundongos (Martinez-Salas *et al.*, 2007). A contração da musculatura lisa vascular do leito mesentérico à fenilefrina (não seletivo α_1 -ARs) e ao A61603 (seletivo α_{1A}) são antagonizadas com alta potência pelo RS 100329 e com baixa potência pelo BMY 7378 demonstrando, deste modo, a participação de α_{1A} -ARs mas não dos α_{1D} -ARs. Porém, as contrações a ambos os agonistas são inibidas pela CEC. O efeito protetor de antagonistas seletivos de α_1 -ARs

contra a inativação pela CEC não foi investigado (Martinez-Salas *et al.*, 2007). Entretanto, os mesmos autores demonstraram em um estudo subsequente em camundongos nocaute para α_{1D} -ARs que as contrações da musculatura lisa do leito mesentérico ao A61603 foram reduzidas quando comparadas àquelas induzidas pelo A61603 no leito mesentérico de camundongos *wild-type*. Os autores sugeriram que os α_{1D} -ARs modulam a contração do leito mesentérico induzida pela ativação de α_{1A} (Martinez-Salas *et al.*, 2011).

Dada a co-expressão dos α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs em vasos sanguíneos, a investigação do cross-talk entre estes dois α_1 -ARs nos diferentes aspectos da fisiologia vascular merece investigações (Hosoda *et al.*, 2005; Marti *et al.*, 2005). A interação α_{1A}/α_{1D} demonstrada neste estudo e a heterodimerização dos α_{1B}/α_{1D} descrita por Hague e colaboradores (2006) revelam mecanismos pelos quais a identificação da participação funcional dos α_{1D} -ARs pode ser mascarada (Finch *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 1997).

6. Conclusões

- A CE de rato expressa densidades semelhantes de α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs.
- Os α_1 -ARs mediando contração da CE apresentam perfil farmacológico dos α_{1A} -ARs; entretanto, diferentemente dos α_{1A} -ARs nativos de outros tecidos do rato ou dos α_{1A} -ARs recombinantes humanos os α_{1A} -ARs da CE não são dessensibilizados pela oximetazolina. Os α_{1D} -ARs, na ausência de ativação, modulam a contração da CE mediada pela ativação de α_{1A} -ARs e isso pode resultar da heterodimerização entre os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs.
- Os α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs humanos recombinantes formam heterodímeros. A heterodimerização α_{1A} -ARs/ α_{1D} -ARs aumentou a eficácia do A61603 elevar cálcio intracelular livre em células 22Rv1.
- A contração da CE de ratos castrados resulta da ativação de α_{1A} -ARs e α_{1D} -ARs demonstrando plasticidade no subtipo de α_1 -ARs mediando contração da CE. A reposição de DHT demonstrou que o balanço funcional da população de α_{1A} - e α_{1D} -ARs mediando a contração da CE de rato está sob controle de andrógenos.

Referências bibliográficas

(1984). IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *European journal of biochemistry / FEBS* **138**(1): 9-37.

AbdAlla S, Lotther H, el Massiery A, Quitterer U (2001). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature medicine* **7**(9): 1003-1009.

AbdAlla S, Lotther H, Quitterer U (2000). AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**(6800): 94-98.

Akinaga J, Lima V, Kiguti LR, Hebelers-Barbosa F, Alcantara-Hernandez R, Garcia-Sainz JA, *et al.* (2013). Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of alpha1A-adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. *Molecular pharmacology* **83**(4): 870-881.

Albizu L, Cottet M, Kralikova M, Stoev S, Seyer R, Brabet I, *et al.* (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nature chemical biology* **6**(8): 587-594.

Anesini C, Borda E (2003). Hormonal influence on expression and functionality of alpha1-adrenoceptor in rat submandibular gland. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* **103**(1-2): 13-18.

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilalret S, Chelsky D, Dennis M, *et al.* (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(7): 3684-3689.

Aragay AM, Ruiz-Gomez A, Penela P, Sarnago S, Elorza A, Jimenez-Sainz MC, *et al.* (1998). G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. *FEBS letters* **430**(1-2): 37-40.

Arunlakshana O, Schild HO (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *British journal of pharmacology and chemotherapy* **14**(1): 48-58.

Avellar MC, Lazari MF, Porto CS (2009). Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **81**(3): 321-344.

- Baneres JL, Parello J (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *Journal of molecular biology* **329**(4): 815-829.
- Banie L, Lin G, Ning H, Wang G, Lue TF, Lin CS (2008). Effects of estrogen, raloxifene and levormeloxifene on alpha1A-adrenergic receptor expression. *The Journal of urology* **180**(5): 2241-2246.
- Bayburt TH, Leitz AJ, Xie G, Oprian DD, Sligar SG (2007). Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *The Journal of biological chemistry* **282**(20): 14875-14881.
- Bayburt TH, Vishnivetskiy SA, McLean MA, Morizumi T, Huang CC, Tesmer JJ, *et al.* (2011). Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *The Journal of biological chemistry* **286**(2): 1420-1428.
- Billups KL, Tillman S, Chang TS (1990). Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens. *The Journal of urology* **143**(3): 625-629.
- Boselli C, Barbieri A, Grana E (1994). Effect of cromakalim on spontaneous activity of castrated rat vas deferens. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **29**(2): 163-167.
- Bouvier M (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature reviews. Neuroscience* **2**(4): 274-286.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Breit A, Lagace M, Bouvier M (2004). Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *The Journal of biological chemistry* **279**(27): 28756-28765.
- Bremner JB, Coban B, Griffith R, Groenewoud KM, Yates BF (2000). Ligand design for alpha1 adrenoceptor subtype selective antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry* **8**(1): 201-214.
- Campos M, Morais PL, Pupo AS (2003). Effect of cyproterone acetate on alpha1-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* **36**(11): 1571-1581.

Castillo CJ, Lafayette S, Caricati-Neto A, Sette M, Jurkiewicz NH, Garcia AG, *et al.* (1992). Low dihydropyridine receptor density in vasa deferentia of castrated rats. *British journal of pharmacology* **105**(2): 257-258.

Cleary L, Slattery J, Bexis S, Docherty JR (2004). Sympathectomy reveals alpha 1A- and alpha 1D-adrenoceptor components to contractions to noradrenaline in rat vas deferens. *British journal of pharmacology* **143**(6): 745-752.

Coggins NL, Trakimas D, Chang SL, Ehrlich A, Ray P, Luker KE, *et al.* (2014). CXCR7 controls competition for recruitment of beta-arrestin 2 in cells expressing both CXCR4 and CXCR7. *PloS one* **9**(6): e98328.

Cvejic S, Devi LA (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **272**(43): 26959-26964.

Decaillot FM, Rozenfeld R, Gupta A, Devi LA (2008). Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(41): 16045-16050.

Din-Udom A, Sujarit S, Pholpramool C (1985). Short-term effect of androgen deprivation on intraluminal pressure and contractility of the rat epididymis. *Journal of reproduction and fertility* **73**(2): 405-410.

Docherty JR (2010). Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**(3): 405-417.

Du L, Li M (2010). Modeling the interactions between alpha(1)-adrenergic receptors and their antagonists. *Current computer-aided drug design* **6**(3): 165-178.

Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, *et al.* (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* **137**(11): 4796-4805.

Ellem SJ, Risbridger GP (2010). Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **118**(4-5): 246-251.

Eltze M, Konig H, Ullrich B, Grebe T (1999). Buspirone functionally discriminates tissues endowed with alpha1-adrenoceptor subtypes A, B, D and L. *European journal of pharmacology* **378**(1): 69-83.

Evron T, Daigle TL, Caron MG (2012). GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends in pharmacological sciences* **33**(3): 154-164.

Fan X, Robaire B (1998). Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* **139**(4): 2128-2136.

Fanelli F, Seeber M, Felling A, Casciari D, Raimondi F (2013). Quaternary structure predictions and structural communication features of GPCR dimers. *Progress in molecular biology and translational science* **117**: 105-142.

Fibbi B, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Silvestrini E, Chavalmane A, *et al.* (2009). Estrogens regulate humans and rabbit epididymal contractility through the RhoA/Rho-kinase pathway. *The journal of sexual medicine* **6**(8): 2173-2186.

Filipek S, Krzysko KA, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein DA, Engel A, *et al.* (2004). A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **3**(6): 628-638.

Finch AM, Graham RM (2006). The alpha(1D)-adrenergic receptor: cinderella or ugly stepsister. *Molecular pharmacology* **69**(1): 1-4.

Fotiadis D, Jastrzebska B, Philippsen A, Muller DJ, Palczewski K, Engel A (2006). Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors. *Current opinion in structural biology* **16**(2): 252-259.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* **63**(6): 1256-1272.

Garcia-Sainz JA, Torres-Padilla ME (1999a). Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1d-adrenoceptors. *FEBS letters* **443**(3): 277-281.

Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, Villalobos-Molina R (1999b). Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Archives of medical research* **30**(6): 449-458.

Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P (2000). Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in rat aorta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **295**(2): 810-817.

Goetz AS, King HK, Ward SD, True TA, Rimele TJ, Saussy DL, Jr. (1995). BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1-adrenoceptors. *European journal of pharmacology* **272**(2-3): R5-6.

Gomes I, Fujita W, Chandrakala MV, Devi LA (2013a). Disease-specific heteromerization of G-protein-coupled receptors that target drugs of abuse. *Progress in molecular biology and translational science* **117**: 207-265.

Gomes I, Gupta A, Devi LA (2013b). G-protein-coupled heteromers: regulation in disease. *Methods in enzymology* **521**: 219-238.

Gorinski N, Kowalsman N, Renner U, Wirth A, Reinartz MT, Seifert R, *et al.* (2012). Computational and experimental analysis of the transmembrane domain 4/5 dimerization interface of the serotonin 5-HT(1A) receptor. *Molecular pharmacology* **82**(3): 448-463.

Gray K, Short J, Ventura S (2008). The alpha1A-adrenoceptor gene is required for the alpha1L-adrenoceptor-mediated response in isolated preparations of the mouse prostate. *British journal of pharmacology* **155**(1): 103-109.

Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M, *et al.* (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *The EMBO journal* **27**(17): 2293-2304.

Hague C, Chen Z, Pupo AS, Schulte NA, Toews ML, Minneman KP (2004a). The N terminus of the human alpha1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **309**(1): 388-397.

Hague C, Lee SE, Chen Z, Prinster SC, Hall RA, Minneman KP (2006). Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity. *Molecular pharmacology* **69**(1): 45-55.

Hague C, Uberti MA, Chen Z, Hall RA, Minneman KP (2004b). Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry* **279**(15): 15541-15549.

Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nature chemical biology* **5**(9): 688-695.

Hansen JL, Hansen JT, Speerschneider T, Lyngso C, Erikstrup N, Burstein ES, *et al.* (2009). Lack of evidence for AT1R/B2R heterodimerization in COS-7, HEK293, and NIH3T3 cells: how common is the AT1R/B2R heterodimer? *The Journal of biological chemistry* **284**(3): 1831-1839.

Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Coge F, Guenin SP, Schwinn DA (2004). Update on human alpha1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends in pharmacological sciences* **25**(9): 449-455.

Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JE, Lazareno S, *et al.* (2010). Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(6): 2693-2698.

Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, *et al.* (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* **390**(6659): 509-512.

Hess RA, Zhou Q, Nie R, Oliveira C, Cho H, Nakaia M, *et al.* (2001). Estrogens and epididymal function. *Reproduction, fertility, and development* **13**(4): 273-283.

Hib J, Ponzio R, Vilar O (1982). Contractility of the rat cauda epididymidis and vas deferens during seminal emission. *Journal of reproduction and fertility* **66**(1): 47-50.

Hib J, Ponzio RO (1977). Effect of efferent duct ligation, gonadectomy and testosterone replacement on epididymal contractility in the rat. *Journal of reproduction and fertility* **50**(2): 327-329.

Hibi H, Yamamoto M, Miyake K (1995). Effects of alpha-blocker on sperm concentration, motility, intraluminal pressure and fluid movement in the rat cauda epididymis. *The Journal of urology* **154**(2 Pt 1): 606-610.

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, *et al.* (1995). International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacological reviews* **47**(2): 267-270.

Hinton BT, Dott HM, Setchell BP (1979). Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *Journal of reproduction and fertility* **55**(1): 167-172.

Homma Y, Hamada K, Nakayama Y, Tsujimoto G, Kawabe K (2000). Effects of castration on contraction and alpha(1)-adrenoceptor expression in rat prostate. *British journal of pharmacology* **131**(7): 1454-1460.

Hori Y, Ishii K, Kanda H, Iwamoto Y, Nishikawa K, Soga N, *et al.* (2011). Naftopidil, a selective {alpha}1-adrenoceptor antagonist, suppresses human prostate tumor growth by altering interactions between tumor cells and stroma. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**(1): 87-96.

Horie K, Obika K, Foglar R, Tsujimoto G (1995). Selectivity of the imidazoline alpha-adrenoceptor agonists (oxymetazoline and cirazoline) for human cloned alpha 1-adrenoceptor subtypes. *British journal of pharmacology* **116**(1): 1611-1618.

Hosoda C, Tanoue A, Shibano M, Tanaka Y, Hiroyama M, Koshimizu TA, *et al.* (2005). Correlation between vasoconstrictor roles and mRNA expression of alpha1-adrenoceptor subtypes in blood vessels of genetically engineered mice. *British journal of pharmacology* **146**(3): 456-466.

Huang J, Chen S, Zhang JJ, Huang XY (2013). Crystal structure of oligomeric beta1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nature structural & molecular biology* **20**(4): 419-425.

Israilova M, Tanaka T, Suzuki F, Morishima S, Muramatsu I (2004). Pharmacological characterization and cross talk of alpha1a- and alpha1b-adrenoceptors coexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **309**(1): 259-266.

Jastrzebska B, Ringler P, Palczewski K, Engel A (2013). The rhodopsin-transducin complex houses two distinct rhodopsin molecules. *Journal of structural biology* **182**(2): 164-172.

Johnston JM, Aburi M, Provasi D, Bortolato A, Urizar E, Lambert NA, *et al.* (2011). Making structural sense of dimerization interfaces of delta opioid receptor homodimers. *Biochemistry* **50**(10): 1682-1690.

Joseph A, Shur BD, Hess RA (2011). Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of reproduction* **84**(2): 207-217.

Jurkiewicz NH, Caricati-Neto A, Verde LF, Avellar MC, Reuter HR, Jurkiewicz A (2006). Sympathetic neurotransmission in the rat testicular capsule: functional characterization and identification of mRNA encoding alpha1-adrenoceptor subtypes. *European journal of pharmacology* **543**(1-3): 141-150.

Kamikihara SY, Mueller A, Lima V, Silva AR, da Costa IB, Buratini J, Jr., *et al.* (2005). Differential distribution of functional alpha1-adrenergic receptor subtypes along the rat tail artery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **314**(2): 753-761.

Karkanas GB, Ansonoff MA, Etgen AM (1996). Estradiol regulation of alpha 1b-adrenoceptor mRNA in female rat hypothalamus-preoptic area. *Journal of neuroendocrinology* **8**(6): 449-455.

- Kasai RS, Suzuki KG, Prossnitz ER, Koyama-Honda I, Nakada C, Fujiwara TK, *et al.* (2011). Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *The Journal of cell biology* **192**(3): 463-480.
- Kaushik MC, Misro MM, Sehgal N, Nandan D (2012). Testosterone administration to adult rats differentially modulates androgen and oestrogen receptor-alpha expression in reproductive organs and pituitary. *Andrologia* **44 Suppl 1**: 312-322.
- Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, *et al.* (1998). Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biology of reproduction* **59**(4): 897-904.
- Kenakin TP (1984). The relative contribution of affinity and efficacy to agonist activity: organ selectivity of noradrenaline and oxymetazoline with reference to the classification of drug receptors. *British journal of pharmacology* **81**(1): 131-141.
- Knepper SM, Buckner SA, Brune ME, DeBernardis JF, Meyer MD, Hancock AA (1995). A-61603, a potent alpha 1-adrenergic receptor agonist, selective for the alpha 1A receptor subtype. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **274**(1): 97-103.
- Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, Mosberg HI, Walter NG, Sunahara RK (2009). Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. *The Journal of biological chemistry* **284**(39): 26732-26741.
- Lazari MF, Lucas TF, Yasuhara F, Gomes GR, Siu ER, Royer C, *et al.* (2009). Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* **53**(8): 923-933.
- Leung PS, Wong TP, Lam SY, Chan HC, Wong PY (2000). Testicular hormonal regulation of the renin-angiotensin system in the rat epididymis. *Life sciences* **66**(14): 1317-1324.
- Liu L, Fan QI, El-Zaru MR, Vanderpool K, Hines RN, Marsh JD (2000). Regulation of DHP receptor expression by elements in the 5'-flanking sequence. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **278**(4): H1153-1162.
- Lopez-Gimenez JF, Canals M, Padiani JD, Milligan G (2007). The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Molecular pharmacology* **71**(4): 1015-1029.
- MacDonald A, McGrath JC (1980). The effects of castration on neurotransmission in the rat vas deferens. *British journal of pharmacology* **69**(1): 49-58.

Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, *et al.* (2012). Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**(7398): 321-326.

Manni L, Holmang A, Lundeborg T, Aloe L, Stener-Victorin E (2005). Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* **118**(1-2): 79-87.

Markus RP, Goncalo MC, Lapa AJ (1981). Castration atrophy and pharmacological reactivity of the rat coagulating gland. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* **14**(2-3): 181-185.

Markus RP, Lapa AJ, Valle JR (1980). Spontaneous contractions and membrane activity of castrated guinea-pig vas deferens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **214**(2): 423-426.

Marti D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, *et al.* (2005). Correlation between mRNA levels and functional role of alpha1-adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of alpha1L as a functional isoform of the alpha1A-adrenoceptor. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**(5): H1923-1932.

Martinez-Salas SG, Campos-Peralta JM, Pardo JP, Hernandez-Munoz R, Ibarra M, Tanoue A, *et al.* (2011). alpha(1D)-Adrenoceptor regulates the vasopressor action of alpha(1A)-adrenoceptor in mesenteric vascular bed of alpha(1D)-adrenoceptor knockout mice. *Autonomic & autacoid pharmacology* **31**(3-4): 64-71.

Martinez-Salas SG, Campos-Peralta JM, Pares-Hipolito J, Gallardo-Ortiz IA, Ibarra M, Villalobos-Molina R (2007). Alpha1A-adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. *Autonomic & autacoid pharmacology* **27**(3): 137-142.

Maurice P, Kamal M, Jockers R (2011). Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends in pharmacological sciences* **32**(9): 514-520.

McCune DF, Edelmann SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJ, *et al.* (2000). Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Molecular pharmacology* **57**(4): 659-666.

Mendes FR, Hamamura M, Queiroz DB, Porto CS, Avellar MC (2004). Effects of androgen manipulation on alpha1-adrenoceptor subtypes in the rat seminal vesicle. *Life sciences* **75**(12): 1449-1463.

Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C, Esbenshade TA (1994). Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Molecular pharmacology* **46**(5): 929-936.

Muramatsu I, Morishima S, Suzuki F, Yoshiki H, Anisuzzaman AS, Tanaka T, *et al.* (2008). Identification of alpha 1L-adrenoceptor in mice and its abolition by alpha 1A-adrenoceptor gene knockout. *British journal of pharmacology* **155**(8): 1224-1234.

Muramatsu I, Tanaka T, Suzuki F, Li Z, Hiraizumi-Hiraoka Y, Anisuzzaman AS, *et al.* (2005). Quantifying receptor properties: the tissue segment binding method - a powerful tool for the pharmacome analysis of native receptors. *Journal of pharmacological sciences* **98**(4): 331-339.

Murashima A, Kishigami S, Thomson A, Yamada G (2014). Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochimica et biophysica acta*.

Mustafa S, See HB, Seeber RM, Armstrong SP, White CW, Ventura S, *et al.* (2012). Identification and profiling of novel alpha1A-adrenoceptor-CXC chemokine receptor 2 heteromer. *The Journal of biological chemistry* **287**(16): 12952-12965.

Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological reviews* **55**(4): 597-606.

Nishimune A, Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Muramatsu I (2012). Phenotype pharmacology of lower urinary tract alpha(1)-adrenoceptors. *British journal of pharmacology* **165**(5): 1226-1234.

Nojimoto FD, Mueller A, Hebeler-Barbosa F, Akinaga J, Lima V, Kiguti LR, *et al.* (2010). The tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline and imipramine are weak antagonists of human and rat alpha1B-adrenoceptors. *Neuropharmacology* **59**(1-2): 49-57.

Oliveira CA, Mahecha GA, Carnes K, Prins GS, Saunders PT, Franca LR, *et al.* (2004). Differential hormonal regulation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction* **128**(1): 73-86.

Patane MA, Scott AL, Broten TP, Chang RS, Ransom RW, DiSalvo J, *et al.* (1998). 4-Amino-2-[4-[1-(benzyloxycarbonyl)-2(S)- [(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]-piperazinyl]-6, 7-dimethoxyquinazoline (L-765,314): a potent and selective alpha1b adrenergic receptor antagonist. *Journal of medicinal chemistry* **41**(8): 1205-1208.

Perez-Aso M, Segura V, Monto F, Baretino D, Noguera MA, Milligan G, *et al.* (2013). The three alpha1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* **1833**(10): 2322-2333.

Petitti N, Karkanias GB, Etgen AM (1992). Estradiol selectively regulates alpha 1B-noradrenergic receptors in the hypothalamus and preoptic area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**(10): 3869-3876.

Pfleger KD, Eidne KA (2006). Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature methods* **3**(3): 165-174.

Phillippe M, Saunders T, Bangalore S (1991). A mechanism for testosterone modulation of alpha-1 adrenergic receptor expression in the DDT1 MF-2 smooth muscle myocyte. *Molecular and cellular biochemistry* **100**(1): 79-90.

Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, Monnier C, Rives ML, Trinquet E, *et al.* (2009). G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. *The Journal of physiology* **587**(Pt 22): 5337-5344.

Pin JP, Galvez T, Prezeau L (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* **98**(3): 325-354.

Pupo AS (1998). Functional effects of castration on alpha1-adrenoceptors in rat vas deferens. *European journal of pharmacology* **351**(2): 217-223.

Pupo AS, Uberti MA, Minneman KP (2003). N-terminal truncation of human alpha1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *European journal of pharmacology* **462**(1-3): 1-8.

Putnam SK, Sato S, Hull EM (2003). Effects of testosterone metabolites on copulation and medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Hormones and behavior* **44**(5): 419-426.

Queiroz DB, Mendes FR, Porto CS, Avellar MC (2002). Alpha1-adrenoceptor subtypes in rat epididymis and the effects of sexual maturation. *Biology of reproduction* **66**(2): 508-515.

Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA (2001). G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacology & therapeutics* **92**(2-3): 71-87.

Robaire B, Hamzeh M (2011). Androgen action in the epididymis. *Journal of andrology* **32**(6): 592-599.

Robaire B, Henderson NA (2006). Actions of 5alpha-reductase inhibitors on the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology* **250**(1-2): 190-195.

- Robaire B, Viger RS (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of reproduction* **52**(2): 226-236.
- Rokosh DG, Simpson PC (2002). Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(14): 9474-9479.
- Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, *et al.* (2007). Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *British journal of pharmacology* **152**(3): 332-340.
- Scofield MA, Liu F, Abel PW, Jeffries WB (1995). Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **275**(2): 1035-1042.
- Shayu D, Rao AJ (2006). Expression of functional aromatase in the epididymis: role of androgens and LH in modulation of expression and activity. *Molecular and cellular endocrinology* **249**(1-2): 40-50.
- Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang LY, Tripathi-Shukla P, *et al.* (2014). Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* **512**(7513): 218-222.
- Small KM, Schwarb MR, Glinka C, Theiss CT, Brown KM, Seman CA, *et al.* (2006). Alpha2A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment. *Biochemistry* **45**(15): 4760-4767.
- Solomon HM, Wier PJ, Ippolito DL, Toscano TV (1997). Effect of prazosin on sperm transport in male rats. *Reprod Toxicol* **11**(4): 627-631.
- Stanasila L, Perez JB, Vogel H, Cotecchia S (2003). Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **278**(41): 40239-40251.
- Taki N, Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Israilova M, Taniguchi T, *et al.* (2004). Alpha-1D adrenoceptors are involved in reserpine-induced supersensitivity of rat tail artery. *British journal of pharmacology* **142**(4): 647-656.
- Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, *et al.* (2002). The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *The Journal of clinical investigation* **109**(6): 765-775.

Terrillon S, Bouvier M (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO reports* **5**(1): 30-34.

Thiyagarajan M, Kaul CL, Ramarao P (2002). Enhancement of alpha-adrenoceptor-mediated responses in prostate of testosterone-treated rat. *European journal of pharmacology* **453**(2-3): 335-344.

Trettel F, Di Bartolomeo S, Lauro C, Catalano M, Ciotti MT, Limatola C (2003). Ligand-independent CXCR2 dimerization. *The Journal of biological chemistry* **278**(42): 40980-40988.

Tsukamoto H, Sinha A, DeWitt M, Farrens DL (2010). Monomeric rhodopsin is the minimal functional unit required for arrestin binding. *Journal of molecular biology* **399**(3): 501-511.

Turner PC, Johnson AD (1971). Epididymal lipid of the rat with and without testicular contribution. *Journal of reproduction and fertility* **27**(2): 249-255.

Turner TT, Jones CE, Howards SS, Ewing LL, Zegeye B, Gunsalus GL (1984). On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology* **115**(5): 1925-1932.

Uberti MA, Hall RA, Minneman KP (2003). Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties. *Molecular pharmacology* **64**(6): 1379-1390.

Urizar E, Yano H, Kolster R, Gales C, Lambert N, Javitch JA (2011). CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nature chemical biology* **7**(9): 624-630.

Ventura S, Pennefather JN (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. *European journal of pharmacology* **254**(1-2): 167-173.

Ventura S, Pennefather JN (1991). Sympathetic co-transmission to the cauda epididymis of the rat: characterization of postjunctional adrenoceptors and purinoceptors. *British journal of pharmacology* **102**(2): 540-544.

Vicentic A, Robeva A, Rogge G, Uberti M, Minneman KP (2002). Biochemistry and pharmacology of epitope-tagged alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **302**(1): 58-65.

Vignozzi L, Filippi S, Morelli A, Luconi M, Jannini E, Forti G, *et al.* (2008). Regulation of epididymal contractility during semen emission, the first part of the ejaculatory process: a role for estrogen. *The journal of sexual medicine* **5**(9): 2010-2016; quiz 2017.

Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, *et al.* (2005). A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(25): 9050-9055.

Walther C, Ferguson SS (2013). Arrestins: role in the desensitization, sequestration, and vesicular trafficking of G protein-coupled receptors. *Progress in molecular biology and translational science* **118**: 93-113.

Wang C, Wu H, Katritch V, Han GW, Huang XP, Liu W, *et al.* (2013). Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* **497**(7449): 338-343.

Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, Huang B, Zare RN, Kobilka B, *et al.* (2007). A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(18): 7682-7687.

Whorton MR, Jastrzebska B, Park PS, Fotiadis D, Engel A, Palczewski K, *et al.* (2008). Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *The Journal of biological chemistry* **283**(7): 4387-4394.

Williams TJ, Blue DR, Daniels DV, Davis B, Elworthy T, Gever JR, *et al.* (1999a). In vitro alpha1-adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel alpha1A-adrenoceptor selective antagonists. *Br J Pharmacol* **127**(1): 252-258.

Williams TJ, Blue DR, Daniels DV, Davis B, Elworthy T, Gever JR, *et al.* (1999b). In vitro alpha1-adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel alpha1A-adrenoceptor selective antagonists. *British journal of pharmacology* **127**(1): 252-258.

Wilson S, Wilkinson G, Milligan G (2005). The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *The Journal of biological chemistry* **280**(31): 28663-28674.

Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**(6007): 1066-1071.

Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, *et al.* (2012). Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* **485**(7398): 327-332.

Xiao L, Jeffries WB (1998). Kinetics of alkylation of cloned rat alpha1-adrenoceptor subtypes by chloroethylclonidine. *European journal of pharmacology* **347**(2-3): 319-327.

Yang M, Verfurth F, Buscher R, Michel MC (1997). Is alpha1D-adrenoceptor protein detectable in rat tissues? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **355**(4): 438-446.

Zhong H, Minneman KP (1999). Alpha1-adrenoceptor subtypes. *European journal of pharmacology* **375**(1-3): 261-276.

Zhou P, Fu L, Pan Z, Ma D, Zhang Y, Qu F, *et al.* (2008). Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. *European journal of pharmacology* **593**(1-3): 87-91.

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of andrology* **23**(6): 870-881.

Zhu W, Zhang Y, Han C (1997). Characterization of subtype of alpha1-adrenoceptor mediating vasoconstriction in perfused rat hind limb. *European journal of pharmacology* **329**(1): 55-61.