

EFEITOS DO TRATAMENTO COM SIBUTRAMINA SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA DE RATOS MACHOS WISTAR

CIBELE DOS SANTOS BORGES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Profa. Dra. WILMA DE GRAVA KEMPINAS

**BOTUCATU – SP
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DO TRATAMENTO COM SIBUTRAMINA SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA DE RATOS MACHOS WISTAR

CIBELE DOS SANTOS BORGES

Dra. WILMA DE GRAVA KEMPINAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular,
Estrutural e Funcional*.

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

**BOTUCATU – SP
2013**

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

Borges, Cibele dos Santos.

Efeitos do tratamento com sibutramina sobre a qualidade espermática de ratos machos Wistar / Cibele dos Santos Borges. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: Wilma De Grava Kempinas

Capes: 20600003

1. Obesidade - Tratamento. 2. Sêmen. 3. Fármacos - Uso terapêutico.
4. Fecundidade. 5. Rato como animal de laboratório. 6. Sibutramina - Uso terapêutico - Efeitos colaterais.

Palavras-chave: Contratilidade; Fertilidade; Qualidade espermática; Ratos; Sibutramina.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à pessoa mais importante da minha vida, minha mãe, Tereza Cristina dos Santos, que sempre esteve presente me ajudando a superar cada dificuldade e desafio e se orgulhando por cada vitória conquistada.

Agradecimientos

Aos meus pais, Tereza Cristina e Leonílto, por acreditarem e me apoiarem em todos os meus sonhos, mesmo quando isso significava ficar muito longe deles.

Ao meu namorado e cúmplice, Diogo Peres dos Santos, por transformar nosso namoro em algo mais, sendo tão amigo, companheiro e forte nos meus momentos mais difíceis assim como merecedor dos meus momentos felizes.

À minha orientadora, Dra. Wilma De Grava Kempinas, pela confiança depositada, pelos ensinamentos, ajuda e incentivo durante todo o mestrado, e principalmente por despertar em mim a vontade de crescer como pesquisadora e sobretudo pessoa.

À minha amiga, companheira de trabalho e dificuldades, iniciação científica e mais que isso, meu ponto de apoio durante toda a execução do projeto, Gabriela Missassi.

À minha colega de laboratório, casa e vida, na qual eu puder contar sem hesitar, ela sempre estava ali, pronta para me defender, Raquel Frenedoso da Silva.

As minhas amigas de hoje e sempre, Bianca Damasceno e Kamila Kihara por tudo vivido até hoje.

Aos meus familiares, principalmente a Angelina (minha vó), Alíne, Beatriz, Adriana e Rafael, por toda a admiração depositada e esperança no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meninos do Laboratório de Farmacologia, Luís Ricardo, pelo incentivo, idéias e questionamentos que me fizeram sempre melhorar, Enio Pacini, por toda a dedicação, força de vontade, inteligência e ânimo de pesquisar e descobrir mais e mais.

À Patrícia Vilela e Mariana Oliveira, pela ajuda, companhia e risadas no laboratório.

À toda equipe do Laboratório REPROTOX, pelo auxílio durante a execução do projeto, pelos conhecimentos transferidos e pela paciência ao ajudar, principalmente a Marciana.

Ao Prof. Dr. André Pupo, pela oportunidade de desvendar novos horizontes em colaboração com a nossa equipe.

Ao técnico de Laboratório José Eduardo, pela ajuda no processamento dos materiais e por ser sempre tão prestativo.

À Dona Terezinha, por ser esta senhora maravilhosa que me acolheu e me ajudou em muitos momentos.

Aos alunos que fui monitora, que deixaram em mim a vontade de seguir por este caminho.

Aos funcionários da Pós-Graduação e a secretária do Departamento Luciana, pela ajuda e atenção.

A todos que de alguma forma estiveram presentes em minha vida e envolvidos no meu trabalho e que possibilitaram mais esta vitória.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo financeiro através do Processo nº 2010/13948-4.

E a Deus, que diante de tudo sempre me proporcionou vencer, pois mesmo com inúmeros problemas, no final me concedia a luz no fim do túnel, a calma para vencer as inúmeras tormentas que vieram e que ainda virão.

Muito obrigada!

Epígrafe

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

Resumo	11
Abstract	14
Introdução	17
Sibutramina	18
Obesidade e fármacos anorexígenos.....	18
A sibutramina: mecanismo de ação	19
Efeitos da sibutramina	19
Sistema genital masculino e a inervação simpática	20
Testículo	21
Epidídimo	24
Ducto deferente	27
Glândulas sexuais acessórias: glândula seminal e próstata	28
A sibutramina e os sistemas genitais masculino e feminino	31
Justificativa	32
Objetivos	34
Capítulo	36
Abstract	39
Introduction	40
Material and Methods	41
Results	46
Discussion	48
Acknowledgements	51
Author contributions	52
References	53
Figure legends	55
Conclusões	66
Referências bibliográficas	68
Apêndices	77
Comissão de Ética	84

Resumo

A sibutramina é um inibidor seletivo da recaptação neuronal de noradrenalina e serotonina amplamente utilizada para o tratamento da obesidade. Investigações anteriores demonstraram o impacto da sibutramina nas reservas espermáticas e na contratilidade de órgãos relacionados a ejaculação. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os parâmetros espermáticos e a contratilidade da próstata ventral e do ducto epididimário distal isolado de ratos expostos *in vivo* e *in vitro* a sibutramina. No experimento 1, ratos machos *Wistar* (12-16 semanas /350-450 g) foram divididos em dois grupos: tratado oralmente com sibutramina (10 mg/kg/dia) e grupo controle, que recebeu apenas o veículo (dimetilsulfóxido e solução salina). Após 30 dias de tratamento, os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação. Os testículos direitos, epidídimos, ductos deferentes, próstatas ventrais e glândulas seminais (sem a glândula coaguladora) foram removidos e os seus pesos foram determinados. Os testículos e epidídimos direitos foram utilizados para a determinação do número de espermatozoides e os esquerdos para análise histopatológica. Além disso, os espermatozoides da cauda do epididimo direito foram usados para inseminação artificial *in utero* e para análise da motilidade e morfologia espermática. Os níveis séricos de testosterona, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) também foram mensurados. No experimento 2, um outro lote de ratos, seguindo o mesmo desenho experimental, foi utilizado para a realização dos ensaios *in vitro* de reatividade farmacológica do ducto epididimário distal isolado. No experimento 3 ratos machos adultos foram utilizados para os ensaios *in vitro* de reatividade farmacológica do ducto epididimário distal isolado, com e sem a presença de sibutramina, e para ensaios *in vivo* da reatividade farmacológica da próstata ventral, com e sem aplicação intravenosa de sibutramina (5mg/kg). A administração oral de sibutramina reduziu significativamente o peso corporal, os pesos absolutos da próstata ventral, glândula seminal e do epidídimo, mas os pesos de outros órgãos reprodutores foram semelhantes entre os grupos. A produção espermática diária, a morfologia e motilidade dos espermatozoides foram semelhantes em ambos os grupos, assim como os níveis hormonais. No epidídimo, a análise dos parâmetros espermáticos demonstrou que houve uma redução significativa no número de espermatozoides na região da cauda e aceleração do tempo de trânsito espermático no grupo exposto à sibutramina. Nesse mesmo grupo, o procedimento de inseminação artificial *in utero* revelou diferença significativa no potencial de fertilidade. Os ductos epididimários isolados de ratos do grupo controle e tratados com sibutramina não apresentaram nenhuma atividade espontânea e as contrações induzidas por noradrenalina foram semelhantes. Entretanto, curvas dose-resposta à tiramina mostraram que as contrações máximas do grupo tratado com sibutramina apresentaram uma redução significativa. A

administração *in vitro* de sibutramina aumentou 8-16 vezes a sensibilidade do ducto epididimário à contração induzida por noradrenalina exógena, além de aumentar a atividade mecânica, mediada por canais de cálcio. Nos ensaios *in vivo*, a administração intravenosa de sibutramina aumentou significativamente a força contrátil da próstata ventral quando exposta a noradrenalina. Assim, a redução do peso da cauda do epidídimo, das reservas espermáticas e a aceleração do tempo de trânsito dos espermatozoides, bem como a redução do peso da próstata ventral podem estar associados a uma maior sensibilidade destes órgãos à noradrenalina, provocada pela sibutramina. As alterações observadas, associadas a redução do potencial de fertilidade neste modelo experimental, provavelmente estão relacionadas ao efeito simpaticomimético desta droga, alertando sobre o possível impacto da sibutramina na fertilidade masculina humana.

Abstract

Sibutramine is a neuronal noradrenaline and serotonin reuptake inhibitor largely used for the treatment of obesity. Previous investigations have shown the impact of sibutramine on ejaculation contractility related organs and sperm reserves. Therefore, the aim of the present work was to evaluate sperm parameters and the contractility of isolated distal cauda epididymidis duct and ventral prostate of rats exposed *in vivo* and *in vitro* to sibutramine. In experiment 1, Wistar male rats (12-16 weeks/350-450 g) were divided into two groups: treated orally with sibutramine (10 mg/kg/day) and control, which received only the vehicle (dimethyl sulfoxide and saline). After 30 days of treatment the animals were weighed and euthanized by decapitation. The right testis, epididymis, vas deferens, ventral prostate, and seminal vesicle (without the coagulating gland) were removed, and their weights were determined. The right testis and epididymis were used for enumeration of sperm numbers and the left organs for histopathological analysis. In addition, the right epididymal sperm were used for *in utero* artificial insemination and to analyse motility and sperm morphology. Serum testosterone, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were also measured. In experiment 2 another batch of rats, following the same design, were used for *in vitro* assays of pharmacological reactivity of the isolated distal epididymal duct. In experiment 3 adult male rats were used for *in vitro* assays of pharmacological reactivity of the isolated distal epididymal duct, with and without sibutramine, and for *in vivo* assays of pharmacological reactivity of the ventral prostate, with and without intravenous sibutramine (5mg/kg). Oral administration of sibutramine reduced significantly body, ventral prostate, seminal vesicle and epididymis weights, but the weights of other reproductive organs were similar between groups. Daily sperm production, sperm morphology and motility were similar in both groups. Hormone levels were also similar between groups. In the epididymis, analysis of sperm parameters showed that there was a significant reduction in sperm number on the epididymal cauda and acceleration in sperm transit time. *In utero* artificial insemination showed significant decrease in fertility potential in the sibutramine-treated group. Epididymal duct isolated from vehicle and sibutramine-treated rats presented no spontaneous activity and the noradrenaline-induced contractions showed similar sensitivity and maximal contractions, however, a significant reduction of maximal contraction induced by endogenous norepinephrine was observed. *In vitro*, sibutramine administration increased by 8 – 16 fold the sensitivity of epididymal duct to noradrenaline-induced contraction, besides increasing the mechanical activity, mediated by calcium channels. *In vivo*, intravenous sibutramine significantly increased the contractile tension of the ventral prostate when exposed to norepinephrine. Thus, the reduction of epididymal cauda weight, sperm reserves

and acceleration of sperm transit time, as well as the reduction of ventral prostate weight may be associated with increased sensitivity of these organs to noradrenaline, induced by sibutramine. The alterations demonstrated in this experimental model, associated with reduced fertility potential, are probably related to the sympathomimetic effect of this drug, raising concerns about the possible impact of sibutramine on human male fertility.

Sibutramina

Obesidade e fármacos anorexígenos

A cada ano aumenta progressivamente o percentual de indivíduos que sofrem de doenças metabólicas, sendo a mais comum a obesidade. Esta é resultado da associação de diversos fatores como má alimentação, falta de atividade física e fatores psicossomais (Van Gaal, 2002; Mancini & Halpen, 2006).

Atualmente, a obesidade se tornou um dos maiores problemas de saúde pública mundial, sendo considerada uma doença crônica (Mertens & Van Gaal, 2000; Glandt & Raz, 2011). Por ser uma doença metabólica, a obesidade esta ligada diretamente a redução da expectativa de vida, sendo um agente fundamental para o desenvolvimento de hipertensão, dislipidemia, diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares, apnéia obstrutiva assim como câncer (Rajala & Scherer, 2003; Moore *et al.*, 2005; Heal *et al.*, 2009; Li & Cheung, 2011). Além disso, sabe-se que a obesidade é um fator predisponente para aumento na incidência de morbidade e mortalidade, devido principalmente ao desenvolvimento de problemas cardio e cerebrovasculares (Heal *et al.*, 2009).

Sabe-se que a obesidade é resultado de um desequilíbrio energético (Bray, 2010). Este desequilíbrio é devido ao aumento da ingestão calórica seguido de queda no gasto energético (Hofbauer *et al.*, 2007). O tratamento da obesidade é indicado para melhorar a qualidade de vida do indivíduo (Carpenter *et al.*, 2000; Erickson *et al.*, 2000) na qual dieta e exercício físico são aconselhados tanto para prevenção quanto tratamento, entretanto, requer muita disciplina e são difíceis de serem mantidos (Glandt & Raz 2011), sendo então recomendado o uso de fármacos anorexígenos.

O tratamento farmacológico é indicado para indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) maior que 30kg/m^2 ou entre 27kg/m^2 e 30kg/m^2 com a presença de doenças associadas ao excesso de peso (Mancini & Halpern 2006; WHO, 2011).

Drogas que induzem perda de peso podem atuar reduzindo o apetite ou aumentando a saciedade, reduzindo a absorção de nutrientes ou aumentando o gasto energético (Ioannides-Demos *et al.*, 2011). Foi demonstrado que tal comportamento é devido ao seu papel sobre o sistema nervoso central, existindo três principais categorias: drogas que atuam por mecanismo catecolaminérgico (anfetaminas), por mecanismo serotoninérgico (fenfluramina) e as que combinam estes dois sistemas (sibutramina) (Bellaver *et al.*, 2001).

A sibutramina: mecanismo de ação

A sibutramina é um supressor de apetite administrado oralmente para tratamento da obesidade (Binsaleh, 2012), atuando sobre o sistema nervoso central como um inibidor seletivo da recapitação neuronal de noradrenalina e serotonina (Nisoli & Carruba, 2000; Choi *et al.*, 2011) e em menor quantidade, dopamina (Jackson *et al.*, 1997). Este fármaco exerce seus efeitos *in vivo* através de seus metabólitos ativos: aminas primárias e secundárias, que possuem mais estabilidade e maior meia vida (Nisoli & Carruba, 2000).

A sibutramina está disponível em doses de 5mg, 10mg e 15mg/dia, sendo a dose de 10mg/dia a mais indicada para o tratamento da obesidade (Bray & Ryan, 2007; Bray & Ryan, 2011). Entretanto, aponta-se que 52% dos pacientes usam indevidamente a droga, seja pelo uso contínuo ou pelo uso com IMC igual ou abaixo de 27kg/m² (Dahlin & Beermann, 2007).

Em modelos animais, a sibutramina atua sobre a ingestão de alimentos e gasto energético (Nisoli & Carruba, 2000). A queda da ingestão calórica é devida à resposta a saciedade pós-ingestão mediado pela serotonina e noradrenalina central, através do aumento da ativação dos receptores 5-HT_{2A/2C} e β 1. O alto gasto energético é decorrente do aumento da taxa metabólica mediado pela noradrenalina periférica, através do receptor α 1 e β 3 (Meridia, 2002). Entretanto, este efeito simpatomimético periférico induz elevação da frequência cardíaca (Scheen, 2011).

Efeitos da sibutramina

Wesnes *et al.*, (2000) avaliaram a ação da sibutramina concomitante com a ingestão de álcool. Pacientes que fizeram uso apenas do álcool apresentaram grande perda da função cognitiva, e os que se utilizaram de álcool associado com sibutramina apresentaram uma menor perda desta função.

Estudos realizados com pacientes obesas portadoras da Síndrome do Ovário Policístico demonstraram que a sibutramina apresentou efeitos positivos sobre a hiperandrogenia (Sabuncu *et al.*, 2003).

Além disso, pacientes sobrepesos ou obesos, que foram submetidos a um tratamento inicial de quatro semanas com sibutramina na dose de 10mg/dia, apresentaram uma redução nos valores de LDL, VLDL, HDL e colesterol total (Weeke *et al.*, 2010).

Fujioka *et al.*, (2000) observaram que a administração da sibutramina em pacientes com diabetes do tipo 2, associada com uma moderada restrição calórica foi benéfica, melhorando a qualidade de vida destes pacientes. Em 2010, Van Gaal *et al.* (2010) reafirmam estes resultados com pacientes diabéticos de alto risco.

De acordo com o Compêndio de Especialidades Farmacêuticas (Meridia, 2002), foram registradas irregularidades menstruais, elevação da pressão sanguínea e da frequência cardíaca com o uso da sibutramina. Os efeitos adversos frequentemente encontrados numa taxa de 7 a 20% dos pacientes são: insônia, boca seca, paradoxal aumento de apetite, náuseas, dor estomacal, constipação, problemas para dormir, dor de cabeça, pressão alta, taquicardia, vasoconstrição e vasodilatação (Woolard *et al.*, 2004; Rucker *et al.*, 2007).

Após realização do SCOUT (Sibutramine Cardiovascular Outcome Trial) foi observado que, a curto prazo, a sibutramina se mostrou segura a pacientes com doenças cardiovasculares preexistentes (Torp-Pedersen *et al.*, 2007), e a longo prazo, a sibutramina aumentou em 16% o risco de infarto do miocárdio e derrame (James *et al.*, 2010; Coutinho & James, 2011). A EMA (European Medicines Agency) recomendou a suspensão da comercialização da sibutramina e a FDA a retirou do mercado em outubro de 2010 (FDA, 2011), embora o consumo através de outras fontes ainda ocorra. No Brasil, a sibutramina esta sendo comercializada, mas com severas restrições.

Sistema genital masculino e a inervação simpática

O sistema genital masculino interno da maioria dos mamíferos é composto por um par de testículos (gônadas), de epidídimos e de ductos deferentes, além das glândulas sexuais acessórias (próstata e glândula seminal) (Figura 1).

Sabe-se que este sistema é esteróide-dependente e que qualquer composto que atue sobre o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal pode interferir no desenvolvimento normal do trato genital masculino, assim como no seu crescimento e função (Luccio-Camelo & Prins, 2011).

Além disso, o sistema genital masculino recebe inervação de fibras do sistema autônomo simpático (fibras adrenérgicas) e parassimpático (fibras colinérgicas), os quais exercem distintas funções de controle, baseadas na ativação de receptores específicos presentes nas membranas de cada órgão ou glândula (Falck *et al.*, 1965; Sjostrand, 1965; Purves, 2001). Alterações nesta comunicação, seja inibindo ou excitando, podem acarretar em modificações na funcionalidade do sistema genital masculino.

Assim, drogas cujo mecanismo de ação está relacionado com o aumento da liberação ou da disponibilidade de neurotransmissores catecolaminérgicos, como a noradrenalina,

podem interferir direta ou indiretamente sobre este controle nervoso que há no sistema genital masculino (Nojimoto *et al.*, 2009; Jurkiewicz *et al.*, 2012).

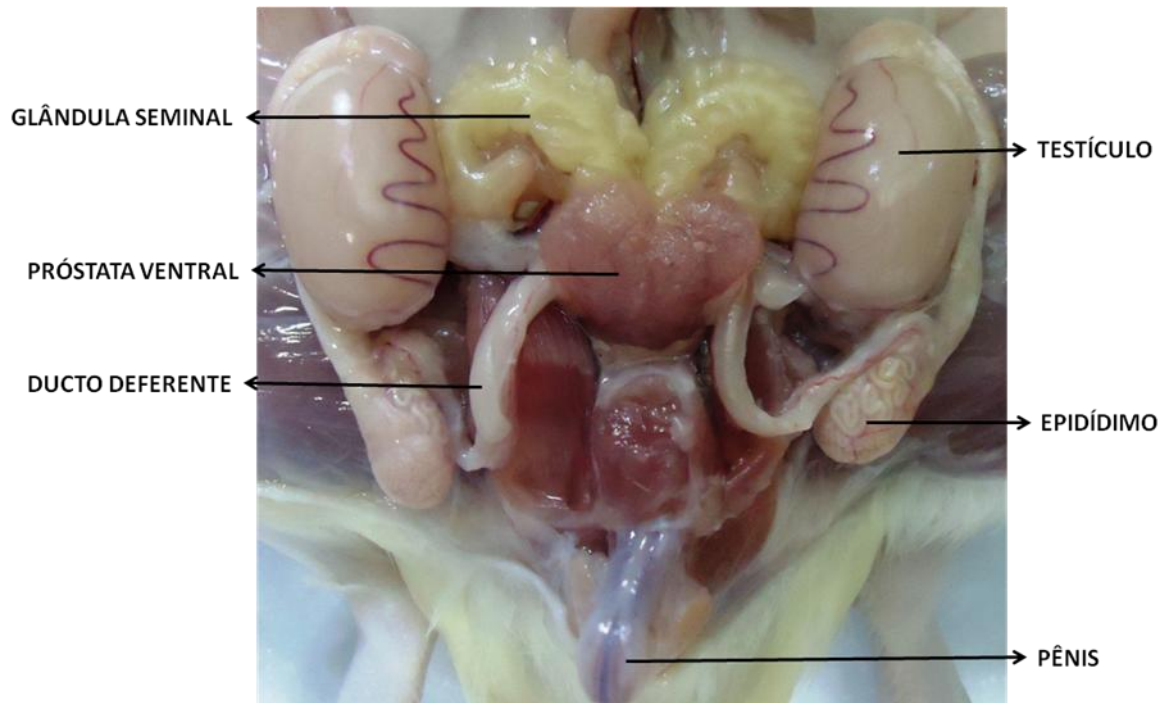


Figura 1: Órgãos genitais de rato *Wistar*. Fonte: Laboratório de Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento.

Testículo

O testículo é um órgão do sistema genital masculino que pode ser dividido estrutural e funcionalmente em duas partes: túbulos seminíferos e interstício, responsáveis pela produção de espermatozoides (espermatogênese) e de hormônios esteróides (esteroidogênese), respectivamente (Foley, 2001; Johnson, 2001) (Figura 2).

Este órgão apresenta-se envolto por uma cápsula resistente de tecido fibroso denominada túnica albugínea, composta principalmente por fibroblastos e células musculares lisas que são responsivas a estímulos nervosos (Russell, 1990; Setchell, 2006).

A espermatogênese é um processo cíclico e contínuo, no qual células germinativas unipotentes diploides se diferenciam, e posteriormente passam pelo processo de divisão celular meiótica, formando células especializadas haploides denominadas espermatozoides (Franca *et al.*, 1993; Chu & Shakes, 2013).

Os túbulos seminíferos ainda apresentam dois tipos de células somáticas: as células de Sertoli e células mioídes ou peritubulares (Figura 2) (Johnson, 2001). As células de Sertoli têm um papel crucial na formação do testículo e no processo de espermatogênese, auxiliando

na progressão das células germinativas a espermatozoides, além de constituírem a barreira de células de Sertoli, que protege as células germinativas de uma possível reação autoimune e de muitas substâncias tóxicas que podem entrar em contato com a gônada via circulação (Russell, 1990; Griswold, 1998; Johnson, 2001).

As células mioides ou células peritubulares, por sua vez, são células que participam do processo contrátil lento e rítmico dos túbulos seminíferos, auxiliando na movimentação dos espermatozoides e do fluido testicular (Russell, 1990).

No interstício, localizado entre os túbulos seminíferos, encontra-se vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, macrófagos e células de Leydig (Russell, 1990), como observado na Figura 2. Estas células são responsáveis pelo processo de esteroidogênese, sendo a maior fonte de andrógenos, principalmente testosterona, hormônio produzido a base de colesterol (Azhar, 2007).

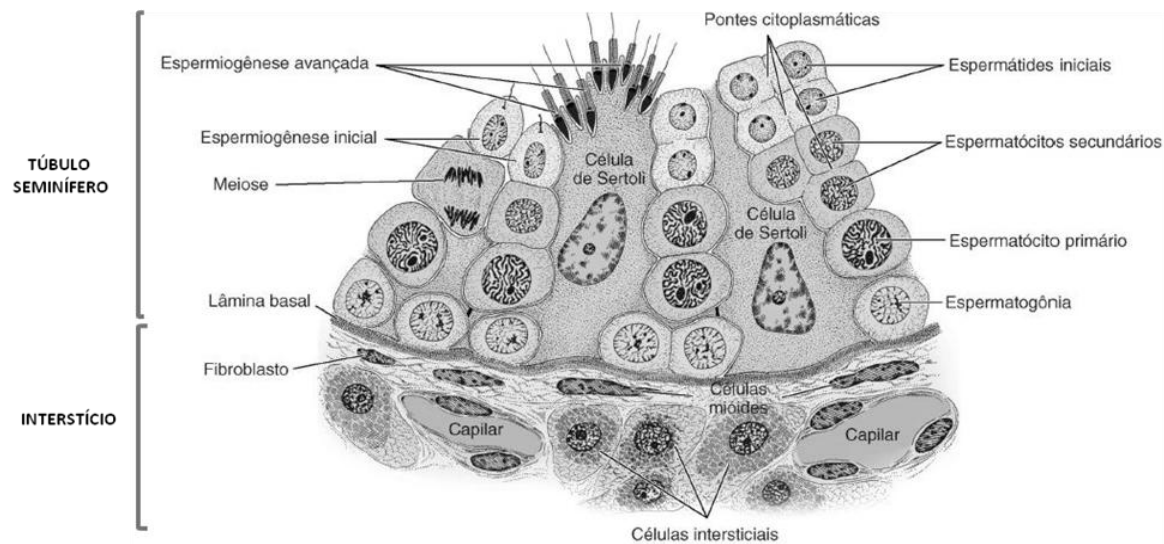


Figura 2: Desenho de um segmento do testículo, constituído por uma secção do túbulo seminífero e seus componentes, e por uma secção do interstício e seu principais componentes. (Junqueira & Carneiro, 2004).

O testículo recebe inervação autônoma pelos nervos espermáticos superiores e inferiores, que chegam neste órgão alvo por dois caminhos distintos: os nervos espermáticos superiores se originam do gânglio mesentérico superior (rostral) chegando à gônada via artéria testicular; os nervos espermáticos inferiores se originam do gânglio mesentérico inferior (caudal) que acompanha o ducto deferente e penetra no testículo pelo pólo inferior, como na Figura 3 (Sosa *et al.*, 2009; Motoc *et al.*, 2010).

O componente simpático do nervo espermático superior vem via nervos intermesentéricos, e do nervo espermático inferior via gânglio mesentérico superior (Mitchell, 1935; Hodson, 1965; Gerendai *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que a inervação simpática exerce controle direto sobre: o fluxo sanguíneo testicular (Kempinas *et al.*, 1988; Karaguzel *et al.*, 1995), a espermatogênese (Hodson, 1965; Lamano-Carvalho *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 2006), a manutenção e sobrevivência das células de Leydig (Gong *et al.*, 2009), a secreção hormonal de testosterona pelas gonadas (Chiocchio *et al.*, 1999; Gerendai *et al.*, 2005) assim como a atividade contrátil desenvolvida pelas células peritubulares e células musculares lisas constituintes da túnica albugínea, responsáveis pelo transporte dos espermatozoides dos túbulos seminíferos à cabeça do epidídimo (Hargrove *et al.*, 1977; Ellis *et al.*, 1981; Banks *et al.*, 2006).

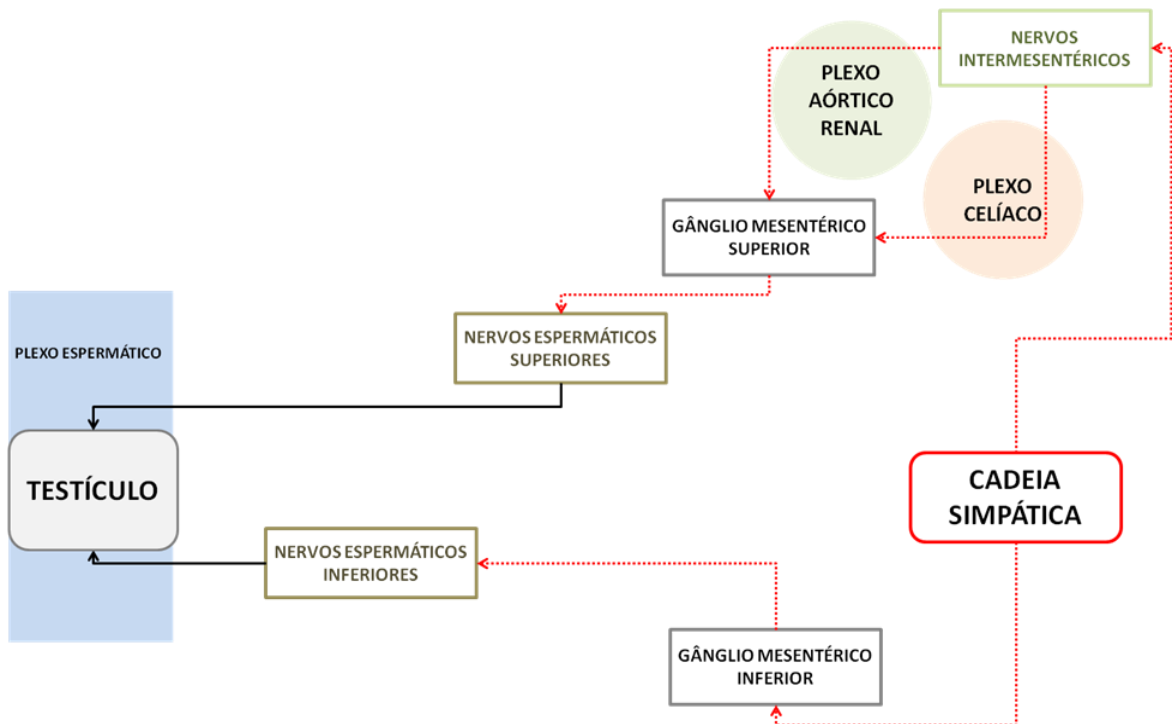


Figura 3: Modelo esquemático da inervação simpática testicular, representando os dois nervos que chegam ao testículo, o nervo espermático superior e o nervo espermático inferior.

Portanto, a inervação autônoma do testículo corresponde a um eixo importante no controle do processo de espermatogênese e sobre no transporte dos espermatozoides para a cabeça do epidídimo, sendo crucial para a manutenção da estrutura e função da gônada masculina.

Epidídimo

O epidídimo é um órgão do aparelho genital masculino presente na maioria dos mamíferos, formado por um único ducto altamente enovelado que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (Hermo, 2002; Rodriguez, 2002; Robaire, 2006).

Anatômica e funcionalmente, o epidídimo de rato pode ser dividido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, como observado na figura 4, que proporcionam um microambiente específico para a passagem dos espermatozoides vindos do testículo (Franca *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2005).

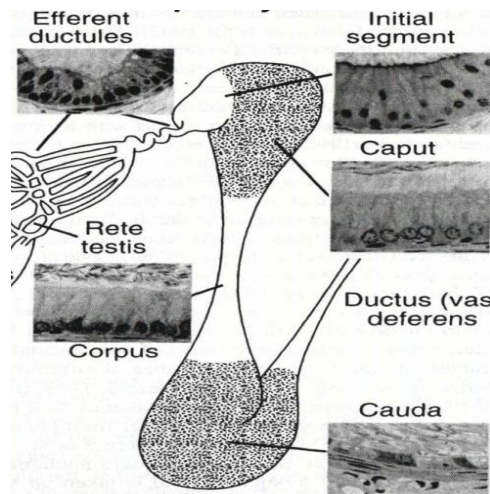


Figura 4: Desenho ilustrando as regiões que se dividem o ducto epididimário de acordo com as suas características morfofuncionais (Klinefelter, 1998).

Constituído por um epitélio pseudo-estratificado, é composto por seis tipos celulares distintos: células estreitas, apicais, basais, halo, claras e principais, que juntas exercem inúmeras funções necessárias para o bom funcionamento do epidídimo (Hermo, 2002).

O processo de maturação espermática ocorre ao longo da passagem dos espermatozoides pelo ducto epididimário. Vindos do testículo, estes espermatozoides morfologicamente formados, mas imóveis e inférteis, adquirem a capacidade de motilidade progressiva e de fertilizar o ovócito II. Além disso, o epidídimo desempenha um importante papel sobre o transporte, proteção, estoque e concentração espermática (Cuasnicú, 2002; Robaire, 2006; Fernandez *et al.*, 2008; Kempinas & Klinefelter, 2010).

Ao redor do epitélio epididimário existe uma camada de células musculares lisas, cuja contração auxilia no processo de trânsito espermático e expulsão dos espermatozoides da região da cauda para o ducto deferente (Bellentani *et al.*, 2011). Esta camada, mais fina na região da cabeça e corpo e mais espessa na região da cauda, como pode ser observado na

figura 5, apresenta receptores de membranas específicos para a atuação de fibras adrenérgicas do sistema nervoso simpático que inervam este órgão, controlando este processo contrátil e conferindo tempo hábil para os espermatozoides se maturarem (Kempinas *et al.*, 1998; Ricker, 1998; Setchell, 2002).

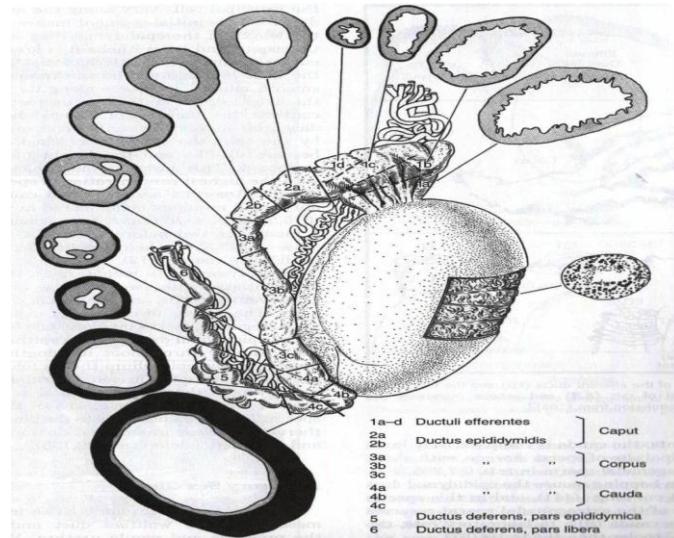


Figura 5: Desenho ilustrando a espessura e distribuição da camada de células musculares lisas que envolvem o ducto epididimário desde o segmento inicial até a região da cauda distal (Azhar, 2007).

O epidídimo recebe inervação simpática de vários plexos e gânglios do sistema nervoso autônomo (Figura 6). Esta inervação é derivada do gânglio mesentérico inferior ou caudal, localizado próximo à artéria mesentérica inferior (Ricker, 1998; Setchell, 2002; Setchell & Breed, 2006). Resumidamente, pode-se dizer que chegam ao ducto epididimário fibras simpáticas via nervo hipogástrico. Entretanto, sabe-se que o nervo hipogástrico, fornece fibras simpáticas ao nervo espermático mediano, que em muitas espécies estende-se pelo ducto deferente até o epidídimo (Setchell, 2002) e fornece fibras ao nervo espermático inferior através do plexo pélvico (plexo que fornece fibras parassimpáticas). Além disso, fibras simpáticas também inervam a cauda epididimária através dos nervos espermáticos inferiores (Kihara *et al.*, 1998; Ricker, 1998).

A função das fibras adrenérgicas, de modo geral, é excitar as células musculares que envolvem o ducto epididimário (Sjostrand, 1965; Setchell, 2002). Assim, foram localizados ambos receptores α e β -adrenérgicos na parede da musculatura lisa que envolve o epidídimo, demonstrando a importância da inervação adrenérgica sobre a contratilidade deste ducto (Ricker, 1998; Gerendai *et al.*, 2001; Setchell & Breed, 2006; Bellentani *et al.*, 2011).

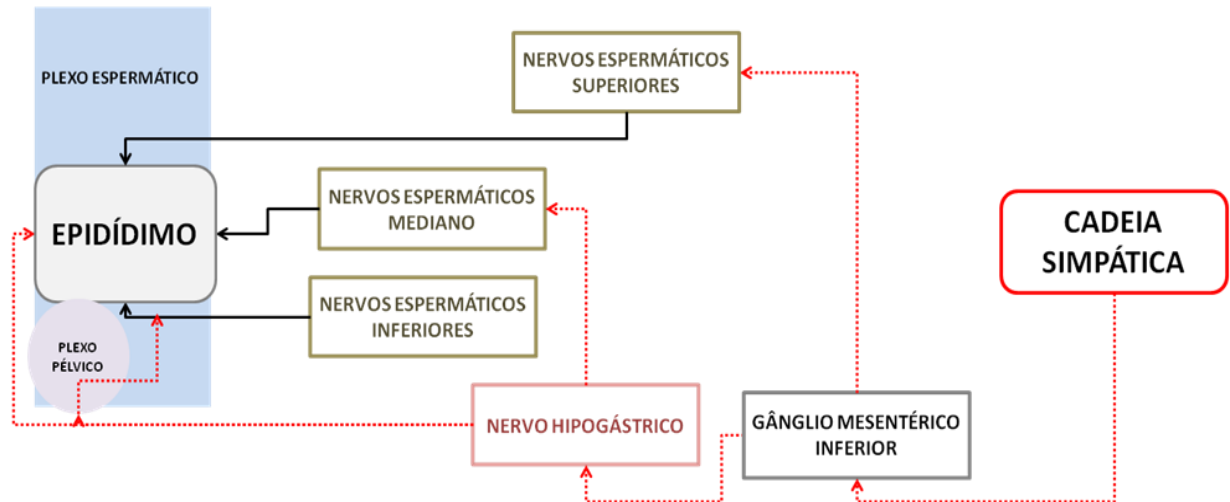


Figura 6: Desenho esquemático sobre as diferentes rotas cuja inervação simpática leva para chegar ao ducto epididimário.

Estudos demonstraram que a inervação simpática está relacionada diretamente com o processo de absorção espermática (Ricker & Chang, 1996; Kempinas *et al.*, 1998) e controle do trânsito dos espermatozoides pelo ducto.

Com base nestes trabalhos prévios, recentemente foram observados que o uso de drogas simpatomiméticas, inversamente ao processo de deservação, pode afetar as reservas espermáticas, pois promove a aceleração do tempo de trânsito de espermatozoides na cauda epididimária. Esta aceleração foi demonstrada em testes *in vitro*, nos quais estímulos noradrenérgicos promoveram aumento da atividade contrátil do tecido epididimário na presença de drogas agonistas α -adrenérgicas (Bellentani *et al.*, 2011). Por outro lado, até o presente momento, são contraditórios os trabalhos que relacionam alterações na inervação simpática e qualidade espermática, como motilidade, morfologia e fertilidade dos espermatozoides (Hepp & Kreye, 1973; Hib *et al.*, 1979; Billups *et al.*, 1990; Ratnasooriya & Wadsworth, 1994; Ricker *et al.*, 1997; Kempinas *et al.*, 1998).

Assim, pode-se concluir que a inervação epididimária, principalmente na região caudal, exerce papel fundamental para o processo de transporte, absorção, concentração e maturação espermática (Bellentani *et al.*, 2011). Entretanto, a literatura contempla os efeitos da inibição dos estímulos nervosos sobre o epidídimo, sendo escassos os trabalhos relacionados a estimulação das células musculares e sua repercussão sobre a qualidade espermática.

Ducto deferente

O ducto deferente é um ducto único contínuo à cauda do epidídimo, que o une à uretra prostática. Como um componente do cordão espermático, uma vez que se encontra associado aos vasos e nervos testiculares, este ducto atravessa o canal inguinal e penetra na cavidade abdominal. Antes de alcançar a próstata, sofre uma pequena expansão, denominada ampola, onde desemboca um pequeno ducto da glândula seminal, formando o ducto ejaculatório (Dixon *et al.*, 1998).

A principal função deste ducto é transportar os espermatozoides estocados na região caudal do epidídimo para o ducto ejaculatório, além de auxiliar no término do processo de maturação espermática (Dixon *et al.*, 1998; Setchell, 2002). Este ducto é envolto por uma espessa camada de musculatura lisa (Setchell, 2002) e, para que o espermatozoide o atravesse durante o processo de ejaculação, são necessárias fortes contrações desta musculatura (Nojimoto *et al.*, 2009).

As contrações das células musculares lisas do ducto deferente são provocadas graças a uma rica inervação autônoma adrenérgica, na qual cada célula muscular lisa recebe estímulo via ativação de adrenoreceptores (Johnson, 2001; Setchell, 2002). A inervação simpática responsável por este controle vem pelos nervos hipogástricos que emanam do gânglio mesentérico inferior (caudal), além de algumas fibras vindas da cadeia simpática (Sjostrand, 1965). Estes nervos hipogástricos chegam à região pélvica e se unem com fibras parassimpáticas, formando um plexo nervoso denominado plexo pélvico (Figura 7) (Sjostrand, 1965; Kihara *et al.*, 1998).

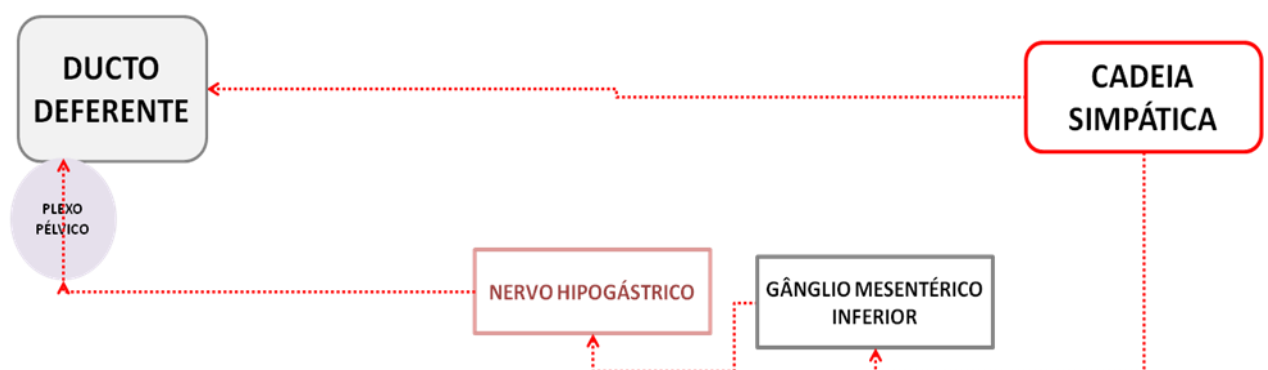


Figura 7: Esquema da inervação simpática que chega ao ducto deferente. Observar que o nervo hipogástrico passa pelo plexo pélvico (plexo que trás o nervo pélvico – parassimpático).

Foi demonstrado que, ao se realizar deservação cirúrgica das fibras simpáticas ou simpatectomia química, ocorreu acúmulo dos espermatozoides no ducto deferente por atrasar o trânsito e por impossibilitar o processo de reabsorção espermática (Hodson, 1964; Lamano-

Carvalho *et al.*, 1993) ao passo que a utilização de drogas catecolaminérgicas (sibutramina, fenilefrina, anfetamina) e serotoninérgicas (fluoxetina) desempenharam sobre o ducto deferente aumento de sua atividade contrátil, sugerindo um trânsito mais acelerado por este canal, o que poderia ser insuficiente para o término da maturação espermática (Nojimoto *et al.*, 2009; Gocmez *et al.*, 2010; Jurkiewicz *et al.*, 2012). Assim, pode-se concluir que a inervação simpática do ducto deferente é fundamental para o transporte e término da maturação espermática.

Glândulas sexuais acessórias: glândula seminal e próstata

A glândula seminal, órgão andrógeno-dependente (Kierszenbaum, 2008), consiste em um ducto único, dilatado e enovelado, revestido por um epitélio pseudoestratificado altamente pregueado (Figura 8) (Hayward *et al.*, 1996; Risbridger, 2006).

Além desta camada de células, a parede da glândula seminal apresenta uma camada de tecido conjuntivo frouxo denominado adventícia, uma camada de células musculares lisas divididas em duas lamínas e uma folha externa de tecido conectivo (Narbaitz, 1974; Kierszenbaum, 2008). Esta camada muscular dividida em duas lâminas, uma interna de fibras circulares e outra externa de fibras longitudinais, é fundamental para eliminar a secreção vesicular durante a ejaculação (Hayward *et al.*, 1996; Hayward *et al.*, 1996; Risbridger, 2006).

Esta glândula seminal produz uma secreção viscosa de pH predominantemente ácido que contribui com 70 a 80% do volume do ejaculado (Kierszenbaum, 2008), sendo composta por várias substâncias muito bem caracterizadas, como proteínas seminais coagulantes, prostaglandinas e frutose (Risbridger, 2006), que são importantes para a viabilidade espermática, principalmente motilidade.

A frutose é a maior fonte de energia para o espermatozoide presente no ejaculado. Assim, a glândula seminal fornece, via ducto excretor, ao ducto ejaculatório o material que será o meio adequado para o transporte dos espermatozoides até o trato genital feminino (Kierszenbaum, 2008). Vale ressaltar que a glândula seminal é muito importante no processo de emissão do ejaculado, uma vez que é controlada pelo sistema nervoso autônomo (Hsieh *et al.*, 1996).

A próstata é a maior glândula sexual acessória masculina, localizada na pelve, inferiormente à bexiga (Kierszenbaum, 2008). Este órgão, em roedores, não se apresenta como uma glândula única, mas como um conjunto de glândulas que entram na uretra em diferentes pontos (Mcphaul, 1998). Assim, a região da uretra que entra em contato com a

próstata, desde a sua origem até a bexiga urinária, é denominada de uretra prostática (Johnson, 2001).

Esta glândula é dividida em três regiões de acordo com o seu posicionamento em relação aos demais órgãos pélvicos: um par de lobos dorsolaterais, um par de lobos ventrais e um par de lobos anteriores ou glândula de coagulação, associadas às glândulas seminais, como pode ser observado na figura 8 (Abbott *et al.*, 2003).

O epitélio prostático é pseudo-estratificado, constituído de células secretórias e basais, havendo também a presença, mas em menor quantidade, de células neuroendócrinas (Hayward *et al.*, 1996; Hayward *et al.*, 1996; Roy-Burman *et al.*, 2004).

As secreções produzidas pelas células glandulares contêm citrato, fosfatase ácida, amilase e fibrinolisinase. Esta fibrinolisinase auxilia a dissolver o plug ejaculatório produzido pelos fluidos da glândula seminal, tornando o sêmen liquefeito por um período maior (Johnson, 2001). Estes compostos, embora não essenciais à fertilização, servem como meio para a otimização da motilidade e viabilidade espermática (Pennefather *et al.*, 2000).

Além disso, a próstata é envolta por tecido conectivo e por uma camada de células musculares lisas que se estendem até o septo fibromuscular do estroma (Johnson, 2001). Estas células musculares desempenham um papel no processo de emissão do conteúdo prostático, uma vez que respondem a estímulos nervosos contráteis (Vaalasti & Hervonen, 1979). Tais estímulos nervosos, vindos pelo sistema nervoso autônomo, além de contribuírem para a atividade secretora da próstata, auxiliam no crescimento e maturação deste órgão (Wang *et al.*, 1991).

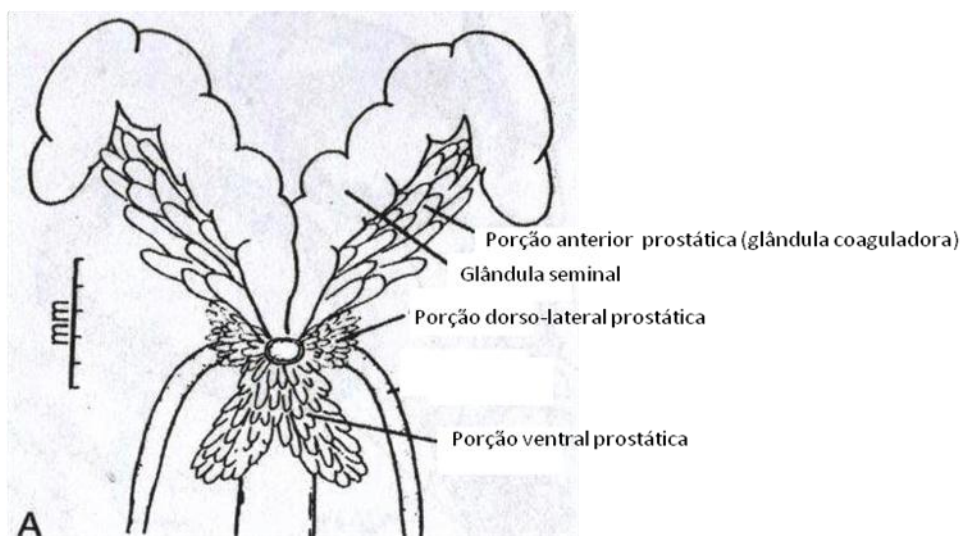


Figura 8: Desenho do complexo glândula seminal e próstata de um roedor. Observar a constituição em lóbulos da próstata e a glândula seminal enovelada (Setchell & Breed, 2006).

De modo geral, as glândulas sexuais acessórias recebem inervação simpática, vindo através de fibras pós-ganglionares curtas (diferentemente dos demais órgãos pélvicos) que chegam dos corpos celulares nervosos localizados próximo ao órgão, através da extremidade periférica do nervo hipogástrico (Figura 9) (Sjostrand, 1965; Vaalasti & Hervonen, 1979; Setchell & Breed, 2006). O nervo hipogástrico, como já mencionado, emana do gânglio mesentérico inferior (caudal) e este gânglio recebe fibras da cadeia simpática vindas da região lombar da coluna vertebral. Além disso, algumas fibras simpáticas vêm diretamente da cadeia simpática (Sjostrand, 1965).

As fibras simpáticas estão concentradas em contato com a camada de células musculares lisas que circundam os ductos e os alvéolos prostáticos e vesiculares, ou seja, presentes no estroma; entretanto são ausentes no epitélio glandular (Al-Zuhair *et al.*, 1975; Lamano-Carvalho, 1990; Pennefather *et al.*, 2000). Estas fibras adrenérgicas estão diretamente relacionadas ao aumento do tônus contrátil das células musculares lisas presentes no estroma, auxiliando no processo de secreção do fluido à uretra (Bruschini *et al.*, 1978; Vaalasti & Hervonen, 1979; Dixon & Jen, 1995; Pennefather *et al.*, 2000).

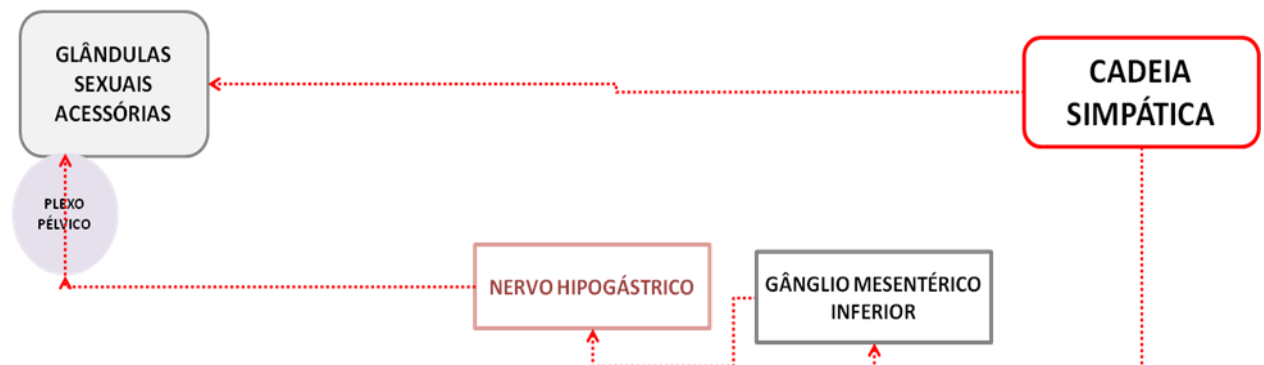


Figura 9: Desenho esquemático das fibras simpáticas que inervam as glândulas sexuais acessórias, glândula seminal e próstata. Observar também inervação simpática vinda diretamente pela cadeia simpática.

Estudos demonstraram que a inervação autônoma simpática pode estar envolvida no controle de receptores de LH, importantes durante o período pré-pubere do desenvolvimento, influenciando o crescimento da glândula seminal e próstata (Lamano-Carvalho *et al.*, 1993; Rosa-e-Silva *et al.*, 1995). Além disso, sabe-se que não apenas o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, mas também a inervação simpática exercem papel fundamental na manutenção da integridade estrutural e funcional das glândulas sexuais acessórias (Lamano-Carvalho, 1990; Wang *et al.*, 1991; Diaz *et al.*, 2010), influenciando sobre a atividade secretora de ambas (Lamano-Carvalho, 1990; Lamano-Carvalho, 1995) e

sobre a atividade contrátil das células musculares responsáveis por eliminar os fluidos no ducto ejaculatório (Lamano-Carvalho, 1990).

A utilização de drogas simpatomiméticas, tal como fenilefrina e sibutramina, promoveu aumento da sensibilidade contrátil das células musculares presentes na glândula seminal, aumentado a eliminação do fluido vesicular à uretra e diminuindo o peso final desta glândula (Hib *et al.*, 1984; Nojimoto *et al.*, 2009).

Assim, pode-se inferir que as fibras adrenérgicas são de suma importância para as glândulas sexuais acessórias, quer seja para sua atividade secretora, quer seja para eliminação do fluido à uretra.

A sibutramina e os sistemas genitais masculino e feminino

Sobre órgãos do aparelho genital feminino foi demonstrado que o tratamento de ratas com a sibutramina promoveu redução do potencial fértil tanto das fêmeas obesas quanto não obesas, além de aumentar a incidência de perdas pós-implantação (Francia-Farje *et al.*, 2010).

Por outro lado, a ação da sibutramina sobre órgãos do aparelho genital masculino apresenta, até o presente momento, poucos relatos na literatura. Segundo Food and Drug Administration (FDA, 2011) há relatos de ejaculação anormal em ratos como efeito adverso da sibutramina.

Nojimoto *et al.*, 2009) demonstraram que a exposição a diferentes concentrações de sibutramina aumentaram a atividade contrátil do ducto deferente e da glândula seminal. (Bellentani *et al.*, 2011) por sua vez, observaram que ocorreu redução da reserva espermática na cauda epididimária e aceleração do trânsito de espermatozoides nessa região, devido ao possível efeito simpatomimético da droga.

Justificativa

O sistema nervoso simpático desempenha importante papel sobre a manutenção estrutural e funcional dos órgãos que constituem o sistema genital masculino, principalmente dos órgãos relacionados com a qualidade espermática (Setchell & Breed, 2006) e a sibutramina, por sua vez, bloqueando a recaptura de noradrenalina, deixando-a disponível por mais tempo na fenda sináptica (Jackson *et al.*, 1997; Scheen, 2012) promove um aumento do tônus simpático (Hirsch *et al.*, 2000) o que pode interferir no controle funcional dos órgãos reprodutores (Nojimoto *et al.*, 2009; Bellentani *et al.*, 2011). Entretanto, são escassos os estudos relacionando os possíveis efeitos da sibutramina sobre a qualidade espermática. Neste sentido foi desenvolvido o presente trabalho, para demonstrar os possíveis efeitos do tratamento de ratos machos adultos com sibutramina sobre aspectos reprodutivos, com ênfase na qualidade espermática.

Objetivos

O objetivo fundamental do projeto foi analisar se a exposição à sibutramina pode alterar a qualidade espermática, em ratos.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar os efeitos tóxicos da sibutramina de forma geral sobre o sistema genital masculino;
- Investigar se há alterações sobre o processo de maturação espermática;
- Investigar as possíveis alterações sobre a atividade contrátil dos órgãos reprodutores importantes para a qualidade espermática;
- Investigar se há alterações sobre a fertilidade dos animais expostos à sibutramina.

Para tanto, foram avaliados nos animais dos grupos experimentais os seguintes parâmetros: evolução do peso corpóreo, níveis séricos de hormônios sexuais (FSH, LH e testosterona), peso dos órgãos reprodutivos, histopatologia testicular e produção diária de espermatozoides, número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo, histopatologia epididimária, parâmetros espermáticos (morfologia e motilidade dos espermatozoides), contratilidade, *in vitro*, da cauda distal do ducto epididimário, assim como contratilidade da próstata ventral.

Capítulo

Este trabalho deu origem ao artigo “SLIM OR FERTILE? PHARMACOLOGICAL MECHANISMS INVOLVED IN REDUCED SPERM QUALITY AND FERTILITY IN RATS EXPOSED TO THE ANOREXIGEN SIBUTRAMINE” que foi submetido para publicação no periódico “Plos One”.

SLIM OR FERTILE? PHARMACOLOGICAL MECHANISMS INVOLVED IN REDUCED SPERM QUALITY AND FERTILITY IN RATS EXPOSED TO THE ANOREXIGEN SIBUTRAMINE

Cibele S. Borges¹, Gabriela Missassi¹; Enio Setsuo Arakaki Pacini², Luiz Ricardo de Almeida Kiguti², Marciana Sanabria¹, Raquel Frenedoso da Silva¹, Thais Petrochelli Banzato¹, Juliana Elaine Perobelli¹, André Sampaio Pupo², Wilma De Grava Kempinas^{1*}.

Departments of ¹Morphology and ²Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

* Wilma De Grava Kempinas, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Caixa Postal 510, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

Tel.: +55 14 3880-0476

E-mail: kempinas@ibb.unesp.br

ABSTRACT

Sperm acquire motility and fertility capacity during epididymal transit, under the control of androgens and sympathetic innervation. It is already known that the acceleration of sperm transit time can lead to lower sperm quality. In a previous work we showed that rats exposed to the anorexigen sibutramine, a non-selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, presented increased *in vitro* epididymal duct contractility, faster sperm transit time and lower epididymal sperm reserves. In the present work we aimed to further investigate pharmacological mechanisms involved in these alterations and the impact on rat sperm quality. For this, adult male *Wistar* rats were treated with sibutramine (10 mg/kg/day) or vehicle for 30 days. Sibutramine decreased final body weight, seminal vesicle, ventral prostate and epididymal weights, as well as sperm reserves and sperm transit time in the cauda epididymis. On the contrary of the *in vitro* pharmacological assays, in which sibutramine was added directly to the bath containing strips of distal cauda epididymis, the ductal contractility was not altered after *in vivo* sub-chronic exposure to sibutramine. However, there is pharmacological evidence that the endogenous epididymal norepinephrine reserves were reduced in these animals. It was also shown that the decrease in prostate weight is, at least in part, related to increased contractility of the gland, due to sibutramine sympathomimetic effects. Our results confirmed absence of disruption in sperm morphology after sibutramine treatment, but showed reduced sperm quality after *in utero* artificial insemination, a more sensitive procedure to assess fertility in rodents. The epididymal norepinephrine depletion exerted by sibutramine, associated with decreases in sperm transit time, quantity and quality, leading to reduced fertility in this experimental model, reinforces the concerns about the possible impact on fertility of man taking sibutramine as well as other non-selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors, especially considering the lower reproductive efficiency of humans compared to other males.

Key Words. sibutramine; male rats; sperm quality; fertility; epididymis, sympathomimetic drugs, anorexigens, non-specific serotonin-norepinephrine uptake inhibitors, prostate contractility

1 INTRODUCTION

2
3 The epididymis is an organ of the male reproductive tract formed by highly
4 convoluted duct that connects the efferent ducts to the vas deferens and performs a variety of
5 functions, including sperm transport, maturation, protection, concentration and storage [1].
6 This organ plays an important role in the acquisition of progressive sperm motility and fertile
7 ability. Alterations on the sperm transit time through the epididymis may compromise the
8 sperm maturation process, which is modulated by androgens and contractile activity of
9 epididymal smooth muscle layers [2,3,4]. The rat epididymis receives sympathetic and
10 parasympathetic autonomic innervations from hypogastric and pelvic nerves, respectively
11 [5,6]. The contractions of the epididymal cauda induced by norepinephrine (NE) released by
12 sympathetic nerve stimulation occur via activation of α_1 -AR [7].

13 Another organ that receives sympathetic and parasympathetic autonomic innervation
14 is the prostate. This accessory organ of the male reproductive tract has as main function to
15 produce an alkaline secretion that composes the seminal fluid, improving sperm fertility
16 potential and motility. The sympathetic stimulation (noradrenergic), via activation of α_1 -AR,
17 contracts the prostatic smooth muscle cells releasing prostatic secretions into the urethra [8].

18 Since the sympathetic innervation is necessary for the structural and functional
19 integrity of the epididymis and prostate, the exposure to drugs that acts on the nervous
20 system, with known effects on the peripheral nervous system, could impair the morpho-
21 physiology of these reproductive organs [9,10,11,12].

22 Sibutramine, an appetite suppressant administered orally for obesity treatment [13],
23 acts on the central nervous system as a non-selective serotonin-NE reuptake inhibitor, with
24 subsequent activation of adrenoceptors, especially α_1 -adrenoceptors (α_1 -ARs) [14,15,16]. The
25 anorexigenic activity of sibutramine promotes increase in energy expenditure and induction of
26 peripheral sympathomimetic effects [17,18], such as on the cardiovascular system [19] and on
27 male reproduction [20]. Abnormal ejaculation was observed in rats, as well as an increased
28 sensitivity to NE induced by the activation of the α_1 -ARs in tissues such as vas deferens and
29 seminal vesicles, resulting in an increased contractile activity [12]. In addition, sibutramine
30 promoted an acceleration of sperm transit time in epididymal cauda due to its
31 sympathomimetic effects [20].

32 Therefore, the aim of the present work was to further evaluate sibutramine effects, a
33 serotonin-NE reuptake inhibitor, on the contractility of the epididymis and prostate, and its
34 impact on sperm quality and fertility of adult male rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male (110 days old/ 490-540 g) and female (70 days old/220-270 g) *Wistar* rats were obtained from the Central Biotherium of UNESP – Univ Estadual Paulista, and maintained under controlled conditions (25°C, 30% air humidity, 12/12-h light/dark cycle) with food and water available *ad libitum*.

The male rats were randomly allocated into two groups: control, consisted of rats that were treated by gavage with the vehicle solution (33.3% dimethylsulfoxide and 66.7% saline), and treated, consisted of rats that were administered with sibutramine (10 mg/kg/day) in vehicle solution by gavage for 30 days.

The experimental procedures were approved by the local Ethics Committee for the Use of Experimental Animals (protocol number 248-CEEA) and are in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health).

Drugs and Solutions

Drugs were obtained from the following sources: sibutramine hydrochloride monohydrate from Deg (Jiangyin Eas, China); methoxamine hydrochloride, nifedipine and norepinephrine ((L)-(-)-NE bitartrate salt monohydrate) and dimethylsulphoxide (DMSO) from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Sibutramine was diluted in 33.3% dimethylsulfoxide and 66.7% saline and administered once a day. This dose was chosen as the minimum anorectic dose in this experimental model. The study was conducted in two steps, Experiment 1 and Experiment 2, and described as follows.

Experiment 1: Reproductive organ weights, serum hormone levels, sperm parameters, fertility assessment

Adult male rats (n=8) were treated with 10 mg/kg/day of sibutramine as described previously. The respective control animals (n=8) received only vehicle. Additionally, 10 male rats (110 days old) and 28 female (70 days old) were used in the fertility procedures.

Body and reproductive organs weights

The animals were weighed and euthanized by decapitation on the day after the end of treatment. The right testis, epididymis, vas deferens, ventral prostate, and seminal vesicle (without the coagulating gland) were removed and their weights recorded.

Hormonal measurements

After decapitation, blood was collected (between 9:00 and 11:30 AM) and serum was obtained by centrifugation ($1236 \times g$, for 20 min at 4 °C). The concentrations of testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were determined by the technique of double antibody radioimmunoassay. Testosterone assay was performed using a TESTOSTERONE MAIA[®] kit (Biochem Immuno System). The LH and FSH assays were done using specific kits supplied by the National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK, USA). All samples were assayed in duplicate and in the same assay to avoid inter-assay errors. The intra-assay error was 3.4% for LH, 2.8% for FSH and 4% for testosterone.

Sperm counts, daily sperm production, and sperm transit time through the epididymis

Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 19 of spermiogenesis) in the testis were counted as described previously [21], with adaptations adopted by Fernandes et al. [3]. Briefly, the testis, decapsulated and weighed soon after collection, was homogenized in 5 ml of NaCl 0.9% containing Triton X 100 0.5%, followed by sonication for 30 s. After a 10-fold dilution, one sample was transferred to Neubauer chambers (4 fields per animal), and mature spermatids were counted. To calculate the daily sperm production (DSP), the number of spermatids at stage 19 was divided by 6.1, which is the number of days of the seminiferous cycle during which these spermatids are present in the seminiferous epithelium. In the same manner, caput/corpus and cauda epididymidis were cut into small fragments with scissors and homogenized, and sperm counted as described for the testis. The sperm transit time through the epididymis was determined by dividing the number of sperm in each portion by DSP.

Fertility assessment

For this, *in utero* artificial insemination was used [22,23,24,25,26]. In brief, females in LHRH-induced proestrus were paired with sexually experienced, vasectomized males for 1 hour. Receptive females were selected for the insemination procedure. Eight male rats per group were used for sperm isolation as described elsewhere. Briefly, the sperm were released from the proximal epididymal cauda, first site where fertile sperm is encountered in the rat, by nicking the duct and collecting the sperm in 2 mL of modified human tubular fluid (HTF) medium (Irvine Scientific). After a 10-fold dilution, sperm were counted and each uterine horn was injected with a volume containing 5×10^6 sperm [27]. One female was inseminated per male and when insemination was completed, the abdominal musculature was sutured.

Twenty days later, the females were euthanized by decapitation to enable fertility evaluation. After collection of the uterus and ovaries the numbers of corpora lutea, implants and reabsorptions were recorded and the following endpoints determined: fertility potential (efficiency of implantation): $\text{implantation sites/corpora lutea} \times 100$; rate of pre-implantation loss: $(\text{number of corpora lutea} - \text{number of implantations}) / \text{number of corpora lutea} \times 100$; rate of post-implantation loss: $(\text{number of implantations} - \text{number of live fetuses}) / \text{number of implantations} \times 100$.

Sperm motility

Sperm motility was evaluated in the same sperm sample used for AI. For this, an aliquot of 10 μL of sperm suspensions was immediately transferred to a Makler chamber maintained at 34°C. Using a phase-contrast microscope (400 $\times$ magnification), 100 sperm were counted and classified as Type A (mobile with progressive movement) Type B (mobile without progressive movement) and Type C (immobile).

Sperm morphology

An aliquot of 100 μl from the same sample used for AI was added to 900 μl of formol saline. To analyze sperm morphologically, smears were prepared on histological slides that were left to dry for 90 min and 200 spermatozoa per animal were analyzed in a phase-contrast microscope (400 $\times$ magnification). Morphological abnormalities were classified into two general categories: head morphology (without curvature, without characteristic curvature, pin head or isolated form, i.e., no tail attached) and tail morphology (broken or rolled into a spiral) [28]. Sperm were also classified as to the presence or absence of the cytoplasmic droplet.

Experiment 2: Pharmacological reactivity of the epididymal duct and prostate

In this experiment, 34 adult male Wistar rats (110 days old) were used. Twenty-two rats were allocated into two experimental groups: Control and Sibutramine, following the same experimental design described in Experiment 1 and used for the evaluation of isolated distal cauda epididymis duct contractions after *in vivo* treatment.

Seven non-treated male rats were used for the evaluation of the effect of *in vitro* sibutramine administration on the contraction of epididymal duct and 5 non-treated male rats were used for the ventral prostate contraction *in vivo*.

Distal cauda epididymis isolation

The animals were killed by decapitation the whole epididymis was carefully excised and strips from the distal cauda epididymis were dissected to record of isometric contractions as previously described [20]. After a 30 minutes stabilization period, the tissues were repeatedly challenged with 80 mM KCl to evaluate tissue viability and maximal response stabilization.

Distal cauda epididymis contractions induced by sibutramine in vitro

After mounting and stabilization of the tissues a concentration-response curve to NE was obtained by the cumulative addition of the agonist to the organ bath and this curve was taken as control curve. New concentration-response curves to NE were obtained in the presence of sibutramine (1, 3, and 7 μ M) incubated for at least 30 minutes with the tissues and the maximal tension developed (E_{max} , in millinewtons - mN) and the potency of NE in inducing contractions of epididymal duct (expressed as pEC_{50} , the $-\log$ of NE concentration inducing 50% of maximal response) were evaluated.

The dependence of the effects of sibutramine on the cauda epididymis contraction on the neuronal NE reuptake system was investigated. To this end, the effect of sibutramine (3 μ M) on the concentration-response curves to methoxamine, a α_1 -ARs-selective agonist that is a poor substrate for the neuronal NE reuptake system [29], was investigated. Contractions in the presence of sibutramine were normalized to the maximal contractions of control curves. In addition, as sibutramine *per se* induced contractions of cauda epididymal duct, contractions induced by sibutramine were recorded in the presence of nifedipine (300nM) to investigate the dependence on the extracellular calcium influx through L-type voltage-dependent calcium channels. The sum of any phasic or tonic activity in 5 minutes (mN) was evaluated.

Ex vivo assay: In vitro contractions of the isolated distal cauda epididymal duct of animals treated with sibutramine or vehicle in vivo

The animals were weighed and euthanized by decapitation 24 hours after the last sibutramine administration. Strips from distal cauda epididymis from 8 animals/group were prepared for the *in vitro* contraction recording as described above. After the stabilization period and challenge with 80 mM KCl a cumulative concentration-response curve to NE was obtained and the maximal contraction (E_{max}) and the potency of NE in inducing contractions of epididymal duct (pEC_{50}) were evaluated. Another new concentration-response curve to NE

1 was constructed in the presence of 6 μ M cocaine to evaluate the functioning of neuronal NE
2 reuptake system.

3 In addition, strips of cauda epididymis from 3 rats/group were isolated and mounted as
4 described above. Concentration-response curves to tyramine, an amine that releases
5 intravesicular NE from the sympathetic nerve terminals [30,31], were evaluated. To ascertain
6 whether the endogenous NE pool in the cauda epididymis was different between vehicle and
7 sibutramine-treated rats the magnitude of antagonism of the α_1 -AR competitive antagonist
8 prazosin (10nM) was evaluated.

9 10 *In vivo contraction of ventral prostate*

11 The *in vivo* prostate contraction was evaluated as described by Kontani & Shiraoya
12 [32]. Adult male rats (120 days old, 500 g weight) were anesthetized with urethane (1.5 g/kg,
13 sc) and the prostate ventral lobes were tied with a cotton thread and attached to an isometric
14 force transducer under 9.8mN resting tension. The right jugular vein was catheterized with
15 polyethylene tubing (PE10 connected to PE50) to intravenous drug administration and the
16 body temperature was maintained by a heating lamp. After a 30 minutes stabilization period a
17 cumulative dose-response curve to NE (0.1-10 μ g/kg) was constructed by intravenous
18 administration of NE and this curve was considered as a control curve as preliminary
19 experiments showed that at least three consecutive concentration–response curves are similar
20 in respect to sensitivity and maximal response. A new dose response curve to NE was
21 repeated 30 minutes after the control curve in the presence of sibutramine 5 mg/kg
22 intravenously administrated 15 minutes before the curve construction. The tension developed
23 (mN) were evaluated.

24 25 **Statistical analysis**

26 Data are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM) or median and interquartil
27 range. Student's t-test or ANOVA followed by Dunnet were used for comparison of
28 parametric variables. Nonparametric variables were compared by Mann-Whitney test or
29 Kruskal-Wallis followed by Dunn test. Spearman "r" coefficient was calculated to investigate
30 possible correlations between fertility potential and sperm motility. Differences were
31 considered significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed by GraphPad
32 InStat (version 5).

RESULTS

Experiment 1:

At the end of the experiment sibutramine-treated rats showed significant reductions in body weight, as well as reductions in the weights of the epididymis, ventral prostate and seminal vesicle (Table 1).

There were no significant differences in serum levels of testosterone, LH, or FSH, nor in the percentages of morphologically normal sperm between groups (data not shown). On the other hand, sibutramine exposure lead to a significant reduction in sperm reserves and transit time in the epididymal cauda (Table 2).

Fertility and sperm quality of proximal cauda epididymis sperm, assessed by *in utero* insemination, was significantly reduced by sibutramine exposure as shown by the significant reductions in fertility potential and pre-implantation loss rate (Table 3). Sperm motility and fertility potential were positively correlated ($p < 0.01$) (Figure 1).

Experiment 2:

The tension developed (contractile activity sum) by the distal cauda epididymis duct increased ($p < 0.05$) in the presence of different *in vitro* sibutramine concentrations (1, 3 and 7 μM) (Figure 2A). These contractions were abolished in the presence of nifedipine, a high affinity L-type calcium channel blocker (Figure 2B).

In the absence of sibutramine, NE induced concentration-dependent contractions of the distal cauda epididymis duct registered a potency of $\text{pEC}_{50} = 5.697 \pm 0.041$. Incubation with sibutramine 1, 3, and 7 μM increased the sensitivity of the distal cauda epididymis to NE by approximately 8 ($\text{pEC}_{50} = 6.580 \pm 0.069$), 15 ($\text{pEC}_{50} = 6.862 \pm 0.069$), and 16-fold ($\text{pEC}_{50} = 6.898 \pm 0.091$), respectively. This increased sensitivity ($p < 0.05$) is shown by a leftward shift in the concentration-response curve to NE (Figure 3A). In addition, sibutramine 7 μM reduced the maximal contractions induced by NE by approximately 29% ($p < 0.001$).

To examine whether the increase in NE-induced contractions of epididymal duct by *in vitro* sibutramine would be ascribed to the blocking of neuronal NE reuptake system, the effects of 3 μM sibutramine (effective contraction-dependent concentration by NE) were investigated against contractions of epididymal duct induced by the α_1 -ARs agonist methoxamine. No changes were observed on the maximal contractile response or in the potency of methoxamine-induced contractions of epididymal duct (pEC_{50} control curve = 5.590 ± 0.071 ; pEC_{50} sibutramine 3 μM = 5.802 ± 0.086 , $p > 0.05$) (Figure 3B).

1 Cumulative intravenous administration of NE induced dose-dependent contractions in
2 the ventral prostate of rats. After administration of 5 mg/kg sibutramine the NE dose-response
3 curve was displaced leftward by approximately 3-fold due to increase in the contractions
4 induced by NE 1 and 3 $\mu\text{g/kg}$ (Figure 4).

5 The concentration-response curve to NE from control group ($\text{pEC}_{50} = 6.128 \pm 0.059$)
6 was similar to *in vivo* sibutramine treated rats ($\text{pEC}_{50} = 6.170 \pm 0.057$) (Figure 5A). Curves to
7 NE obtained in the presence of 6 μM cocaine in tissues from rats from both groups were
8 similar showing that the functioning of the neuronal NE reuptake system was not modified
9 (Figure 5A).

10 There was no difference in the potency between the control ($\text{pEC}_{50} = 4.520 \pm 0.107$)
11 and the sibutramine-treated group ($\text{pEC}_{50} = 4.577 \pm 0.282$) (Figure 5B) in the concentration-
12 dependent contractions induced by tyramine. However, the E_{max} decreased ($p < 0.05$) in the
13 treated group (Figure 5B). Interestingly, the maximal response induced by tyramine in the
14 cauda epididymis from sibutramine-treated rats, but not from control rats, was increased when
15 a new concentration-response curve to tyramine was repeated 30 minutes after a
16 concentration-response to NE. Consequently, the difference between the maximal response to
17 tyramine in the cauda epididymis from vehicle and sibutramine-treated rats was reduced
18 (Figure 5C). These results suggest that the endogenous NE reserve in the cauda epididymis
19 from sibutramine-treated rats is reduced.

20 Figure 6 shows that prazosin, a α_1 -ARs competitive antagonist, was approximately 3-
21 fold more potent against NE-induced contractions in the epididymal cauda from sibutramine-
22 treated rats than in the vehicle-treated rats.

23

DISCUSSION

Currently, there are some reports in the literature on the direct and indirect effects of sympathomimetic drugs on reproductive organs [12,20,33,34,35,36], however there are no extensive studies on the mechanisms involved. In this study, we report pharmacological mechanisms by means sibutramine, a serotonin-NE reuptake inhibitor, promotes increased sensitivity to NE in the rat epididymal duct and ventral prostate and promotes NE depletion in the epididymis. These alterations were accompanied by reduced sperm quality and fertility.

Sibutramine inhibits the presynaptic reuptake of monoaminergic neurotransmitters in the central nervous system and this inhibition promotes appetite suppression and weight loss [18]. Thus, the reduction of body weight of the animals treated with sibutramine confirms the efficiency of this anorexigenic drug. However, it is known that increasing anorexigenic activity promotes increase in energy expenditure and induction of peripheral sympathomimetic effects such as blood pressure increased and other effects on different systems [18].

The determination of absolute and relative weights of organs provides important parameters for assessing the risk of toxicity on the male genital system [3,37]. In the present study there was a reduction in the absolute and relative weights of the ventral prostate and the absolute weight of seminal vesicle and epididymis. It is known that the autonomic nervous system plays an important role in growth, maturation and secretory function of the prostate, an androgen-dependent gland [38] and prostatic fluid release is modulated by the action of sympathetic fibers through stimulation of $\alpha 1$ -ARs [8,39,40]. As the testosterone levels of sibutramine-treated rats were not changed, the reduction of ventral prostate weight of sibutramine-treated animals may be due to the sympathomimetic effect of this drug [16,41,42]. This hypothesis was supported by our results showing that the *in vivo* prostate contractions induced by NE were increased by sibutramine. As the seminal vesicle also receives a dense sympathetic innervations, it is very likely that the same mechanism was responsible for the decrease in the weight of this organ. [12]. The reduction in epididymis weight may be due to the observed reduction in sperm reserves provoked by sperm transit time acceleration, as a result of the increased sensitivity of the epididymal duct as shown by the results of the pharmacological assays, as described below.

Sperm transit time through the epididymis plays an important role in post-testicular sperm maturation. The sympathetic innervation, mainly mediated by activation of $\alpha 1$ -ARs, is associated with smooth muscle layer of the epididymal cauda, whose contractions mediates sperm passage through the epididymis [2,5,6]. Thus, drugs acting on the sympathetic system

or directly on the contractile activity of the epididymis, have an important impact on sperm transit time [23,43,44]. The present study corroborates previous works showing that an acceleration of sperm transit time in the cauda epididymis, as registered in sibutramine-treated rats, reduces sperm quality and fertility [3,20,24,25].

In the present work, sibutramine *per se* induced contraction of epididymal duct and increased potency of the NE-induced contractions of this duct. The increase in the mechanical activity of the distal cauda epididymis was abolished in the presence of nifedipine, a specific L-type calcium channel blocker [45]. As previous studies showed that sibutramine blocks voltage-dependent K⁺ channel [12,20,36,46,47] it is possible that the resulting membrane depolarization opens L-type calcium channels, influx of extracellular calcium and contraction.

The increased sensitivity of epididymal duct to NE can be explained by neuronal reuptake block promoted by sibutramine [19]. This hypothesis is substantiated by our results showing that sibutramine increased the potency of contractions induced by NE, but not those induced by methoxamine, a selective α_1 -adrenoceptor agonist that is not captured by the neuronal uptake system [48]. Thus, NE reuptake inhibition by sibutramine is the main mechanism that increases the sensitivity of the epididymal cauda duct to this neurotransmitter.

Interestingly, the contractions of epididymal duct isolated from sibutramine-treated rats to exogenous noradrenaline were not changed. This could be due to the *in vivo* drug metabolism, as the epididymal duct was isolated for the pharmacological reactivity 24 hours after the last sibutramine administration. In addition, the nutrient solution changes during the stabilization period *in vitro* may have removed all or part of the sibutramine in contact with the epididymal duct. Despite of unaltered epididymal duct maximal tension, sibutramine sub-chronic treatment reduced epididymal cauda endogenous NE reserves, as shown by the reduced contraction of epididymal duct to tyramine, an amine that induces the release of NE stored in presynaptic vesicle [30,31,49]. This was reinforced by the recovery of tyramine-induced maximal contractions after the addition of exogenous NE. In addition, prazosin, a competitive α_1 -AR antagonist, inhibited the contractions induced by tyramine [50].

Altogether, the pharmacological assays showed that sibutramine, in this experimental design, acts through independent mechanisms in the epididymal duct: inducing NE reserves depletion in the epididymal pre-synaptic ends and increase smooth cells sensitivity to this neurotransmitter.

In a previous work from our laboratory rat fertility, assessed by natural mating, did not alter after sibutramine-treatment, despite a significant decrease in cauda epididymis reserves [20]. Since rodents produce an excess of qualitatively normal sperm [26], it was necessary to

1 use a technique to increase the sensitivity of the fertility test and obtain information on sperm
2 quality. Moreover, this technique excludes the interference of factors such as changes altered
3 sexual behavior pattern and reduction in ejaculated sperm numbers [3,24,25]. In the present
4 work, fertility potential and the pre-implantation loss, complementary endpoints, were altered
5 after sibutramine-treatment, suggesting that the acceleration of sperm transit time impaired
6 sperm maturation in the epididymis, decreasing sperm quality and, consequently, fertility
7 [3,4]. Interestingly, the discrete decrease in sperm motility in the treated group was positively
8 correlated with fertility results, [51].

9 In conclusion, our results confirm that adult rats subchronically exposed to
10 sibutramine present a significant reduction in epididymal sperm reserves, acceleration of
11 sperm transit time, and increased epididymal duct sensitivity to NE. *In utero* artificial
12 insemination revealed detrimental effects of sibutramine on fertility and sperm quality. A
13 plethora of pharmacological reactivity assays of cauda epididymis duct and ventral prostate,
14 detailed described and validated, showed that epididymal norepinephrine depletion exerted by
15 sibutramine, associated with decreases in sperm transit time, quantity and quality, leading to
16 reduced fertility, reinforces the concerns about the possible impact on fertility of man taking
17 sibutramine as well as other non-selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors,
18 especially considering the lower reproductive efficiency of humans compared to other males.
19 Additional investigations on the epididymal duct contractility and fertility after longer
20 periods of sibutramine and the possible recovery after treatment withdrawn are encouraged.

21

1 **ACKNOWLEDGEMENTS**

2 We are grateful to Dr. Janete Anselmo-Franci and to Ruither de Oliveira Gomes
3 Carolino of the Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of
4 Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, for the collaboration with the hormonal
5 assays, to Dr. Adriana Lúcia Mendes endocrinologist of the Department of Clinical Medicine,
6 Medicine School of Botucatu, São Paulo State University – UNESP, for the collaboration
7 with the sibutramine prescription, and to José Eduardo Bozano, assisting academic support,
8 of the Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University –
9 UNESP, for the collaboration and assistance throughout the project. We are also grateful to
10 FAPESP (Research Foundation of the State of São Paulo, (Process number 2010/13948-4)
11 and CNPq National Council for Scientific and Technological Development) for financial
12 support.
13

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: CSB, ESAP, LRAK, WGK. Performed the experiments: CSB, GM, MS, RFS, TPB, ESAP, LRAK, JEP. Analyzed the data: CSB, GM, ESAP, LRAK, WGK. Contributed with reagents/materials/analysis tools: WGK, ASP. Wrote the paper: CSB, ESAP, LRAK, WGK. Pharmacological assays: CSB, GM, ESAP, LRAK.

1 REFERENCES

- 2 1. Robaire B HB, Orgebin-Crist MC. (2006) The epididymis. In: Elsevier, editor. Knobil and Neill's Physiology
3 of Reproduction: Neill JD. pp. 1071- 1148.
- 4 2. Sujarit S, Pholpramool C (1985) Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. J
5 Reprod Fertil 74: 497-502.
- 6 3. Fernandez CD, Porto EM, Arena AC, Kempinas Wde G (2008) Effects of altered epididymal sperm transit
7 time on sperm quality. Int J Androl 31: 427-437.
- 8 4. Garcia PV, Barbieri MF, Perobelli JE, Consonni SR, Mesquita Sde F, et al. (2012) Morphometric-
9 stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with
10 finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. Fertil Steril 97: 1444-1451.
- 11 5. Gerendai I, Toth IE, Kocsis K, Boldogkoi Z, Rusvai M, et al. (2001) Identification of CNS neurons involved
12 in the innervation of the epididymis: a viral transneuronal tracing study. Auton Neurosci 92: 1-10.
- 13 6. Ricker DD (1998) The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and
14 fertility. J Androl 19: 1-4.
- 15 7. Ventura S, Pennefather JN (1991) Sympathetic co-transmission to the cauda epididymis of the rat:
16 characterization of postjunctional adrenoceptors and purinoceptors. Br J Pharmacol 102: 540-544.
- 17 8. Pennefather JN, Lau WA, Mitchelson F, Ventura S (2000) The autonomic and sensory innervation of the
18 smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. J Auton
19 Pharmacol 20: 193-206.
- 20 9. Wang JM, McKenna KE, McVary KT, Lee C (1991) Requirement of innervation for maintenance of structural
21 and functional integrity in the rat prostate. Biol Reprod 44: 1171-1176.
- 22 10. Kempinas WG, Petenunci SO, Rosa e Silva AA, Favaretto AL, Carvalho TL (1995) The hypophyseal-
23 testicular axis and sex accessory glands following chemical sympathectomy with guanethidine of pre-
24 pubertal to mature rats. Andrologia 27: 121-125.
- 25 11. Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, et al. (1998) Fertility of rat epididymal sperm
26 after chemically and surgically induced sympathectomy. Biol Reprod 59: 897-904.
- 27 12. Nojimoto FD, Piffer RC, Kiguti LR, Lameu C, de Camargo AC, et al. (2009) Multiple effects of sibutramine
28 on ejaculation and on vas deferens and seminal vesicle contractility. Toxicol Appl Pharmacol 239: 233-
29 240.
- 30 13. Zhou YH, Ma XQ, Wu C, Lu J, Zhang SS, et al. (2012) Effect of anti-obesity drug on cardiovascular risk
31 factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. PLoS One 7: e39062.
- 32 14. Choi JW, Joo JI, Kim DH, Wang X, Oh TS, et al. (2011) Proteome changes in rat plasma in response to
33 sibutramine. Proteomics 11: 1300-1312.
- 34 15. Nisoli E, Carruba MO (2000) An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug
35 with a novel mechanism of action. Obes Rev 1: 127-139.
- 36 16. Jackson HC, Bearham MC, Hutchins LJ, Mazurkiewicz SE, Needham AM, et al. (1997) Investigation of the
37 mechanisms underlying the hypophagic effects of the 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor,
38 sibutramine, in the rat. Br J Pharmacol 121: 1613-1618.
- 39 17. Janhunen SK, van der Zwaal EM, la Fleur SE, Adan RA (2011) Inverse agonism at alpha2A adrenoceptors
40 augments the hypophagic effect of sibutramine in rats. Obesity (Silver Spring) 19: 1979-1986.
- 41 18. Araujo JR, Martel F (2012) Sibutramine effects on central mechanisms regulating energy homeostasis. Curr
42 Neuropharmacol 10: 49-52.
- 43 19. Scheen AJ (2011) Sibutramine on cardiovascular outcome. Diabetes Care 34 Suppl 2: S114-119.
- 44 20. Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Pacini ES, Kiguti LR, et al. (2011) Acceleration of sperm transit
45 time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. J Androl 32:
46 718-724.
- 47 21. Robb GW, Amann RP, Killian GJ (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal
48 and adult rats. J Reprod Fertil 54: 103-107.
- 49 22. Klinefelter GR, Laskey JW, Perreault SD, Ferrell J, Jeffay S, et al. (1994) The ethane dimethanesulfonate-
50 induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis. J
51 Androl 15: 318-327.
- 52 23. Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, et al. (1998) Rat epididymal sperm quantity,
53 quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. Biol Reprod 59: 890-896.
- 54 24. Klinefelter GR (2002) Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire B
55 HB, editor. The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice. New York: Kluwer Academic /
56 Plenum Publisher. pp. 353- 369.
- 57 25. Kempinas WDG, Klinefelter, G.R. (2010) The Epididymis as a Target for Toxicants. Comprehensive
58 Toxicology. pp. 149- 166.
- 59 26. Amann RP (1982) Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. Fundam Appl
60 Toxicol 2: 13-26.

27. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, et al. (1996) Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol* 10: 237-244.
28. Filler R (1993) Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: R.E. Chapin JHH, editor. *Male reproductive toxicology*. California: Academic Press. pp. 334-343.
29. Trendelenburg U, Maxwell RA, Pluchino S (1970) Methoxamine as a tool to assess the importance of intraneuronal uptake of l-norepinephrine in the cat's nictitating membrane. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 172: 91-99.
30. Langeloh A, Bonisch H, Trendelenburg U (1987) The mechanism of the 3H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake1: multifactorial induction of outward transport. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 336: 602-610.
31. Langeloh A, Trendelenburg U (1987) The mechanism of the 3H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake1: role of monoamine oxidase and of vesicularly stored 3H-noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 336: 611-620.
32. Kontani H, Shiraoya C (2002) Method for simultaneous recording of the prostatic contractile and urethral pressure responses in anesthetized rats and the effects of tamsulosin. *Jpn J Pharmacol* 90: 281-290.
33. Ratnasooriya WD, Gilmore DP, Wadsworth RM (1979) Antifertility effect of sympathomimetic drugs on male rats when applied locally to the vas deferens. *J Reprod Fertil* 56: 643-651.
34. Ratnasooriya WD, Gilmore DP, Wadsworth RM (1980) Effect of local application of sympathomimetic drugs to the epididymis on fertility in rats. *J Reprod Fertil* 58: 19-25.
35. Ratnasooriya WD, Wadsworth RM, Gilmore DP (1979) The effect of sympathomimetic drugs on contractility of the vas deferens in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil* 56: 633-641.
36. Jurkiewicz NH, da Silva Junior ED, de Souza BP, Ferreira Verde L, Drawanz Pereira J, et al. (2012) Changes of cytosolic calcium and contractility of young rat vas deferens by acute treatment with amphetamine, fluoxetine or sibutramine. *Eur J Pharmacol* 691: 52-60.
37. Clegg ED, Perreault, D., Klinefelter, G.R. (2001) Assessment of male reproductive toxicity. In: Hayes AW, editor. *Principles and Methods of Toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis. pp. 1263- 1300.
38. Rodrigues AO, Machado MT, Wroclawski ER (2002) Prostate innervation and local anesthesia in prostate procedures. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 57: 287-292.
39. Risbridger GP TR (2006) Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bubourethral Glands. In: JD N, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*: Elsevier. pp. 1149- 1172.
40. Vaalasti A, Hervonen A (1979) Innervation of the ventral prostate of the rat. *Am J Anat* 154: 231-243.
41. Glandt M, Raz I (2011) Present and future: pharmacologic treatment of obesity. *J Obes* 2011: 636181.
42. Haynes WG, Egri Z (2005) Sibutramine and the sympathetic nervous system in obese humans. *Clin Auton Res* 15: 189-192.
43. 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. *J Urol* 143: 625-629.
44. Pholpramool C, Triphrom N (1984) Effects of cholinergic and adrenergic drugs on intraluminal pressures and contractility of the rat testis and epididymis in vivo. *J Reprod Fertil* 71: 181-188.
45. Spedding M, Paoletti R (1992) Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol Rev* 44: 363-376.
46. Kim SE, Ahn HS, Choi BH, Jang HJ, Kim MJ, et al. (2007) Open channel block of A-type, kv4.3, and delayed rectifier K⁺ channels, Kv1.3 and Kv3.1, by sibutramine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321: 753-762.
47. Sobey CG (2001) Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 28-38.
48. Trendelenburg U, Maxwell RA, Pluchino S (1970) Methoxamine as a tool to assess the importance of intraneuronal uptake of l-norepinephrine in the cat's nictitating membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 172: 91-99.
49. Jurkiewicz NH, Garcia AG, Jurkiewicz A (1992) In vitro denervation of the rat vas deferens through hypothermic storage. *British journal of pharmacology* 107: 610-615.
50. Kenakin TP (1997) Competitive Antagonism. In: Kenakin TP, editor. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. 3 ed: Lippincott-Raven. pp. 331-373.
51. Mangelsdorf I, Buschmann J, Orthen B (2003) Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul Toxicol Pharmacol* 37: 356-369.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Sperm motility and correlation with fertility potential. A-C: Sperm motility of control and sibutramine-treated groups. Values expressed as median and interquartile intervals. Mann-Whitney test. **A:** Type A: sperm mobile with progressive movement. **B:** Type B: sperm mobile without progressive movement. **C:** Type C: sperm immobile. **D:** Scatter plot depicting the correlation between fertility potential (%) and sperm motility (%) Type A sperm; n = 10 (5 animals /group). The linear equation for the graph was $y = 2.355x - 62.22$, where y is equal to fertility potential and x corresponds to type A sperm.

Figure 2 - Effects of sibutramine on basal tonus activity of distal epididymal duct *in vitro*. **A:** Tension developed in 5 min in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ vs control (ANOVA followed by Dunnett test). **B:** Tension developed in 5 min in the presence of sibutramine 3 μ M and nifedipine 300 nM. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. $**p < 0.01$ vs control (Student's t- test).

Figure 3 - *In vitro* sibutramine administration increases the potency of NE-induced contractions of cauda epididymis duct. **A:** Concentration-response curves to NE in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine in the cauda epididymis. **B:** Concentration-response curves to methoxamine in the absence and presence of sibutramine 3 μ M in the cauda epididymis. **A-B:** The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Values of pEC₅₀ were different between NE curves, but not methoxamine curves (ANOVA, followed by Dunnett).

Figure 4 - *In vivo* prostate contraction to NE is increased by acute sibutramine administration. Dose-response curves to NE in the ventral prostate before (open symbols) and after (closed symbols) intravenous sibutramine 5 mg.kg⁻¹ administration. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM from 4 rats. $* p < 0.05$ versus contraction induced by the same NE dose before sibutramine administration (Student's t- test).

Figure 5 - *In vivo* sibutramine administration decreases the tyramine-induced contractions of epididymal cauda duct. **A:** Concentration-response curves to NE in control and sibutramine-treated rats in the absence and in the presence of cocaine 6 μ M. **B:** Concentration-response curves to tyramine in control and sibutramine-treated rats. **A-B:** The data are expressed as mean $\pm$ SEM. Values of pEC₅₀ were not different between curves (Student's t- test). **C:** Maximal response (Emax) to tyramine before and after concentration-response curve to NE (nor.). The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. *p < 0.05 (Student's t- test).

Figure 6 – *In vivo* sibutramine administration increases the potency of prazosin-induced antagonism of epididymal contraction to tyramine. Concentration-reponse curves to tyramine in the absence and presence of prazosin 10nM in the cauda epididymis from vehicle (**A**) and sibutramine (**B**) treated rats. Numbers under the arrows indicate the reduction in the potency of tyramine-induced contraction of epididymal segments evaluated at 37% of maximal response of control curves of both groups. Data are mean $\pm$ sem of tissues from 3 rats/group.

1 **TABLE 1**

Final body weight and absolute and relative reproductive organ weights.

Parameters	Control (n=8)	Sibutramine (n=8)
Final body weight (g)	486.55 $\pm$ 14.59	423.34 $\pm$ 11.50 *
Testis (g)	1.99 $\pm$ 0.05	1.88 $\pm$ 0.04
Testis (g/100g)	0.41 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.02
Epididymis (mg)	573.49 $\pm$ 15.81	511.06 $\pm$ 11.81*
Epididymis (mg/100g)	118.87 $\pm$ 4.95	121.45 $\pm$ 4.17
Ventral prostate (mg)	467.24 $\pm$ 27.51	295.57 $\pm$ 19.88 *
Ventral prostate (mg/100g)	96.31 $\pm$ 5.63	69.63 $\pm$ 3.95 *
Seminal vesicle (mg)	1050.60 $\pm$ 57.93	868.16 $\pm$ 56.08 *
Seminal vesicle (mg/100g)	216.67 $\pm$ 11.34	203.90 $\pm$ 10.06

Values expressed as mean $\pm$ SEM. * p<0.05 (Student's t- test).

1 **TABLE 2**

Sperm counts and transit time.

Parameters	Experimental groups	
	Control (n=8)	Sibutramine (n=8)
<i>Sperm count in the testis</i>		
Mature spermatids number ($\times 10^6$ /testis)	259.39 + 12.74	260.68 + 13.76
Relative spermatids number ($\times 10^6$ /g/testis)	159.11 + 3.96	154.16 + 4.94
Daily sperm production ($\times 10^6$ /testis/day)	42.52 + 2.09	42.73 + 2.26
Relative daily sperm production ($\times 10^6$ /testis/g/day)	26.08 + 0.65	25.27 + 0.81
<i>Sperm count in the epididymis</i>		
<i>Caput/ corpus</i>		
Sperm number ($\times 10^6$ /organ)	113.83 + 11.02	119.42 + 10.49
Relative sperm number ($\times 10^6$ /g/organ)	400.85 + 24.59	401.57 + 30.83
Sperm transit time (days)	2.66 + 0.16	2.77 + 0.14
<i>Cauda</i>		
Sperm number ($\times 10^6$ /organ)	295.63 + 15.80	174.68 + 7.11*
Relative sperm number ($\times 10^6$ /g/organ)	1196.9 + 61.00	1003.4 + 83.34
Sperm transit time (days)	7.04 + 0.48	4.16 + 0.26*

Values are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ (Student's t- test).

1 **TABLE 3**Fertility assessment after *in utero* artificial insemination.

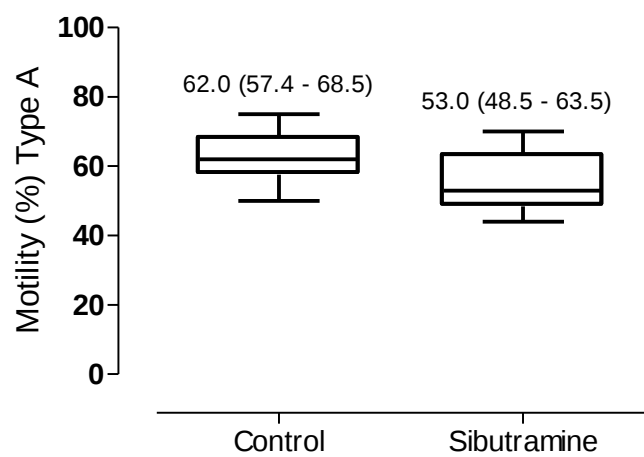
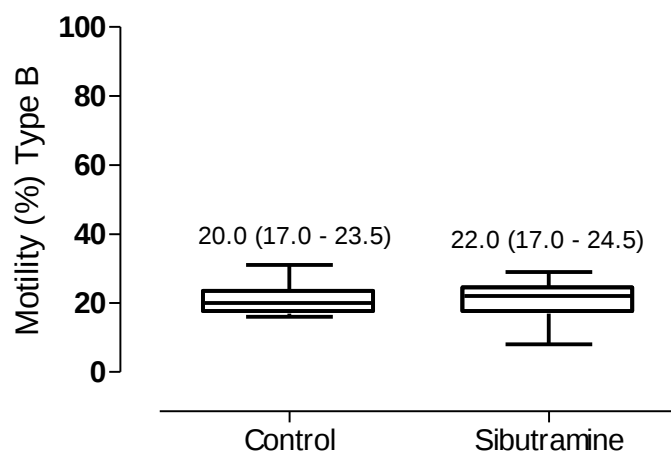
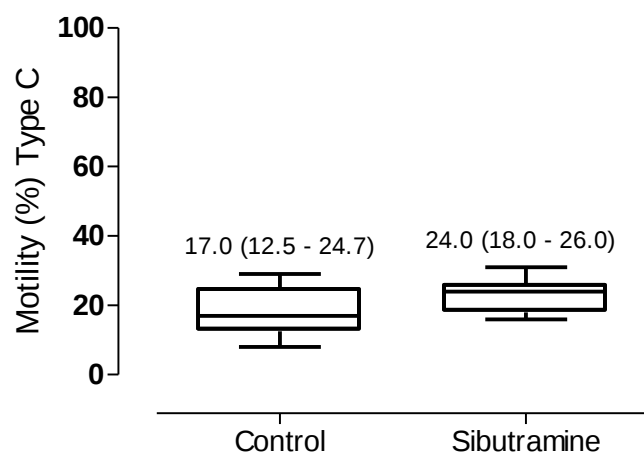
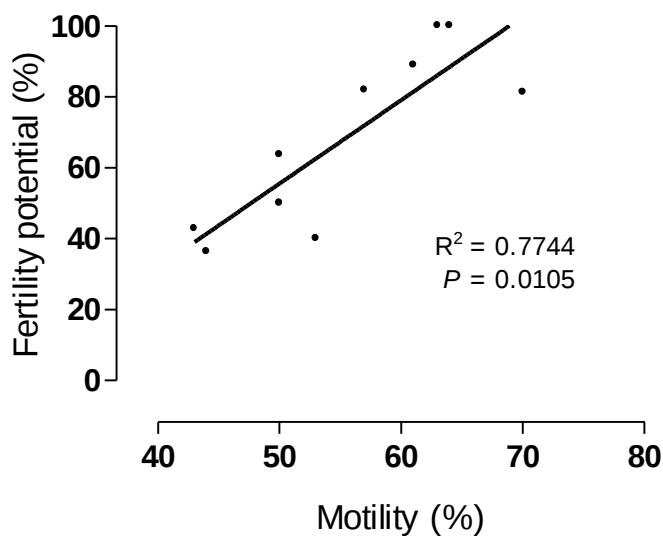
Parameters	Experimental groups	
	Control (n=7)	Sibutramine (n=7)
Pregnancy rate (%)	72	72
¹ Fertility potencial (%)	88.89 (65.91- 100.00)	40.00 (22.72 - 72.44) *
¹ Pre-implantation loss (%)	11.11 (0.00 - 34.09)	60.00 (24.84 - 77.27) *
¹ Post-implantation loss (%)	8.33 (0.00 - 68.75)	15.38 (7.00 - 62.50)
² Body weight of dams (g)	320.32 $\pm$ 23.88	338.38 $\pm$ 22.20
² Uterus weight with fetuses (g)	37.82 $\pm$ 11.73	24.88 $\pm$ 8.40
² Corpora lutea number	9.85 $\pm$ 1.59	11.60 $\pm$ 0.87
² Implantation number	8.81 $\pm$ 1.93	5.80 $\pm$ 2.03
² Number of live fetuses	7.60 $\pm$ 2.31	4.80 $\pm$ 1.82
² Fetus weight (g)	2.57 $\pm$ 0.53	2.56 $\pm$ 0.53

¹ Values expressed as median and interquartile intervals. *p< 0.05 (Mann- Whitney test).² Values expressed as mean $\pm$ SEM. (Student's t- test).

2

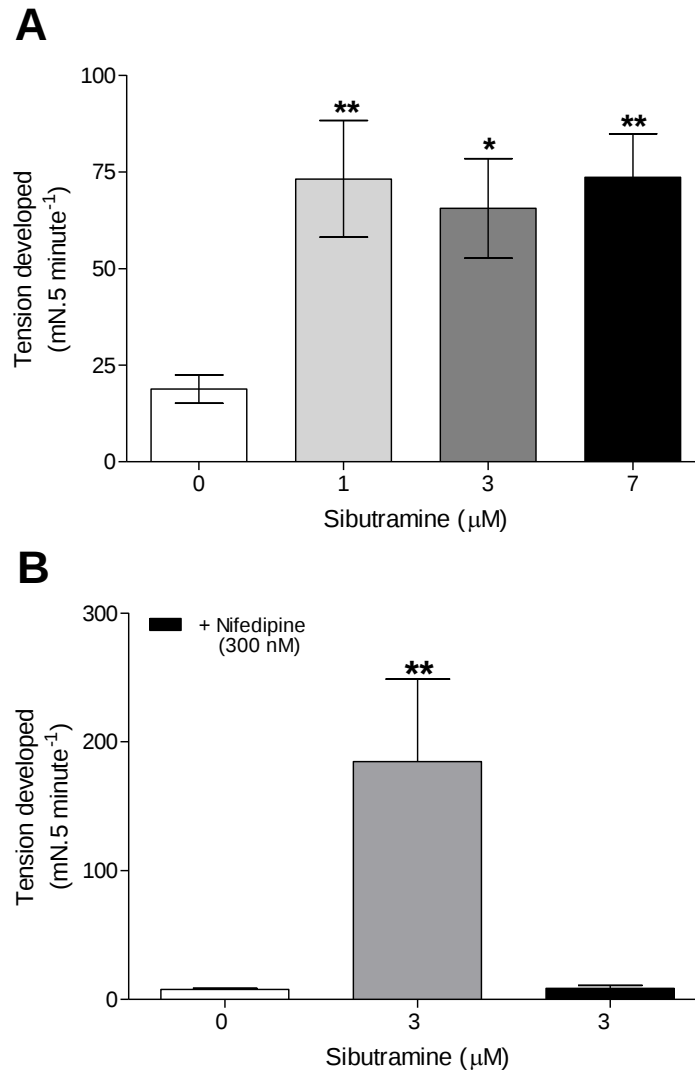
3

FIGURE 1

A**B****C****D**

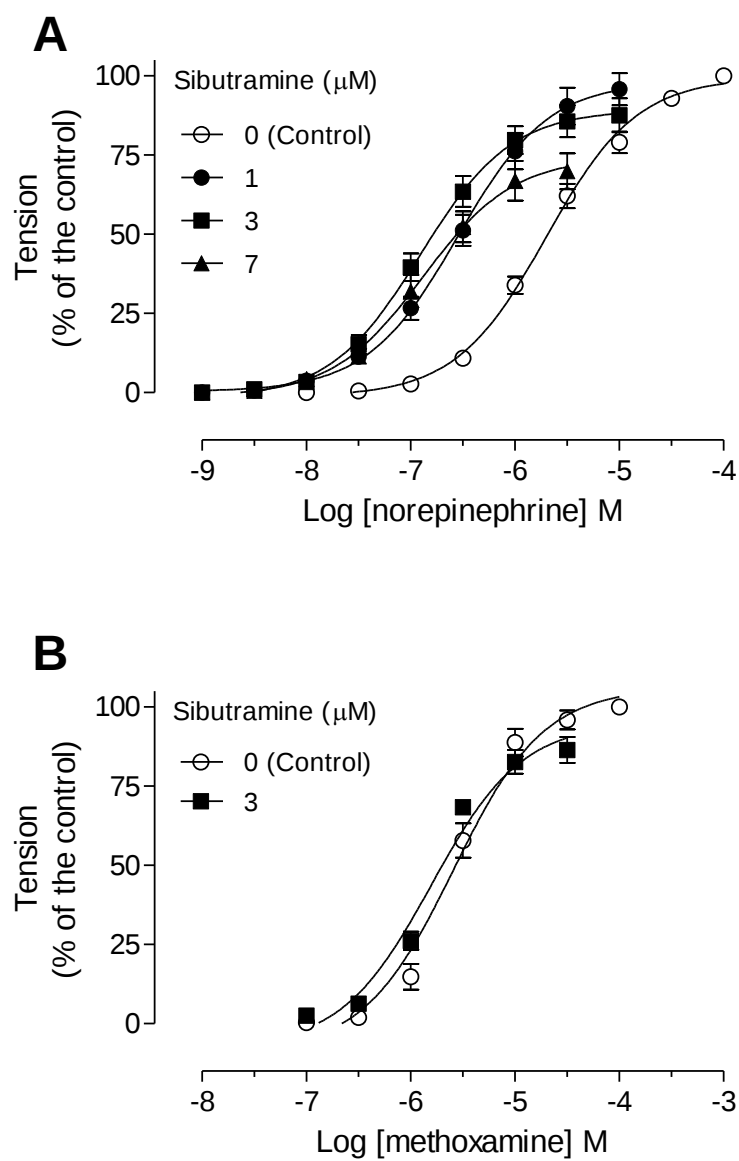
1 **FIGURE 2**

2



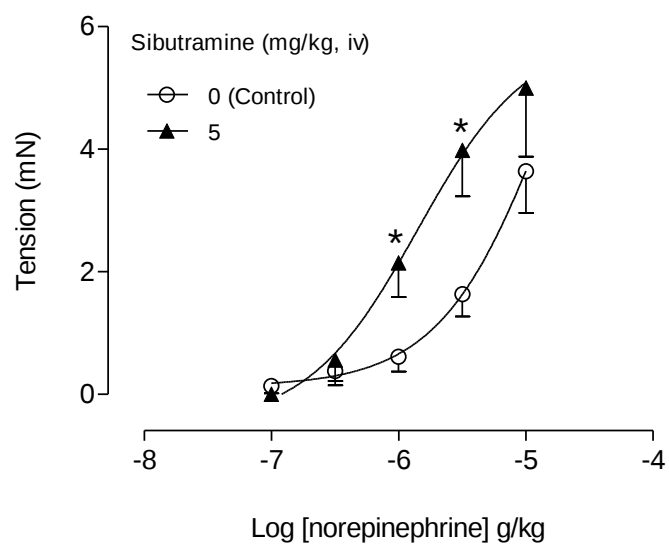
1 **FIGURE 3**

2



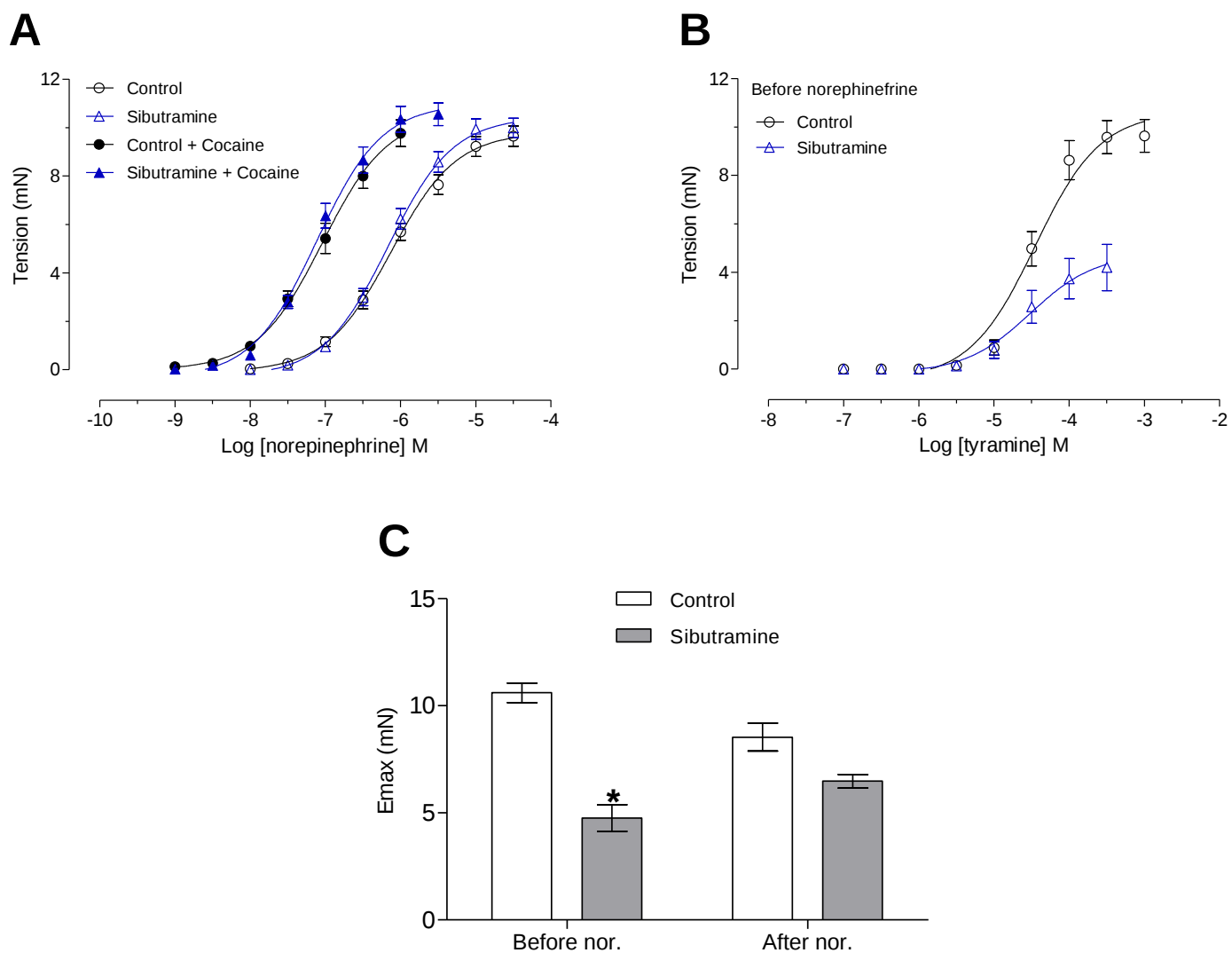
1 **FIGURE 4**

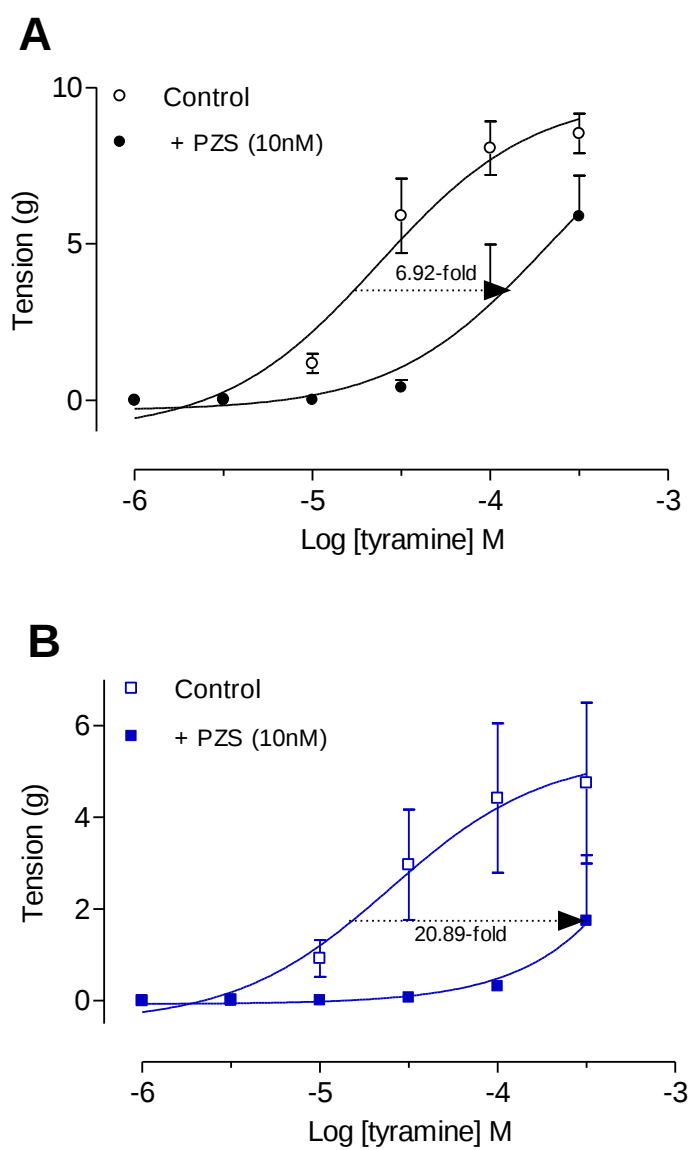
2



1 **FIGURE 5**

2



1 **FIGURE 6**

Conclusões

Nossos resultados sugerem que a sibutramina, embora eficaz na redução do peso corporal, exerce ação sobre a atividade contrátil da próstata ventral e ducto epididimário, mediada pela estimulação $\alpha 1$ -AR, e esta ação deve ser por contato direto entre a droga e o tecido-alvo. Além disso, a aceleração do tempo de trânsito espermático através do epidídimo, comprometendo a qualidade espermática e reduzindo a capacidade fértil dos animais, pode ser devido aos efeitos simpatomiméticos da sibutramina. Os efeitos observados sobre os parâmetros reprodutivos neste modelo experimental sugerem que a sibutramina tenha um impacto sobre a fertilidade masculina humana, uma vez que as reservas espermáticas no homem são naturalmente menores que em roedores.

Referências bibliográficas

- Abbott, D. E., C. Pritchard, N. J. Clegg, C. Ferguson, R. Dumpit, R. A. Sikes and P. S. Nelson (2003). "Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate." Genome Biol **4**(12): R79.
- Al-Zuhair, A., J. A. Gosling and J. S. Dixon (1975). "Observations on the structure and autonomic innervation of the guinea-pig seminal vesicle and ductus deferens." J Anat **120**(Pt 1): 81-93.
- Azhar, S. R., E (2007). Regulation of Leydig Cell Cholesterol Metabolism. The Leydig Cell in Health & Disease. A. H. H. Payne, M.P. New Jersey, Humana Press, Totowa: 135-148.
- Banks, F. C., G. E. Knight, R. C. Calvert, M. Turmaine, C. S. Thompson, D. P. Mikhailidis, R. J. Morgan and G. Burnstock (2006). "Smooth muscle and purinergic contraction of the human, rabbit, rat, and mouse testicular capsule." Biol Reprod **74**(3): 473-480.
- Bellaver, L. H. V., M.A.; Arruda, A.M.; Bellaver, C. (2001). "Efeitos da Dietilpropiona, Energia da Dieta e Sexo Sobre o Ganho de Peso Corporal, Peso dos Órgãos e Deposição de Tecidos em Ratos." Arq. Bras. Endocrinol. Metab. **2**: 45.
- Bellentani, F. F., G. S. Fernandes, J. E. Perobelli, E. S. Pacini, L. R. Kiguti, A. S. Pupo and W. D. Kempinas (2011). "Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine." J Androl **32**(6): 718-724.
- Billups, K. L., S. Tillman and T. S. Chang (1990). "Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens." J Urol **143**(3): 625-629.
- Binsaleh, S. (2012). "Sibutramine for the treatment of recurrent high-flow priapism." J Androl **33**(4): 566-569.
- Bray, G. A. (2010). "Medical therapy for obesity." Mt Sinai J Med **77**(5): 407-417.
- Bray, G. A. and D. H. Ryan (2007). "Drug treatment of the overweight patient." Gastroenterology **132**(6): 2239-2252.
- Bray, G. A. and D. H. Ryan (2011). "Drug treatment of obesity." Psychiatr Clin North Am **34**(4): 871-880.
- Bruschini, H., R. A. Schmidt and E. A. Tanagho (1978). "Neurologic control of prostatic secretion in the dog." Invest Urol **15**(4): 288-290.
- Carpenter, K. M., D. S. Hasin, D. B. Allison and M. S. Faith (2000). "Relationships between obesity and DSM-IV major depressive disorder, suicide ideation, and suicide attempts: results from a general population study." Am J Public Health **90**(2): 251-257.
- Chiocchio, S. R., A. M. Suburo, E. Vladucic, B. C. Zhu, E. Charreau, E. E. Decima and J. H. Tramezzani (1999). "Differential effects of superior and inferior spermatic nerves on testosterone secretion and spermatic blood flow in cats." Endocrinology **140**(3): 1036-1043.
- Choi, J. W., J. I. Joo, D. H. Kim, X. Wang, T. S. Oh, D. K. Choi and J. W. Yun (2011). "Proteome changes in rat plasma in response to sibutramine." Proteomics **11**(7): 1300-1312.
- Chu, D. S. and D. C. Shakes (2013). "Spermatogenesis." Adv Exp Med Biol **757**: 171-203.

- Coutinho, W. and W. P. James (2011). "Sibutramine: balanced judgment or prejudice?" Rev Bras Psiquiatr **33**(2): 115-116.
- Cuasnicú, P. S. C., D.J.; Ellerman, D.A.; Busso, D.; Da Ros, V.G.; Morgenfeld, M.M. (2002). Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. The Epididymis: from molecules to clinical practice. B. H. Robaire, B.T.: 389-403.
- Dahlin, A. and B. Beermann (2007). "Incorrect use of orlistat and sibutramine in clinical practice." Eur J Clin Pharmacol **63**(2): 205-209.
- de Franca, L. R., S. Ghosh, S. J. Ye and L. D. Russell (1993). "Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat." Biol Reprod **49**(6): 1215-1228.
- Diaz, R., L. I. Garcia, J. Locia, M. Silva, S. Rodriguez, C. A. Perez, G. E. Aranda-Abreu, J. Manzo, R. Toledo and M. E. Hernandez (2010). "Histological modifications of the rat prostate following transection of somatic and autonomic nerves." An Acad Bras Cienc **82**(2): 397-404.
- Dixon, J. S. and P. Y. Jen (1995). "Development of nerves containing nitric oxide synthase in the human male urogenital organs." Br J Urol **76**(6): 719-725.
- Dixon, J. S., P. Y. Jen and J. A. Gosling (1998). "Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: a review." Microsc Res Tech **42**(6): 423-432.
- Ellis, L. C., M. D. Groesbeck, C. H. Farr and R. J. Tesi (1981). "Contractility of seminiferous tubules as related to sperm transport in the male." Arch Androl **6**(4): 283-294.
- Erickson, S. J., T. N. Robinson, K. F. Haydel and J. D. Killen (2000). "Are overweight children unhappy?: Body mass index, depressive symptoms, and overweight concerns in elementary school children." Arch Pediatr Adolesc Med **154**(9): 931-935.
- Falck, B., C. Owman and N. O. Sjostrand (1965). "Peripherally Located Adrenergic Neurons Innervating the Vas Deferens and the Seminal Vesicle of the Guinea-Pig." Experientia **21**: 98-100.
- FDA, F. a. D. A. (2011). "Drug Safety Communication: FDA Recommends Against the Continued Use of Meridia (sibutramine)." Retrieved november, 18, 2011, from <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm228746.htm>.
- Fernandez, C. D., E. M. Porto, A. C. Arena and G. Kempinas Wde (2008). "Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality." Int J Androl **31**(4): 427-437.
- Foley, G. L. (2001). "Overview of male reproductive pathology." Toxicol Pathol **29**(1): 49-63.
- Franca, L. R., G. F. Avelar and F. F. Almeida (2005). "Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs." Theriogenology **63**(2): 300-318.
- Francia-Farje, L. A., D. S. Silva, G. T. Volpato, G. S. Fernandes, N. Carnietto, A. C. Cicogna and G. Kempinas Wde (2010). "Sibutramine effects on the reproductive performance of pregnant overweight and non-overweight rats." J Toxicol Environ Health A **73**(13-14): 985-990.

- Fujioka, K., T. B. Seaton, E. Rowe, C. A. Jelinek, P. Raskin, H. E. Lebovitz and S. P. Weinstein (2000). "Weight loss with sibutramine improves glycaemic control and other metabolic parameters in obese patients with type 2 diabetes mellitus." Diabetes Obes Metab **2**(3): 175-187.
- Gerendai, I., P. Banczerowski and B. Halasz (2005). "Functional significance of the innervation of the gonads." Endocrine **28**(3): 309-318.
- Gerendai, I., I. E. Toth, K. Kocsis, Z. Boldogkoi, M. Rusvai and B. Halasz (2001). "Identification of CNS neurons involved in the innervation of the epididymis: a viral transneuronal tracing study." Auton Neurosci **92**(1-2): 1-10.
- Glandt, M. and I. Raz (2011). "Present and future: pharmacologic treatment of obesity." J Obes **2011**: 636181.
- Gocmez, S. S., T. Utkan, G. Ulak, N. Gacar and F. Erden (2010). "Effects of long-term treatment with fluoxetine and venlafaxine on rat isolated vas deferens." Auton Autacoid Pharmacol **30**(3): 197-202.
- Gong, Y. G., Y. Q. Wang, M. Gu, M. M. Feng, W. Zhang and R. S. Ge (2009). "Deprivation of testicular innervation induces apoptosis of Leydig cells via caspase-8-dependent signaling: a novel survival pathway revealed." Biochem Biophys Res Commun **382**(1): 165-170.
- Gong, Y. G., Y. R. Yang, W. Zhang, M. Gu and C. J. Yin (2006). "[Apoptosis in male germ cells induced by testicular denervation]." Zhonghua Nan Ke Xue **12**(11): 968-973.
- Griswold, M. D. (1998). "The central role of Sertoli cells in spermatogenesis." Semin Cell Dev Biol **9**(4): 411-416.
- Hargrove, J. L., J. H. MacIndoe and L. C. Ellis (1977). "Testicular contractile cells and sperm transport." Fertil Steril **28**(11): 1146-1157.
- Hayward, S. W., L. S. Baskin, P. C. Haughney, A. R. Cunha, B. A. Foster, R. Dahiya, G. S. Prins and G. R. Cunha (1996). "Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle." Acta Anat (Basel) **155**(2): 81-93.
- Hayward, S. W., L. S. Baskin, P. C. Haughney, B. A. Foster, A. R. Cunha, R. Dahiya, G. S. Prins and G. R. Cunha (1996). "Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat." Acta Anat (Basel) **155**(2): 94-103.
- Heal, D. J., J. Gosden and S. L. Smith (2009). "Regulatory challenges for new drugs to treat obesity and comorbid metabolic disorders." Br J Clin Pharmacol **68**(6): 861-874.
- Hepp, R. and V. A. Kreye (1973). "Effect of long-term treatment with high doses of guanethidine on sperm transport and fertility of rats." Br J Pharmacol **48**(1): 30-35.
- Hermo L, R. B. (2002). Epididymal cell types and their functions. The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice. H. B. Robaire B. New York, Kluwer Academic/Plenum Publisher: 81-102.
- Hib, J., R. Ponzio and O. Vilar (1984). "Effects of autonomic drugs on contractions of rat seminal vesicles in vivo." J Reprod Fertil **70**(1): 197-202.

- Hib, J., R. O. Ponzio and O. Vilar (1979). "Contractile behaviour of rat epididymis after sympathectomy produced by the administration of guanethidine." Andrologia **11**(6): 461-465.
- Hodson, N. (1964). "Role of the Hypogastric Nerves in Seminal Emission in the Rabbit." J Reprod Fertil **7**: 113-122.
- Hodson, N. (1965). "Sympathetic nerves and reproductive organs in the male rabbit." J Reprod Fertil **10**(2): 209-220.
- Hofbauer, K. G., J. R. Nicholson and O. Boss (2007). "The obesity epidemic: current and future pharmacological treatments." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 565-592.
- Hsieh, J. T., C. T. Chien, S. P. Liu, C. F. Chen and M. K. Lai (1996). "An experimental model to evaluate the in vivo response of rat seminal vesicle to electrical stimulation." Neurosci Lett **204**(3): 215-217.
- Ioannides-Demos, L. L., L. Piccenna and J. J. McNeil (2011). "Pharmacotherapies for obesity: past, current, and future therapies." J Obes **2011**: 179674.
- Jackson, H. C., M. C. Bearham, L. J. Hutchins, S. E. Mazurkiewicz, A. M. Needham and D. J. Heal (1997). "Investigation of the mechanisms underlying the hypophagic effects of the 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor, sibutramine, in the rat." Br J Pharmacol **121**(8): 1613-1618.
- James, W. P., I. D. Caterson, W. Coutinho, N. Finer, L. F. Van Gaal, A. P. Maggioni, C. Torp-Pedersen, A. M. Sharma, G. M. Shepherd, R. A. Rode and C. L. Renz (2010). "Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects." N Engl J Med **363**(10): 905-917.
- Johnson, L. W., T.H.J.R.; Wilker, C.E. (2001). Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. Comprehensive toxicology. M. C. Sipes G, Gandolfi AJ. New York, Elsevier Science Inc. **10**: 6-51.
- Junqueira, L. C. C., J. (2004). Aparelho reprodutor marculino. Histologia Básica. G. Koogan. Rio de Janeiro: 415-431.
- Jurkiewicz, N. H., E. D. da Silva Junior, B. P. de Souza, L. Ferreira Verde, J. Drawanz Pereira, C. Mendes Sobrinho, S. Soubhi Smaili, A. Caricati-Neto, R. Miranda-Ferreira and A. Jurkiewicz (2012). "Changes of cytosolic calcium and contractility of young rat vas deferens by acute treatment with amphetamine, fluoxetine or sibutramine." Eur J Pharmacol **691**(1-3): 52-60.
- Karaguzel, G., G. Gedikoglu, F. C. Tanyel, N. Buyukpamukcu and A. Hicsonmez (1995). "Subsequent biological effects of chemical sympathectomy in rats undergoing unilateral testicular torsion." Eur Urol **28**(2): 147-151.
- Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman and G. R. Klinefelter (1998). "Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 890-896.
- Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. F. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman, M. G. Narotsky, S. D. Perreault, D. P. Evenson, D. D. Ricker and G. R. Klinefelter (1998). "Fertility of

- rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 897-904.
- Kempinas, W. D. G., Klinefelter, G.R. (2010). The Epididymis as a Target for Toxicants. Comprehensive Toxicology. **11**: 149- 166.
- Kempinas, W. G., T. L. Lamano-Carvalho, S. O. Petenusci, R. A. Lopes and R. Azoubel (1988). "Morphometric and stereological analysis of rat testis and epididymis in an early phase of saturnism." Exp Biol **48**(1): 51-56.
- Kierszenbaum, A. L. (2008). Transporte e maturação de espermatozoides. Histologia e Biologia Celular. Elsevier. Rio de Janeiro: 601-639.
- Kihara, K., K. Sato, K. Ishizaka and H. Oshima (1998). "Preservation of ejaculatory function by reconstruction of the canine hypogastric nerve." J Neurosurg **88**(4): 726-733.
- Klinefelter, G. R. H., R.A (1998). Toxicology of the Male Excurrent Ducts and Accessory Sex Glands. Reproductive and Developmental Toxicology. K. K.S: 553- 592.
- Lamano-Carvalho, T. L., A. L. Favaretto, S. O. Petenusci and W. G. Kempinas (1993). "Prepubertal development of rat prostate and seminal vesicle following chemical sympathectomy with guanethidine." Braz J Med Biol Res **26**(6): 639-646.
- Lamano-Carvalho, T. L. G., M.A.; Kempinas, W.G.; Petenusci, S.O.; Rosa-E-Silva, A.A.M (1995). "Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats." Andrologia **28**: 117-122.
- Lamano-Carvalho, T. L. P., S.O.; Favaretto, A.L.V.; Kempinas, W.G. (1990). "Morphometric and biochemical evaluation of the rat prostate and seminal vesicle following chemical sympathectomy with guanethidine." Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie **98**: 225-230.
- Li, M. F. and B. M. Cheung (2011). "Rise and fall of anti-obesity drugs." World J Diabetes **2**(2): 19-23.
- Luccio-Camelo, D. C. and G. S. Prins (2011). "Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals." J Steroid Biochem Mol Biol **127**(1-2): 74-82.
- Mancini, M. C. and A. Halpern (2006). "Pharmacological treatment of obesity." Arq Bras Endocrinol Metabol **50**(2): 377-389.
- Mcphaul, M. J. (1998). The biology of the male reproductive Tract. Reproductive and Developmental Toxicology. K. K.S: 475-508.
- Meridia, P. M. (2002). Compendium of pharmaceuticals and specialties
- Mertens, I. L. and L. F. Van Gaal (2000). "Promising new approaches to the management of obesity." Drugs **60**(1): 1-9.
- Mitchell, G. A. (1935). "The Innervation of the Kidney, Ureter, Testicle and Epididymis." J Anat **70**(Pt 1): 10-32 15.

- Moore, L. L., A. J. Visionsi, M. M. Qureshi, M. L. Bradlee, R. C. Ellison and R. D'Agostino (2005). "Weight loss in overweight adults and the long-term risk of hypertension: the Framingham study." Arch Intern Med **165**(11): 1298-1303.
- Motoc, A., M. C. Rusu and A. M. Jianu (2010). "The spermatic ganglion in humans: an anatomical update." Rom J Morphol Embryol **51**(4): 719-723.
- Narbaitz, R. (1974). Embryology, Anatomy, and Histology of the Male Sex Accessory Glands. Male Accessory Sex Organs. B. D. New York, Academic Press: 03-17.
- Nisoli, E. and M. O. Carruba (2000). "An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug with a novel mechanism of action." Obes Rev **1**(2): 127-139.
- Nojimoto, F. D., R. C. Piffer, L. R. Kiguti, C. Lameu, A. C. de Camargo, O. C. Pereira and A. S. Pupo (2009). "Multiple effects of sibutramine on ejaculation and on vas deferens and seminal vesicle contractility." Toxicol Appl Pharmacol **239**(3): 233-240.
- Pennefather, J. N., W. A. Lau, F. Mitchelson and S. Ventura (2000). "The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies." J Auton Pharmacol **20**(4): 193-206.
- Purves, D. A., G.J.; Fitzpatrick, D. *et al.*,, editors. (2001). Autonomic Regulation of Sexual Function. Neuroscience. D. A. Purves, G.J.; Fitzpatrick, D. *et al.*,, editors. Sunderland (MA).
- Rajala, M. W. and P. E. Scherer (2003). "Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis." Endocrinology **144**(9): 3765-3773.
- Ratnasooriya, W. D. and R. M. Wadsworth (1994). "Tamsulosin, a selective alpha 1-adrenoceptor antagonist, inhibits fertility of male rats." Andrologia **26**(2): 107-110.
- Ricker, D. D. (1998). "The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility." J Androl **19**(1): 1-4.
- Ricker, D. D. and T. S. Chang (1996). "Neuronal input from the inferior mesenteric ganglion (IMG) affects sperm transport within the rat cauda epididymis." Int J Androl **19**(6): 371-376.
- Ricker, D. D., J. K. Crone, S. L. Chamness, G. R. Klinefelter and T. S. Chang (1997). "Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development." J Androl **18**(2): 131-138.
- Risbridger GP, T. R. (2006). Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bubourethral Glands. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. N. JD, Elsevier: 1149- 1172.
- Robaire B, H. B., Orgebin-Crist MC. (2006). The epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, Neill JD: 1071- 1148.
- Rodriguez C M, K. J. L., Hinton B T. (2002). The development of the epididymis. The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice. H. B. Robaire B. New York, Kluwer Academic / Plenum Publisher: 251-267.

- Rosa-e-Silva, A. A., M. A. Guimaraes, T. L. Lamano-Carvalho and W. G. Kempinas (1995). "Chemical sympathectomy blocks androgen biosynthesis during prepuberty." Braz J Med Biol Res **28**(10): 1109-1112.
- Roy-Burman, P., H. Wu, W. C. Powell, J. Hagenkord and M. B. Cohen (2004). "Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development." Endocr Relat Cancer **11**(2): 225-254.
- Rucker, D., R. Padwal, S. K. Li, C. Curioni and D. C. Lau (2007). "Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis." BMJ **335**(7631): 1194-1199.
- Russell, L. D. E., R.A.; Sinha-Hikim, A.P.; Clegg, E.D (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Montreal, Cache River Press.
- Sabuncu, T., M. Harma, Y. Nazligul and F. Kilic (2003). "Sibutramine has a positive effect on clinical and metabolic parameters in obese patients with polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **80**(5): 1199-1204.
- Scheen, A. J. (2011). "Sibutramine on cardiovascular outcome." Diabetes Care **34 Suppl 2**: S114-119.
- Setchell, B. P. (2002). Innervation and vasculature of the excurrent duct system. The epididymis: from molecules to clinical practice. B. H. Robaire, B.T. New York, Klumer Academic/Plenum: 35-48.
- Setchell, B. P. B., W.G (2006). Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. Knobil & Neill's Physiology of Reproduction. J. D. Neill, Elsevier: 771-825.
- Sjostrand, N. O. (1965). "The adrenergic innervation of the vas deferens and the accessory male genital glands." Acta Physiol. Scand **65**(257): 7-82.
- Sosa, Z. Y., M. N. Palmada, M. R. Foscolo, F. Capani, A. Conill and J. C. Cavicchia (2009). "Administration of noradrenaline in the autonomic ganglia modifies the testosterone release from the testis using an ex vivo system." Int J Androl **32**(4): 391-398.
- Sullivan, R., F. Saez, J. Girouard and G. Frenette (2005). "Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract." Blood Cells Mol Dis **35**(1): 1-10.
- Torp-Pedersen, C., I. Caterson, W. Coutinho, N. Finer, L. Van Gaal, A. Maggioni, A. Sharma, W. Brisco, R. Deaton, G. Shepherd and P. James (2007). "Cardiovascular responses to weight management and sibutramine in high-risk subjects: an analysis from the SCOUT trial." Eur Heart J **28**(23): 2915-2923.
- Vaalasti, A. and A. Hervonen (1979). "Innervation of the ventral prostate of the rat." Am J Anat **154**(2): 231-243.
- Van Gaal, L. F., I. D. Caterson, W. Coutinho, N. Finer, A. P. Maggioni, A. M. Sharma, C. Torp-Pedersen, H. Ge, S. A. Moran, G. M. Shepherd and W. P. James (2010). "Weight and blood pressure response to weight management and sibutramine in diabetic and non-diabetic high-risk patients: an analysis from the 6-week lead-in period of the sibutramine cardiovascular outcomes (SCOUT) trial." Diabetes Obes Metab **12**(1): 26-34.

- Van Gaal, L. F. M., I.L.; De Leeuw, I.H (2002). Recent and Future drugs for the Treatment of obesity. Internation textbook of Obesity. P. Björntorp. Göteborg, Sweden, Sahlgrenska Hospital. **31**: 451-469.
- Wang, J. M., K. E. McKenna, K. T. McVary and C. Lee (1991). "Requirement of innervation for maintenance of structural and functional integrity in the rat prostate." Biol Reprod **44**(6): 1171-1176.
- Weeke, P., C. Andersson, E. L. Fosbol, B. Brendorp, L. Kober, A. M. Sharma, N. Finer, P. T. James, I. D. Caterson, R. A. Rode and C. Torp-Pedersen (2010). "The weight lowering effect of sibutramine and its impact on serum lipids in cardiovascular high risk patients with and without type 2 diabetes mellitus - an analysis from the SCOUT lead-in period." BMC Endocr Disord **10**: 3.
- Wesnes, K. A., C. Garratt, M. Wickens, A. Gudgeon and S. Oliver (2000). "Effects of sibutramine alone and with alcohol on cognitive function in healthy volunteers." Br J Clin Pharmacol **49**(2): 110-117.
- WHO, W. H. O. (2011). "Obesity and Overweight." Retrieved november, 18, 2011, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Woolard, J., T. Bennett, W. R. Dunn, D. J. Heal, S. Aspley and S. M. Gardiner (2004). "Acute cardiovascular effects of sibutramine in conscious rats." J Pharmacol Exp Ther **308**(3): 1102-1110.

Apêndices

As figuras e tabela pertencentes a esta seção não foram inclusas no manuscrito, entretanto foram análises realizadas durante a execução do projeto de pesquisa que originou esta dissertação.

Tabela 1. Níveis séricos hormonais.

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Controle (n=8)	Sibutramina (n=8)
FSH (ng/mL)	4,35 $\pm$ 0,28	4,33 $\pm$ 0,23
LH (ng/mL)	2,49 $\pm$ 0,64	2,32 $\pm$ 0,21
Testosterona (ng/mL)	3,55 $\pm$ 0,56	3,37 $\pm$ 0,40
Valores expressos em média $\pm$ EPM. (Teste T-Student).		

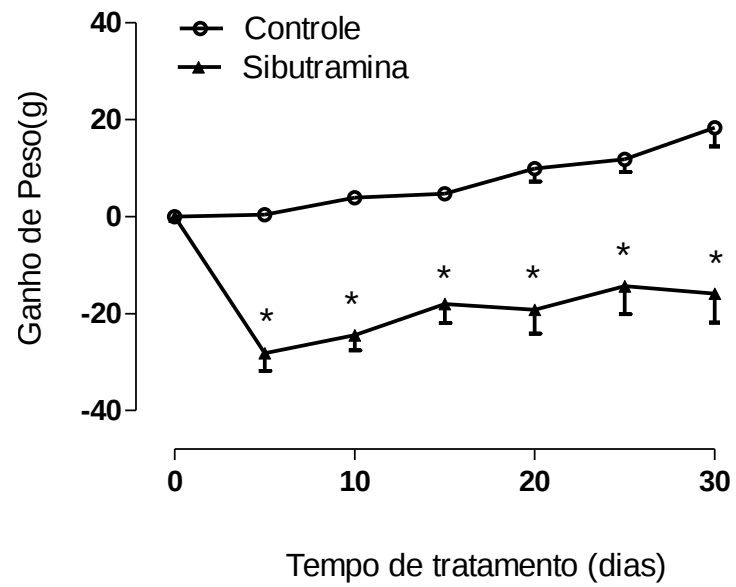


Figura 1: Evolução do ganho de peso corporal do grupo tratado com sibutramina e grupo controle. Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,01$ (Teste t-Student).

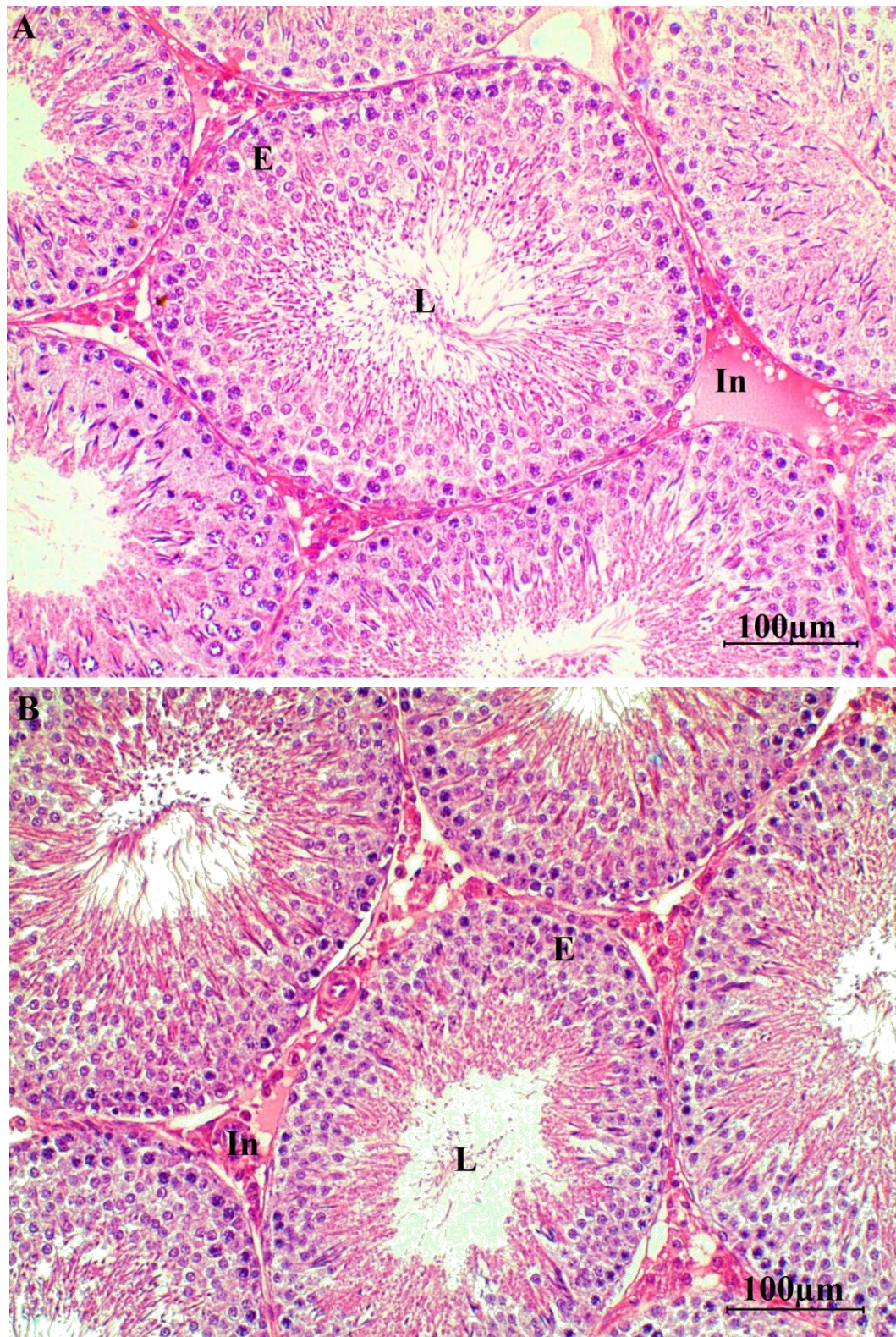


Figura 2: Fotomicrografias de cortes transversais de testículos de ratos adultos, coloração em HE. (A) Grupo Controle, (B) Grupo tratado com 10mg/Kg/dia de Sibutramina. E= Epitélio seminífero; In = Interstício; L= Lúmen. (200x).

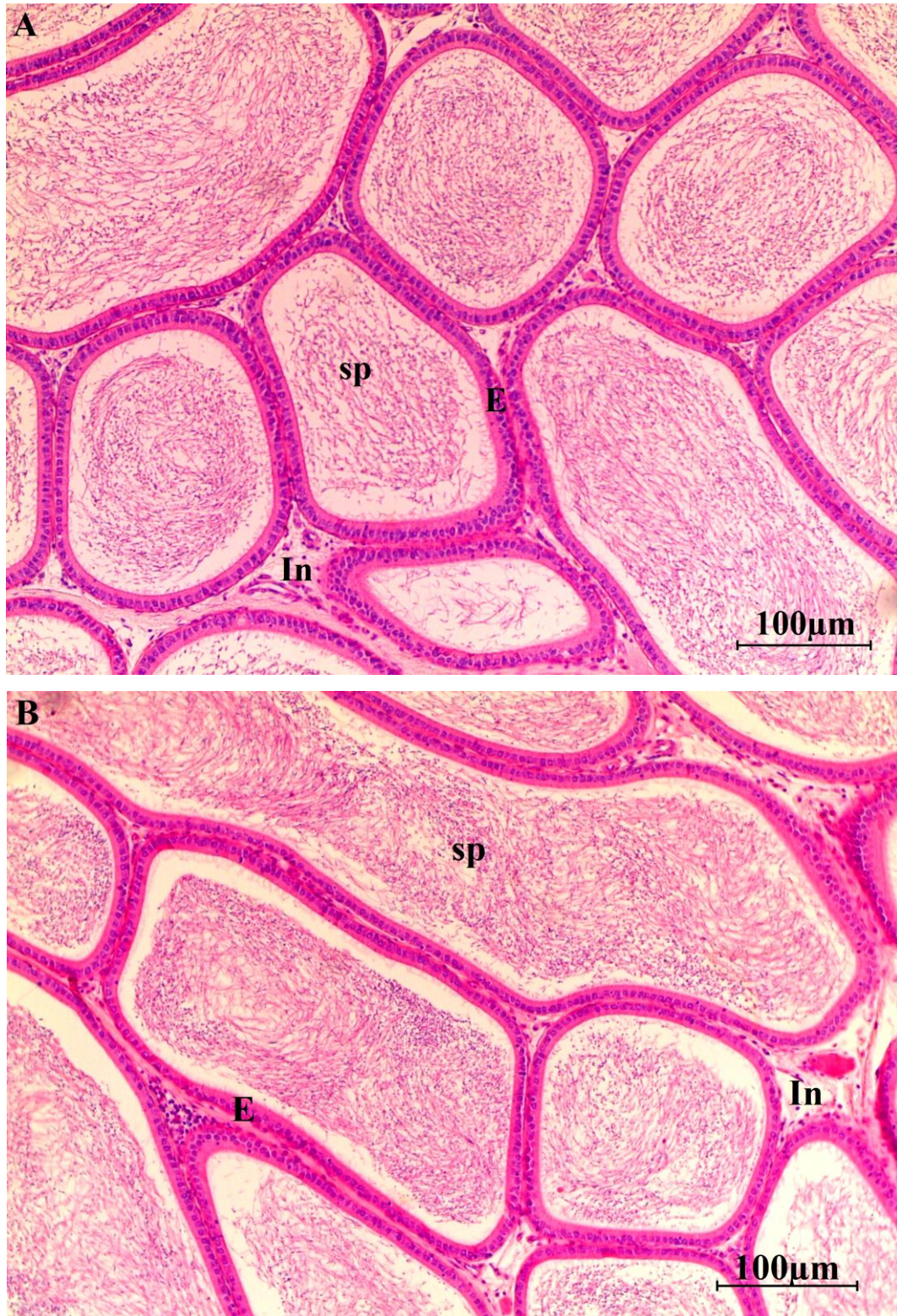


Figura 3: Fotomicrografias de cortes longitudinais da região da cabeça do epidídimo de ratos adultos, coloração em HE. (A) Grupo Controle, (B) Grupo tratado com 10mg/Kg/dia de Sibutramina. E= Epitélio; In = Interstício; sp= Espermatozoides no lúmen epididimário. (200x).

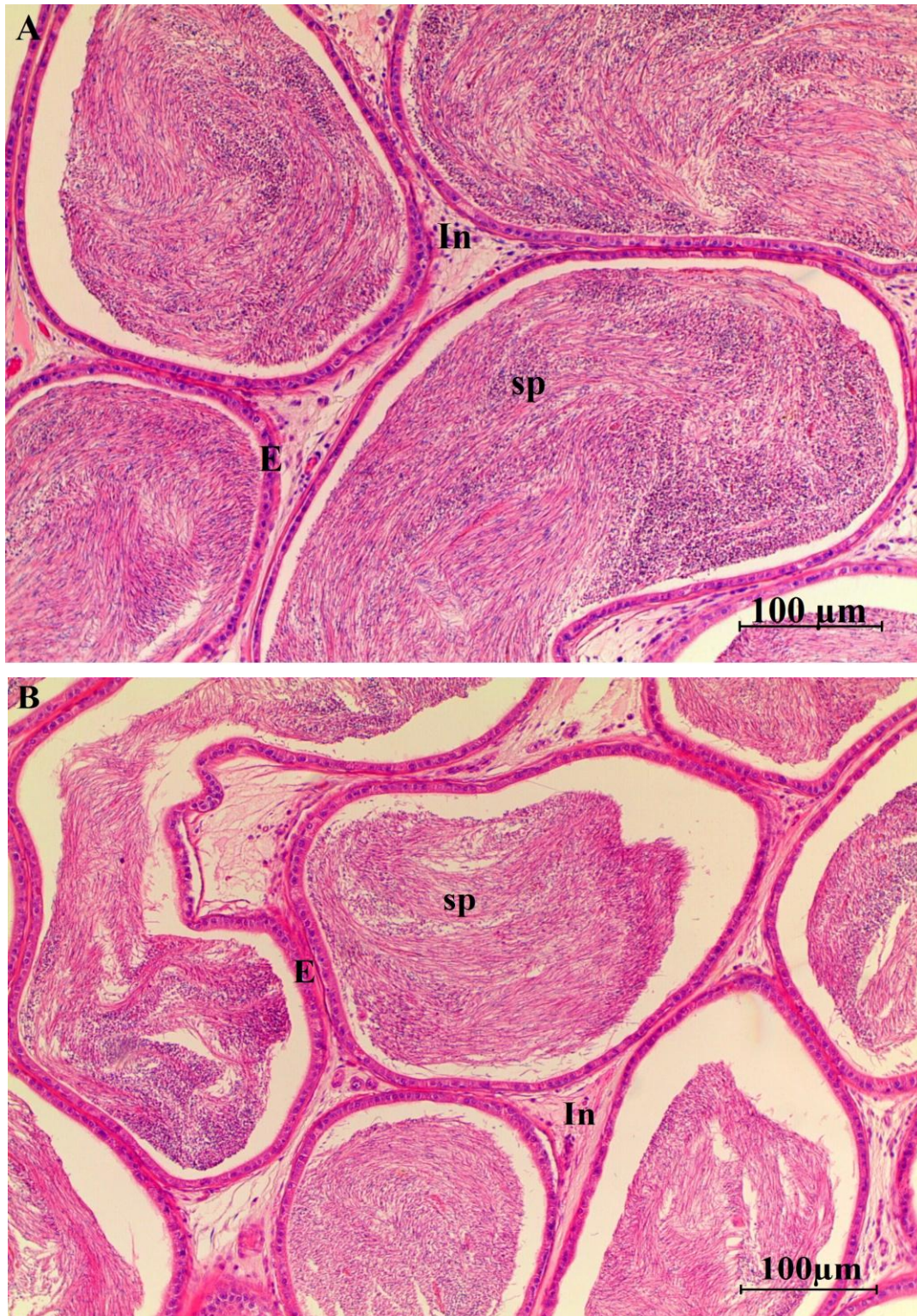


Figura 4: Fotomicrografias de cortes longitudinais da região da cauda do epidídimo de ratos adultos, coloração em HE. (A) Grupo Controle, (B) Grupo tratado com 10mg/Kg/dia de Sibutramina. E= Epitélio; In = Interstício; sp= Espermatozoides no lúmen epididimário. (200x).

Comissão de Ética

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **248-CEEA**, sobre "Efeitos do tratamento com Sibutramina sobre a qualidade espermática de ratos machos Wistar", sob a responsabilidade de **Wilma De Grava Kempinas**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de **01/10/2010**.

Botucatu, 01 de outubro de 2010.


Profª Drª PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO
Presidente - CEEA