

LUIZ RICARDO DE ALMEIDA KIGUTI

VELHAS DROGAS, NOVAS TERAPÊUTICAS:
INVESTIGAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANTAGONISTAS DE
ADRENOCEPTORES α_1 E DE BLOQUEADORES DE CANAIS
DE CÁLCIO NO RETARDO DA EJACULAÇÃO

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

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

Botucatu – SP
2010

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

Kiguti, Luiz Ricardo de Almeida.

Velhas drogas, novas terapêuticas: investigação da utilização de antagonistas de adrenoceptores α_1 e de bloqueadores de canais de cálcio no retardo da ejaculação / Luiz Ricardo de Almeida Kiguti. – Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: André Sampaio Pupo

Assunto CAPES: 21005001

1. Receptores hormonais. 2. Reprodução. 3. Farmacologia molecular.

Palavras chave: Adrenoceptores α_1 ; Bloqueadores de canais de cálcio; Ducto deferente; Ejaculação; Vesícula seminal.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos Luiz Gustavo e Guilherme de Almeida Kiguti pelo apoio, paciência e companheirismo durante o período de graduação e pós-graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Sampaio Pupo pela oportunidade de realização deste trabalho e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira e seus orientados Carina Leonelli, Renata Carolina Piffer, Leandro Barile Agati e Michele Kimie Sankako pelo apoio no processo de padronização das análises do comportamento copulatório de ratos.

À Prof. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi e suas orientadas Caroline Gusson Shimoura, Camila Maschietto e Marília Andreo por me ensinar os procedimentos cirúrgicos para canulação da veia jugular empregado neste estudo e pelo acolhimento no Laboratório de Regulação Hidromineral e Cardiovascular do Departamento de Fisiologia da UNESP/Botucatu.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e molecular de adrenoceptores α_1 Juliana Akinaga, Vanessa Lima, Fernanda Diehl Nojimoto, Enio Setsuo Arakaki Pacini e Martin Loose Estivalet pela contribuição na realização dos experimentos e pelas proveitosas discussões.

Aos professores do departamento de Farmacologia pelas disciplinas da pós-graduação que promoveram meu amadurecimento como pesquisador e contribuíram para o enriquecimento dos procedimentos utilizados neste projeto.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro (processo nº 08/52587-7).

RESUMO

A ejaculação precoce é a disfunção sexual masculina com maiores taxas de incidência e prevalência. De etiologia complexa, as principais abordagens farmacológicas desta condição têm sido a utilização de anestésicos locais, inibidores seletivos da recaptura de serotonina e mais recentemente, inibidores da fosfodiesterase tipo 5. O reflexo ejaculatório é um processo altamente organizado com a interação de áreas centrais encefálicas e espinhais, centros autonômicos simpáticos e parasimpáticos além de reflexos somáticos. O sistema nervoso autônomo simpático, através da ativação de adrenoreceptores α_1 (α_1 -ARs), particularmente o subtipo α_{1A} , desempenha papel fundamental na fase de emissão do reflexo ejaculatório através da modulação da contratilidade de órgãos como o ducto deferente, vesícula seminal e próstata. Além disso, a participação do influxo de cálcio extracelular via canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L (canais de cálcio tipo L) na atividade contrátil destes órgãos é bem caracterizada. Devido à importância dos α_1 -ARs e canais tipo L no reflexo ejaculatório, este trabalho avaliou a eficácia do antagonista de α_1 -ARs Tamsulosin e das diidropiridinas bloqueadoras de canais de cálcio Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina no retardo da ejaculação em ratos. Os resultados obtidos demonstram que a atividade contrátil do ducto deferente e vesícula seminal ao estímulo adrenérgico via ativação de α_1 -ARs *in vitro* é fortemente inibida pelo antagonista de α_1 -ARs Tamsulosin e pelas bloqueadoras de canais de cálcio Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina. Entretanto, embora a contração destes órgãos e, portanto, a fase de emissão do reflexo ejaculatório tenha sido afetada, a latência ejaculatória dos animais não foi alterada. Estes resultados indicam que o bloqueio de canais de cálcio tipo L ou o antagonismo de α_1 -ARs no ducto deferente e vesícula seminal embora efetivos na inibição da fase de emissão do reflexo ejaculatório, não são capazes de retardar a ejaculação. Além disso, os

presentes resultados indicam que a modulação da atividade contrátil dos órgãos participantes da fase de emissão do reflexo ejaculatório não oferece uma alternativa efetiva para o retardo da ejaculação.

Palavras chave: Adrenoceptores α_1 , bloqueadores de canais de cálcio, ducto deferente, ejaculação, vesícula seminal.

ABSTRACT

Premature ejaculation is one of the most common male sexual dysfunctions. With complex aetiology, the main pharmacological approaches involve local anesthetics, selective serotonin reuptake inhibitors and, more recently, phosphodiesterase 5 inhibitors. The sympathetic nervous system plays a crucial role in the ejaculation, controlling vasa deferentia, seminal vesicles and prostate contraction through α_1 -adrenoceptor (α_1 -AR) activation. In addition, the contractions of these organs are dependent on influx of extracellular calcium through L-type voltage-dependent calcium channels (L-type calcium channels). Due to the involvement of α_1 -ARs and L-type calcium channels in the ejaculatory reflex, this dissertation evaluated the efficacy of the α_1 -AR antagonist Tamsulosin and of dihydropyridine calcium channel blockers Nifedipine and (S)-(+)-Niguldipine in the delay of ejaculation in rats. The results showed that the vas deferens and seminal vesicle contraction in response to α_1 -AR activation is potently inhibited by Tamsulosin, Nifedipine and (S)-(+)-Niguldipine. However, although vas deferens and seminal vesicles contractions have been inhibited, the ejaculatory latency *in vivo* was not affected. These results show that although L-type calcium channel blockade and α_1 -ARs antagonism in the vas deferens and seminal vesicle are effective in the inhibition of events related to the seminal emission phase of ejaculation, they are not able to delay the ejaculation. The present results indicate that modulation of contractions of organs involved in seminal emission is not a suitable strategy to retard of ejaculation.

Key words: α_1 Adrenoceptors, calcium channel blockers, vas deferens, ejaculation, seminal vesicle.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
-------------------	----------

HIPÓTESE E OBJETIVOS	13
-----------------------------	-----------

MATERIAL E MÉTODOS

<i>Avaliação dos efeitos da Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin na contratilidade do ducto deferente e vesícula seminais in vitro</i>	14
<i>Análise do comportamento copulatório</i>	17

RESULTADOS

<i>Efeitos da Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin nas contrações induzidas por noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal</i>	24
<i>Avaliação dos efeitos da Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina ou Tamsulosin no comportamento copulatório de ratos machos sexualmente experientes</i>	35

DISCUSSÃO	41
------------------	-----------

CONCLUSÕES	57
-------------------	-----------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
-----------------------------------	-----------

APÊNDICE	67
-----------------	-----------

ANEXOS

<i>Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal</i>	74
<i>Artigo publicado</i>	75

INTRODUÇÃO

A ejaculação é um reflexo complexo controlado por áreas encefálicas e espinhais as quais formam uma rede altamente interconectada. As informações sensoriais genitais da glândula peniana, escroto e uretra são carregadas por aferentes do nervo dorsal do pênis e nervo pudendo até centros específicos na medula espinhal e encéfalo que elaboram e articulam os eventos neurofisiológicos envolvidos na ejaculação (Figura 1).

Estudos neuro-anatômicos e funcionais de detecção da expressão da proteína c-Fos realizados em roedores, particularmente no rato, têm permitido o mapeamento de grupos neuronais ativados após diferentes componentes do comportamento copulatório (Pfaus *et al.*, 1997). No encéfalo, a detecção da proteína c-Fos permitiu a caracterização de um circuito ejaculatório, um grupo de neurônios ativados especificamente após a ejaculação, representado por neurônios na região posteromedial dos núcleos da estria terminal, zona lateral do núcleo posterodorsal da amígdala medial, núcleo pré-optico posterodorsal e porção medial da região parvocelular do núcleo subparafascicular do tálamo (Coolen *et al.*, 1997). Além deste “circuito ejaculatório” outras áreas encefálicas que incluem a área pré-optica medial e o núcleo paraventricular do hipotálamo são ativadas durante o comportamento copulatório.

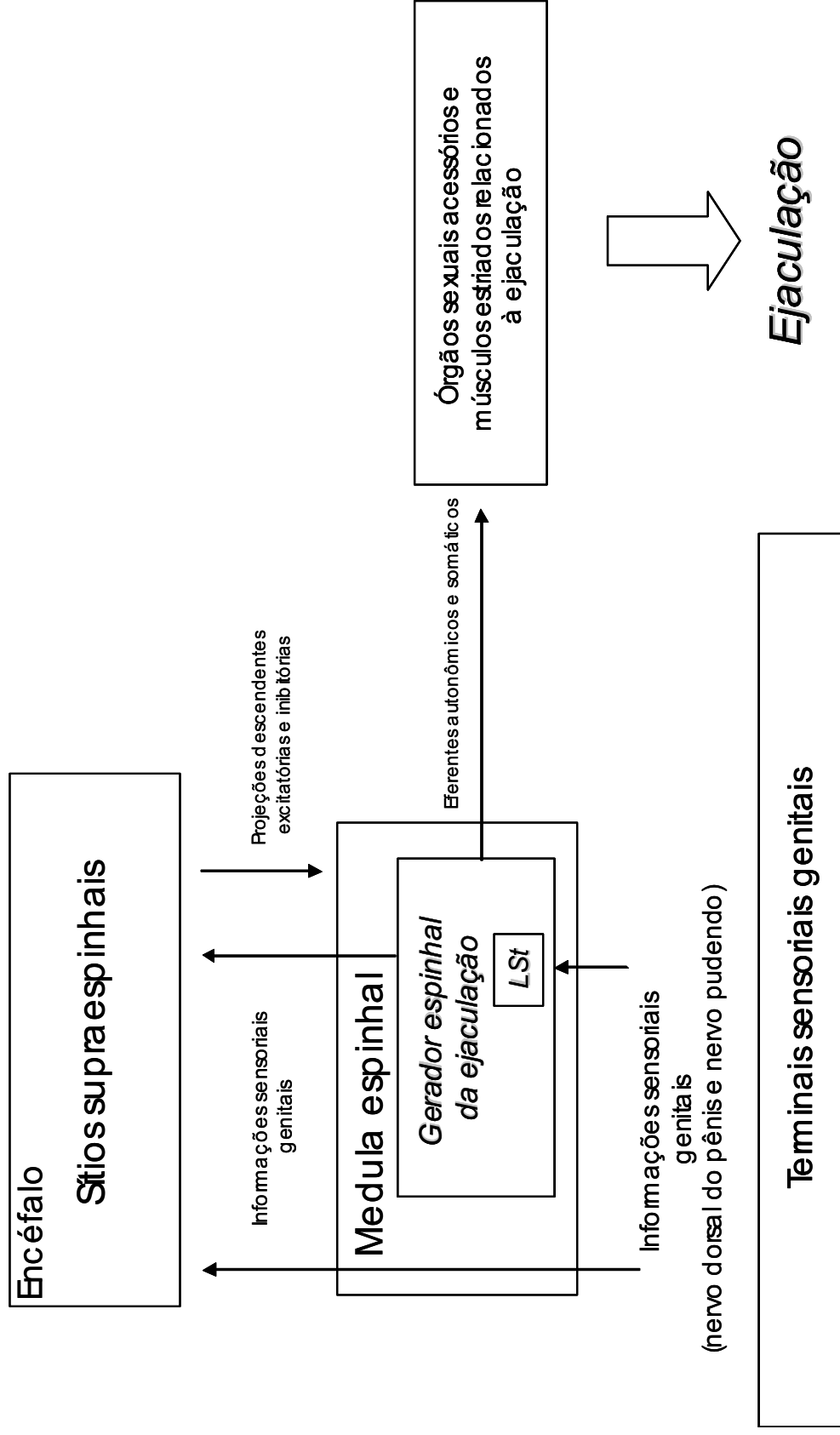


Figura 1. Representação esquemática dos componentes envolvidos no processamento de informações relevantes para a ejaculação. LSt: neurônios espinotalâmicos lombares, vide infra. (modificado de (Coolen *et al.*, 2004)).

Embora o reflexo ejaculatório seja fruto de uma complexa troca de informações entre centros espinhais e sítios supraespinhais, a capacidade de indução de eventos fisiológicos associados à ejaculação em ratos espinalizados (Carro-Juarez *et al.*, 2003) e a observação clínica de que a estimulação vibratória do pênis em homens com lesão na medula espinhal é capaz de induzir ejaculação (Biering-Sorensen *et al.*, 2001) são evidências de que a ejaculação é um reflexo espinhal. De fato, a manutenção da integridade da região lombosacral da medula espinhal é suficiente e essencial para o reflexo ejaculatório. Em conjunto, estas observações têm sido utilizadas para suportar a existência de um gerador espinhal da ejaculação (para revisão ver (Carro-Juarez *et al.*, 2008)). Neste contexto, embora o circuito espinhal relacionado à ejaculação não seja totalmente conhecido, a descoberta do papel essencial dos neurônios espinotalâmicos lombares (neurônios LSt) no reflexo ejaculatório coloca-os como componentes centrais do gerador espinhal da ejaculação (Truitt *et al.*, 2002).

Os neurônios LSt estão localizados nas lâminas VII e X nos segmentos lombares 3 e 4 da medula espinhal e são identificados pela imunoreatividade aos neuropeptídeos galanina, encefalina e colecistocinina. Estes neurônios, ativados especificamente após a ejaculação, possuem projeções diretas para áreas especificamente relacionadas à ejaculação (Coolen *et al.*, 2003) e sua estimulação elétrica direta desencadeia eventos fisiológicos envolvidos no reflexo ejaculatório (Borgdorff *et al.*, 2008). Além disso, a observação de que a lesão dos neurônios LSt abole completamente a ejaculação, mas não outros componentes do comportamento copulatório de ratos, demonstra seu papel fundamental no gerador espinhal da ejaculação (Truitt *et al.*, 2002).

Periféricamente, o reflexo ejacutório envolve a ação coordenada do sistema nervoso autônomo simpático e parasimpático, os quais regulam a atividade de síntese/secreção e a motilidade do epidídimo, ductos deferentes, vesículas seminais e próstata, e de um componente motor somático responsável pela modulação da atividade contrátil de músculos estriados associados ao sistema urogenital masculino. Os componentes neurais responsáveis pelo controle dos eventos relacionados à ejaculação estão organizados em núcleos específicos na região lombosacral da medula espinhal, e são demonstrados na Figura 2.

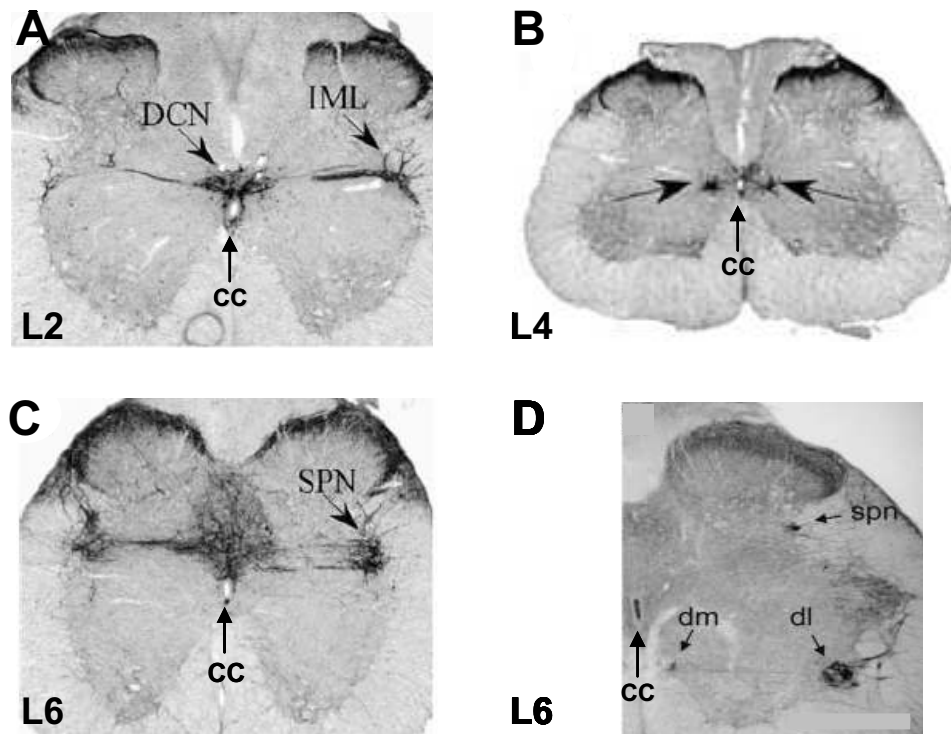


Figura 2. Fontes espinhais de neurônios que inervam o aparelho urogenital masculino. A: Núcleo comissural dorsal (DCN) e colunas intermediolaterais (IML). B: Neurônios espinotalâmicos lombares (setas). C: Núcleo parasimpático sacral (SPN). D: Núcleos dorsomedial (dm), dorsolateral (dl) e parasimpático sacral (spn). CC: canal central. Abreviações no canto inferior esquerdo das figuras representam os segmentos espinhais das figuras como se segue: L2, L4 e L6 segmentos lombares 2, 4 e 6, respectivamente. Figuras em A, B e C modificadas de (Allard *et al.*, 2005), imagem em D modificada de (Doly *et al.*, 2004).

A principal fonte de inervação simpática dos órgãos do sistema urogenital masculino cursa através dos nervos hipogástricos que reúnem axônios de neurônios pré-ganglionares do núcleo comissural dorsal e das colunas intermediolaterais localizados nos segmentos lombares 1 e 2 da medula espinhal (Hancock *et al.*, 1979; Nadelhaft *et al.*, 1987). A inervação parasimpática é representada por axônios pré-ganglionares provenientes dos núcleos parasimpáticos sacrais (segmentos lombar 6 e sacral 1) que cursam através dos nervos pélvicos (Nadelhaft *et al.*, 1984). Na região pélvica, os eferentes simpáticos e parasimpáticos são distribuídos aos órgãos do sistema urogenital a partir dos gânglios pélvicos principais e acessórios.

Além das células de músculo liso associadas ao ducto deferente e glândulas sexuais acessórias, os músculos isquiocavernoso e bulboesponjoso, ambos músculos estriados, contribuem de maneira efetiva no processo fisiológico da ejaculação. Estes músculos estriados têm sua atividade contrátil controlada por motoneurônios originários dos núcleos dorsolateral e dorsomedial que cursam no ramo motor do nervo pudendo (Schroder, 1980)(McKenna *et al.*, 1986).

Fisiologicamente o reflexo ejaculatório consiste em duas fases distintas, a emissão seminal e a expulsão sendo que em humanos distingue-se ainda uma terceira fase, o orgasmo (Figura 3). A fase de emissão seminal é governada pelo sistema nervoso autônomo e compreende o transporte de espermatozóides armazenados no epidídimo e a secreção e transporte de fluidos seminais das glândulas sexuais acessórias até a uretra através de contrações propulsivas do epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal e próstata. Paralelamente, a ativação do sistema nervoso autônomo simpático durante a emissão seminal promove a contração da musculatura circular do colo da bexiga impedindo, desta forma, o fluxo retrógrado de sêmen para o interior da bexiga urinária. A distensão das paredes da

uretra prostática causada pela deposição do sêmen ativa aferentes sensoriais que desencadeiam reflexos nervosos promovendo contrações rítmicas dos músculos isquiocavernoso e bulboesponjoso culminando na expulsão do sêmen pelo meato da uretra, a ejaculação propriamente dita.

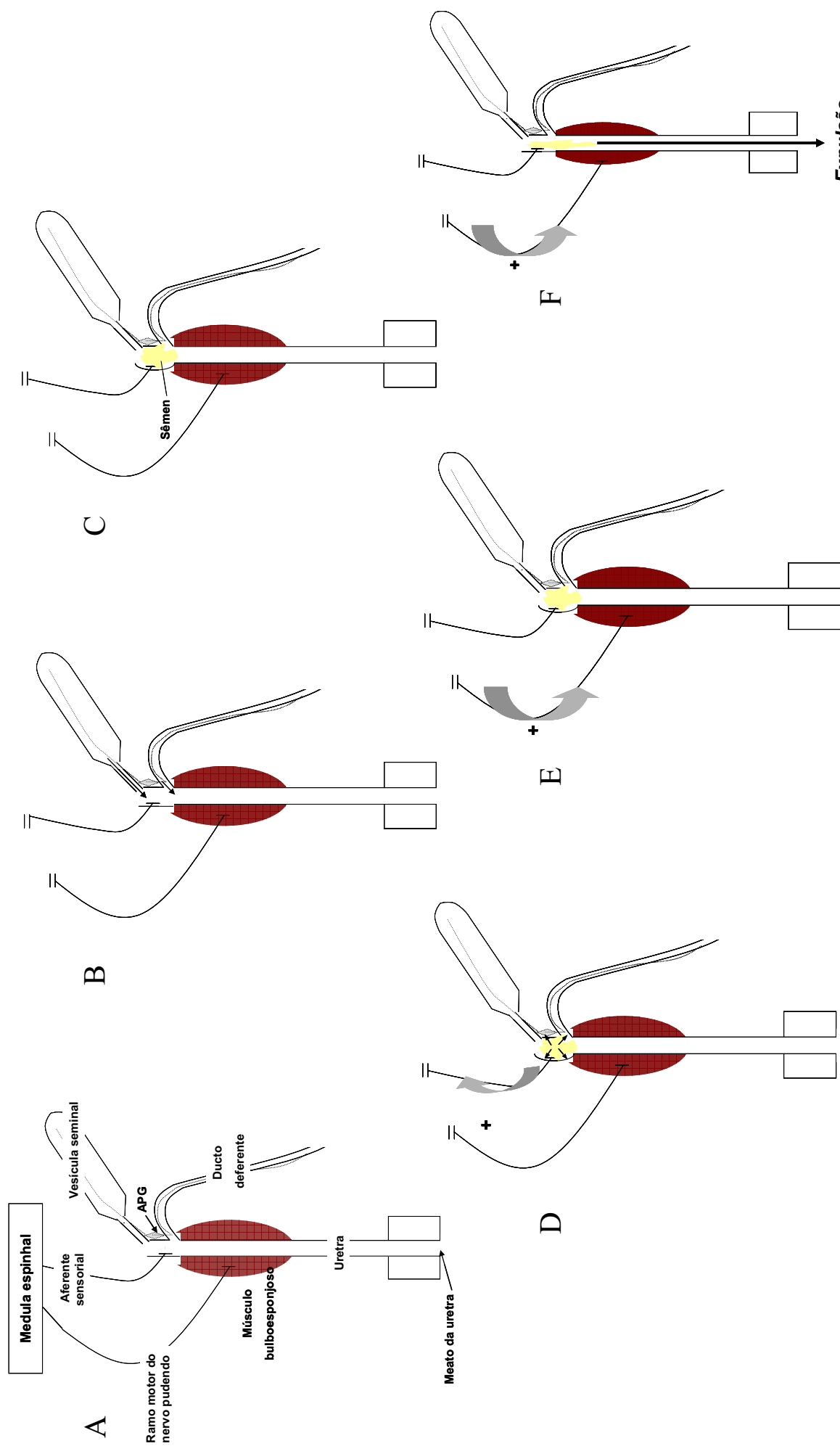


Figura 3. Representação esquemática dos eventos fisiológicos envolvidos no reflexo ejaculatório. A. Efeitores da ejaculação. Por motivos de clareza a glândula prostática foi omitida e somente um ducto deferente e uma vesícula seminal são representados. APG: gânglio pélvico acessório. Durante a fase de emissão seminal (B e C) a deposição do sêmen causa distensão das paredes da uretra com consequente ativação de aferentes sensoriais (D). Na medula espinal a informação aferente é processada e ativa eferentes carregados pelo ramo motor do nervo pudendo (E) promovendo a contração do músculo bulboesponjoso com consequente expulsão do sêmen pelo meato da uretra (F).

As disfunções ejacutórias são as disfunções sexuais masculinas mais comuns e podem ocorrer em qualquer uma das fases do reflexo ejacutório. As diferentes modalidades de disfunções ejacutórias podem ser classificadas em ejaculação precoce/prematura, ejaculação retardada/inibida, anejaculação, ejaculação retrógrada e anorgasmia (McMahon *et al.*, 2004). Dentre elas, a ejaculação precoce é a disfunção ejacutória com maior incidência, acometendo aproximadamente 20-30% da população masculina em algum período da vida além de contar com uma das maiores taxas de prevalência, cerca de 30-40% (Althof, 2006; Ralph *et al.*, 2005).

Segundo a Sociedade Internacional para Medicina Sexual a ejaculação precoce é definida como a disfunção sexual masculina caracterizada pela ocorrência de ejaculação antes ou por volta de um minuto após a penetração vaginal com incapacidade de retardar a ejaculação em todas ou quase todas as relações sexuais e com conseqüências negativas pessoais tais como sofrimento, frustração ou prevenção de intimidade sexual (McMahon *et al.*, 2008).

A ejaculação precoce tem etiologia complexa, podendo envolver fatores psicogênicos (ejaculação precoce adquirida) como altos níveis de ansiedade em relação ao ato sexual, e fatores orgânicos (ejaculação precoce permanente), os quais incluem hipersensibilidade peniana, endocrinopatias e disfunções no sistema serotoninérgico central (McMahon *et al.*, 2004).

A terapêutica da ejaculação precoce é dependente da etiologia e, objetivamente, visa o prolongamento da latência ejacutória intravaginal. As abordagens disponíveis para o tratamento da ejaculação precoce são a psicoterapia e a terapia farmacológica (Althof, 2005).

A terapia farmacológica da ejaculação precoce permanente inclui a redução da sensibilidade peniana através do uso de anestésicos locais (Choi *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2003) e o aumento do limiar ejaculatório com antidepressivos tricíclicos e mais recentemente inibidores de fosfodiesterase tipo 5 (Chen *et al.*, 2003).

Atualmente, a farmacoterapia com inibidores seletivos de recaptura de serotonina tem demonstrado os melhores efeitos terapêuticos e tem sido a opção mais escolhida para os casos de ejaculação precoce permanente (Waldinger, 2005; Waldinger *et al.*, 1998). Sua utilização é baseada no importante papel inibitório da ejaculação que a serotonina possui no sistema nervoso central e sua efetividade tem sido demonstrada em estudos pré-clínicos e clínicos (Waldinger *et al.*, 1994).

Recentemente, a observação do efeito modulador de drogas efetivas no retardo da ejaculação na contratilidade de órgãos participantes da fase de emissão do reflexo ejaculatório, particularmente sobre o ducto deferente e vesícula seminal, tem atraído crescente interesse para a investigação da modulação da contratilidade destes órgãos como uma possível abordagem para o retardo da ejaculação. De fato, drogas como a paroxetina e a fluoxetina (Seo *et al.*, 2001; Yaris *et al.*, 2003) e os inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (Gajar *et al.*, 2007; Orhan *et al.*, 2006) reduzem a contratilidade do ducto deferente e vesículas seminais *in vitro* e a este efeito tem sido creditada parte da eficácia terapêutica destas drogas no retardo da ejaculação (Chen *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 1998).

Neste contexto, drogas que modulam a atividade do sistema nervoso autônomo têm grande potencial terapêutico. Como discutido anteriormente, o sistema nervoso autônomo desempenha um papel fundamental na ejaculação através do controle da fase de emissão do reflexo ejaculatório e em especial a divisão simpática do sistema nervoso autônomo figura como principal efector.

De fato, técnicas histológicas demonstram que grande parte das fibras nervosas que inervam as camadas musculares do ducto deferente, vesículas seminais e próstata é constituída por fibras simpáticas (Alm, 1982; McConnell *et al.*, 1982; Vaalasti *et al.*, 1979; Yuri, 1990). Nelas, foram detectados neuropeptídeos como a somatostatina, encefalina e neuropeptídeo Y (Dixon *et al.*, 1998; Jen *et al.*, 1999) e estudos funcionais demonstram a participação do trifosfato de adenosina (ATP) na atividade contrátil do ducto deferente (Mulryan *et al.*, 2000). Dentre as substâncias detectadas nos nervos simpáticos o principal neurotransmissor estocado nas varicosidades que mantém íntimo contato com as células de músculo liso dos órgãos participantes da fase de emissão do reflexo ejaculatório é a noradrenalina (Dixon *et al.*, 1972).

A noradrenalina liberada durante as descargas simpáticas interage com α_1 -ARs promovendo a contração das células de músculo liso do sistema urogenital masculino. Existem três subtipos de α_1 -ARs denominados α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} , os quais são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G e que sinalizam intracelularmente principalmente através da estimulação da produção dos segundos mensageiros intracelulares trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol via ativação da fosfolipase C β por proteínas G da família G_{q/11} (Zhong *et al.*, 1999). No ducto deferente e vesículas seminais as células de músculo liso contraem em resposta à ativação predominante de α_{1A} -ARs (Furukawa *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1999).

Os segundos mensageiros produzidos pela ativação dos α_1 -ARs elevam os níveis de cálcio intracelular, culminando na contração da célula muscular lisa. Além do cálcio estocado nas reservas intracelulares, liberado pela ação do IP₃ sobre receptores para IP₃ no retículo endoplasmático liso, o influxo desse íon a partir do meio extracelular por meio de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L

contribui de forma efetiva na contração. De fato, estudos com bloqueadores de canais de cálcio demonstram claramente a dependência das contrações do ducto deferente em relação ao cálcio extracelular (Belevych *et al.*, 1999; Boselli *et al.*, 1998; Burt *et al.*, 1998; Burt *et al.*, 1996).

O papel fundamental dos α_1 -ARs na função sexual masculina foi demonstrado em um modelo de camundongos knockout para os três subtipos de α_1 -ARs que apresentam severa infertilidade apesar de produzirem esperma capaz de fertilizar *in vitro* óvulos de fêmeas da mesma espécie (Sanbe *et al.*, 2007). Além disso, a importância dos α_1 -ARs pode ser inferida a partir das disfunções ejaculatórias observadas com o uso de antagonistas de α_1 -ARs no alívio da obstrução da uretra causada pela hiperplasia prostática benigna (Giuliano, 2006).

As disfunções sexuais observadas durante a utilização dos antagonistas de α_1 -ARs relacionam-se a distúrbios ejaculatórios, particularmente redução do volume de ejaculado e ejaculação retrógrada sem incidência significativa de disfunções orgásticas ou da libido, o que reforça uma ação periférica predominante sobre os órgãos participantes do processo de emissão seminal (Giuliano, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009; Marks *et al.*, 2009).

O impacto dos antagonistas de α_1 -ARs na ejaculação, aliado a alta sensibilidade do ducto deferente e vesícula seminal a bloqueadores de canais de cálcio possuem implicação clínica, uma vez que emerge a possibilidade de utilização deste “efeito colateral” no retardo da ejaculação.

Existe um grande arsenal de agentes farmacológicos que apresentam ações antagonistas seletivas em α_1 -ARs e atividade de bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L, muitos deles já utilizados há tempos na terapêutica farmacológica de várias doenças. Dentre os antagonistas de α_1 -ARs clinicamente

utilizados no tratamento da obstrução da uretra destaca-se o Tamsulosin, uma benzenosulfonamida antagonista seletivo de alta afinidade de α_1 -ARs. Desde sua introdução na terapêutica os estudos clínicos demonstram grande efetividade terapêutica do Tamsulosin (Lepor, 1998); além disso o perfil de incidência de efeitos colaterais observados com o Tamsulosin é bem mais favorável quando comparado a outros antagonistas de α_1 -ARs como o Prazosin, Doxazosin e Alfuzosin (Chapple, 1996). Interessantemente, diferente do observado com outros antagonistas de α_1 -ARs o uso crônico ou agudo de Tamsulosin está associado a incidência significativa de disfunção ejaculatória (Hellstrom *et al.*, 2006).

A Nifedipina e a (S)-(+)-Niguldipina são bloqueadoras de canais de cálcio tipo L pertencentes à classe química das diidropiridinas. Estas drogas possuem potente ação bloqueadora de canais de cálcio tipo L e são utilizadas clinicamente no controle da hipertensão arterial (Stason *et al.*, 1997). Interessantemente, a (S)-(+)-Niguldipina é uma diidropiridina que apresenta alta afinidade por ambos, α_{1A} -ARs e canais de cálcio tipo L (Boer *et al.*, 1989).

HIPÓTESE E OBJETIVOS

A dissertação teve a seguinte hipótese norteadora:

“A inibição ou retardo da fase de emissão do reflexo ejaculatório através da redução da contratilidade dos ductos deferentes e vesículas seminais por meio do antagonismo de adrenoceptores α_1 e/ou do bloqueio de canais de cálcio tipo L pode retardar a ejaculação”.

Assim, o principal objetivo da dissertação foi avaliar se drogas que antagonizam α_1 -ARs e/ou o bloqueiam canais de cálcio tipo L no ducto deferente e vesículas seminais são capazes de retardar a ejaculação.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito do antagonista de α_1 -ARs Tamsulosin e das diidropiridinas bloqueadoras de canais de cálcio tipo L Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina nas contrações induzidas por noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal de rato *in vitro*;
- Avaliar os efeitos da administração de Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin na ejaculação através da análise do comportamento copulatório de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos de ambos os sexos (machos 12 a 20 e fêmeas 12 a 16 semanas de idade) provenientes do Biotério Central da UNESP-Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos em ambiente controlado (temperatura: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade: $55 \pm 5\%$; 12/12h claro/escuro, luzes ligadas às 7:00h) com livre acesso a ração e água.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais de Experimentação da UNESP – Botucatu (protocolo n° 61/08, anexo 1).

1. Avaliação dos efeitos da Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin na contratilidade do ducto deferente e vesículas seminais *in vitro*

Ratos machos adultos (12-16 semanas) foram decapitados em guilhotina e os ductos deferentes ou as vesículas seminais foram cuidadosamente retirados e preparados para o registro digital de tensão isométrica. Os ductos deferentes inteiros ou as vesículas seminais foram limpos de tecidos aderentes e conteúdos luminais e montados em câmaras musculares de 10 ml sob 1g de tensão em solução nutriente Tyrode modificada (Picarelli *et al.*, 1962) com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5.7, CaCl_2 1.8, NaH_2PO_4 0.36, NaHCO_3 15, dextrose 5.5, mantida a 30°C , pH 7.4 continuamente borbulhada com mistura de 95% O_2 /5% CO_2 .

Após um período de estabilização de 30 minutos a contração ao KCl 80 mM foi observada para avaliação da viabilidade tecidual e da estabilização da resposta contrátil máxima em três ocasiões separadas entre si por um período de 30 minutos. Após 30 minutos da última contração ao KCl 80mM, caso pelo menos três

contrações de magnitude semelhante tivessem sido observadas, curvas concentração-resposta para noradrenalina foram construídas pela adição cumulativa do agonista, segundo o método de Van Rossum (Van Rossum, 1963).

Após a lavagem e relaxamento dos órgãos foram adicionados Tamsulosin (0,1-100 nM), Prazosin (0,3-30 nM), (S)-(+)-Niguldipina (3-1000 nM) ou Nifedipina (10-1000 nM) e decorridos 45 minutos foram construídas curvas concentração-resposta para a noradrenalina ainda na presença das drogas. Após lavagem e relaxamento dos órgãos uma nova concentração do antagonista foi incubada por 45 minutos e o procedimento de construção da curva repetido. Utilizou-se incrementos de 3 vezes nas concentrações sucessivas dos antagonistas e o tempo de incubação de 45 minutos foi respeitado durante todo o experimento.

Todas as curvas concentração-resposta de noradrenalina foram obtidas na presença de cocaína 6 μ M, cortisona 10 μ M e propranolol 0,1 μ M para inibição da captura neuronal e extraneuronal de noradrenalina e antagonismo de adrenoreceptores β , respectivamente, equilibradas com a preparação por 45 minutos (Pupo, 1998).

Determinação dos efeitos da (S)-(+)-Niguldipina e do Tamsulosin nas contrações induzidas por CaCl_2 no ducto deferente

Curvas concentração-resposta cumulativas para CaCl_2 na ausência e presença de (S)-(+)-Niguldipina ou Tamsulosin foram construídas no ducto deferente em solução nutritiva nominalmente sem cálcio (mesma composição da solução citada anteriormente exceto pela omissão de CaCl_2) com alta concentração de K^+ (80 mM), obtida pela adição de KCl 74,3 mM 1 minuto antes da construção da curva concentração-resposta. Após obtenção de duas curvas concentração-resposta

semelhantes ao CaCl_2 (0,1-100 mM), o Tamsulosin (0,1-30 nM) ou a (S)-(+)-Niguldipina (30-300 nM) foram incubados por 45 minutos e após este período uma nova curva concentração-resposta ainda na presença da droga foi obtida. A potência do CaCl_2 na indução das contrações e a resposta máxima atingida na ausência e presença das diferentes concentrações dos antagonistas foram comparadas.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (epm) obtidos com n tecidos. As respostas contráteis à noradrenalina são expressas em gramas (g) de tensão e as ao CaCl_2 como porcentagem da resposta em 1,8 mM de Ca^{2+} . A potência da noradrenalina e do CaCl_2 é expressa como pD_2 , o negativo do logaritmo da concentração molar da droga necessária para indução de 50% da resposta máxima e a potência dos antagonistas como pA_2 , o negativo do logaritmo da concentração do antagonista que promove um deslocamento de duas vezes à direita na curva concentração resposta do agonista. O pA_2 foi calculado através da construção de gráfico de Schild (Arunlakshana *et al.*, 1959). Quando a inclinação da reta de regressão no gráfico de Schild foi diferente da unidade teórica, o pA_2 foi estimado através da equação (1): $\text{pA}_2 = \log(\text{CR}-1) - \log B$, na qual CR é o antilog da diferença entre os valores de pD_2 na ausência e na presença do antagonista e B é a menor concentração molar do antagonista capaz de antagonizar a resposta do agonista.

Potência da Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina na inibição das contrações induzidas por noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal

A potência dos bloqueadores de canais de cálcio na inibição da resposta contrátil à noradrenalina no ducto deferente e vesículas seminais foi estimada através da pIC_{50} , o negativo do logaritmo da concentração molar da diidropiridina necessária para inibição de 50% da magnitude de resposta a noradrenalina.

Comparações entre a potência da Nifedipina ou (S)-(+)-Niguldipina num mesmo tecido foram estabelecidas entre as estimativas de pIC_{50} para redução de 50% da tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina. Devido à dependência dos valores de pIC_{50} na magnitude do estímulo a ser inibido, as potências inibitórias da Nifedipina ou (S)-(+)-Niguldipina foram comparadas entre o ducto deferente e vesícula seminal utilizando-se a estimativa de pIC_{50} para inibição de estímulos submáximos em ambos os tecidos (resposta da noradrenalina efetiva em 70% em cada tecido).

Comparações estatísticas foram realizadas através do teste t de student não emparelhado ou com análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram aceitos como significantes.

2. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO COPULATÓRIO

Ratos Wistar machos (12 a 20 semanas de idade) e fêmeas com receptividade sexual natural (12 a 16 semanas) foram utilizados para análise do comportamento copulatório.

Trinta minutos antes das avaliações do comportamento copulatório as fêmeas adultas foram expostas a um macho sexualmente experiente e aquelas que

apresentaram lordose após a monta do macho foram selecionadas para avaliação do comportamento copulatório do macho.

Os ratos machos (a partir de 12 semanas de idade) foram submetidos a três testes de comportamento copulatório para aquisição de experiência sexual e caracterização do comportamento copulatório individual e somente aqueles que ejacularam duas ou mais vezes em pelo menos dois dos testes foram selecionados para a realização dos experimentos (ver Apêndice).

A Figura 4 apresenta um esquema dos eventos registrados na avaliação do comportamento copulatório e os parâmetros avaliados durante uma sessão representativa com um rato adulto (120 dias) sexualmente experiente e tratado com veículo.

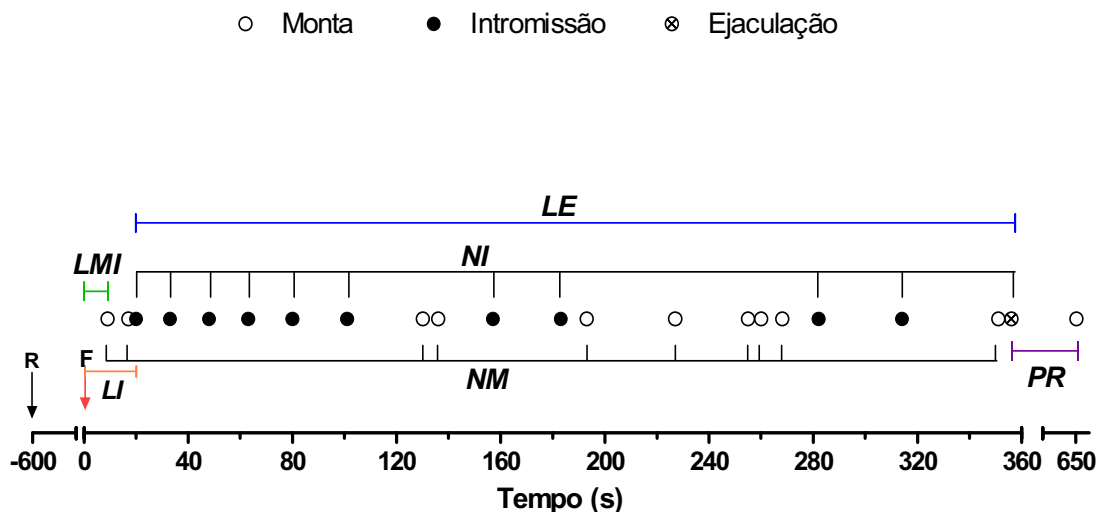


Figura 4. Representação gráfica do protocolo aplicado para análise do comportamento copulatório. Abreviações representam os parâmetros avaliados como se segue: **R** introdução do rato macho para aclimatização à caixa de observação, **F** apresentação da fêmea sexualmente receptiva ao macho, **LMI** latência para primeira monta ou intromissão, **LI** latência para a primeira intromissão, **NM** número de montas e **NI** número de intromissões até a ejaculação, **LE** latência ejacutória, **PR** período refratário pós-ejacutório (para definições vide infra). O esquema representa uma adaptação da figura originalmente publicada por (Larsson *et al.*, 1999) e posteriormente modificada em (de Jong *et al.*, 2006).

Os ratos machos foram colocados individualmente em caixas de acrílico transparente (caixa de observação) e mantidos sozinhos durante dez minutos para aclimatização. Após este período a fêmea sexualmente receptiva foi introduzida na caixa de observação e o comportamento copulatório observado por trinta minutos após a primeira monta ou intromissão. Os parâmetros avaliados foram:

- A latência para a 1ª monta ou intromissão (**LMI**, tempo decorrido entre a apresentação da fêmea receptiva e a primeira monta ou intromissão);
- Latência para a primeira intromissão (**LI**, intervalo de tempo entre a apresentação da fêmea receptiva e a primeira monta com intromissão peniana);

E em cada série ejaculatória:

- número de montas até a ejaculação (**NM**, montas sem intromissão peniana) e o número de intromissões até a ejaculação (**NI**, montas com intromissão peniana);
- Latência ejaculatória (**LE**), definida como intervalo de tempo entre a primeira intromissão e a ejaculação;

Além dos parâmetros acima mencionados, a partir dos registros calculou-se o período refratário pós-ejaculatório (**PR**) (intervalo de tempo entre a ejaculação e a primeira monta ou intromissão da próxima série ejaculatória);

Adicionalmente registrou-se o peso úmido dos plugs seminais (**PS**) deslocados pelas intromissões de séries ejaculatórias sucessivas.

Nos casos em que o macho não realizou uma monta ou intromissão em até dez minutos após a introdução da fêmea receptiva na caixa o teste foi interrompido e o macho considerado sexualmente inativo naquela ocasião. Análises sucessivas do comportamento copulatório foram separadas entre si por intervalos de sete dias e iniciadas e finalizadas dentro do 2º terço do período escuro do ciclo claro/escuro (4 horas após o desligamento das luzes) sob iluminação com luz vermelha.

Cirurgia para implante de cânula na veia jugular e administração de drogas

A Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina, Tamsulosin ou o veículo apropriado foram administrados por via intravenosa através de cânulas implantadas cirurgicamente na veia jugular direita.

Os ratos sexualmente experientes selecionados foram anestesiados com cetamina e xilazina (70 mg/kg e 10mg/kg, respectivamente) e a veia jugular direita foi canulada com tubos de polietileno (PE10 conectados a PE50) preenchidos com

salina heparinizada (1000 UI/ml). A cânula foi dirigida subcutaneamente e exteriorizada na região posterior do dorso do animal sendo presa com linha de sutura na pele do pescoço. Após a cirurgia os animais receberam 0,1ml de pentabiótico subcutaneamente e foram mantidos durante 24h à temperatura ambiente (25-26°C) para recuperação. Inspeções diárias das condições físicas dos animais e administração de 0,2 ml de salina heparinizada (1000 UI/ml) pela cânula implantada na veia jugular para prevenir entupimento da cânula foram realizadas até o dia das análises do comportamento copulatório.

Efeitos da administração de Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina ou Tamsulosin no comportamento copulatório de ratos sexualmente experientes

A análise do comportamento copulatório foi realizada três dias após a cirurgia para canulação da veia jugular.

Para observação do comportamento copulatório os ratos machos receberam Tamsulosin (0,3 , 1,0 ou 3,0 µg/kg, iv.), (S)-(+)-Niguldipina (10 , 50 ou 100 µg/kg, iv.), Nifedipina (10 , 50 ou 100 µg/kg, iv.) ou veículo (0,3 ml/rato, iv.) e foram colocados individualmente em caixas de acrílico transparente por 15 minutos para aclimatização. Após este período a fêmea sexualmente receptiva foi introduzida na caixa e o comportamento copulatório avaliado como descrito anteriormente.

Análise estatística

Os dados serão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (LMI, LI, LE e PR) ou como mediana e intervalo interquartil (NM, NI e PS) para n animais. Diferenças entre grupos foram avaliadas através de análise paramétrica por ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas (LMI, LI, LE e PR)

e estatística não-paramétrica pelo teste de Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn para comparações múltiplas (NM, NI e PS). Valores de $p < 0,05$ foram aceitos como significantes.

Drogas e reagentes

Tamsulosin (hidroclorato de tamsulosina), IFFECT (Hong Kong); Cocaína (cocainum hydrochloricum puriss.) (Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Germany); Prazosin (Prazosin hydrochloride) e propranolol ((±)-propranolol hydrochloride), Research Biochemicals International (Natick, MA, USA); Nifedipina (Nifedipine) e noradrenalina ((L)-(-)-Norepinephrine bitartrate salt monohydrate) e Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); (S)-(+)-Niguldipina ((S)-(+)-Niguldipine hydrochloride) Tocris bioscience (Ellisville, MO, USA);

Preparação das soluções: experimentos funcionais de contração in vitro

Soluções estoque de noradrenalina, Tamsulosin, Prazosin, verapamil, propranolol e cocaína foram preparadas em água destilada e diluídas de acordo com o necessário diariamente antes dos experimentos. A cortisona foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, 100%).

Para os experimentos funcionais de contração a (S)-(+)-Niguldipina foi diluída em DMSO (100%) em tubos de vidro para evitar a adsorção da droga a superfícies de plástico (ver (Graziadei et al., 1989b)). A solução “estoque” de Nifedipina (1 ou 10mM) foi preparada em etanol absoluto e diluições subseqüentes foram realizadas em água destilada. Soluções “estoque” e diluições subseqüentes de (S)-(+)-Niguldipina e Nifedipina foram preparadas diariamente antes dos experimentos em ambiente protegido de luz. Durante os experimentos de contração que utilizaram a

(S)-(+)-Niguldipina ou Nifedipina as luzes do laboratório foram apagadas e a parede externa das câmaras musculares envoltas com plástico negro para proteção da luz ambiente.

Preparação das soluções: experimentos de análise do comportamento copulatório

As soluções de (S)-(+)-Niguldipina ou Nifedipina utilizadas nos experimentos de comportamento copulatório foram preparadas em etanol absoluto. A dose final de etanol administrada foi de 79mg de etanol/rato (equivalente a 0,1ml de etanol absoluto/rato). Soluções foram preparadas em tubos de vidro e administradas com a utilização de seringas de vidro. Todas as soluções foram protegidas da luz. O Tamsulosin foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%).

RESULTADOS

Efeitos da Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin nas contrações induzidas por noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal

Foram investigados os efeitos da Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin nas contrações induzidas por noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal, órgãos participantes do processo de emissão do reflexo ejaculatório.

A Figura 5 apresenta registros da atividade contrátil induzida pela noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal.

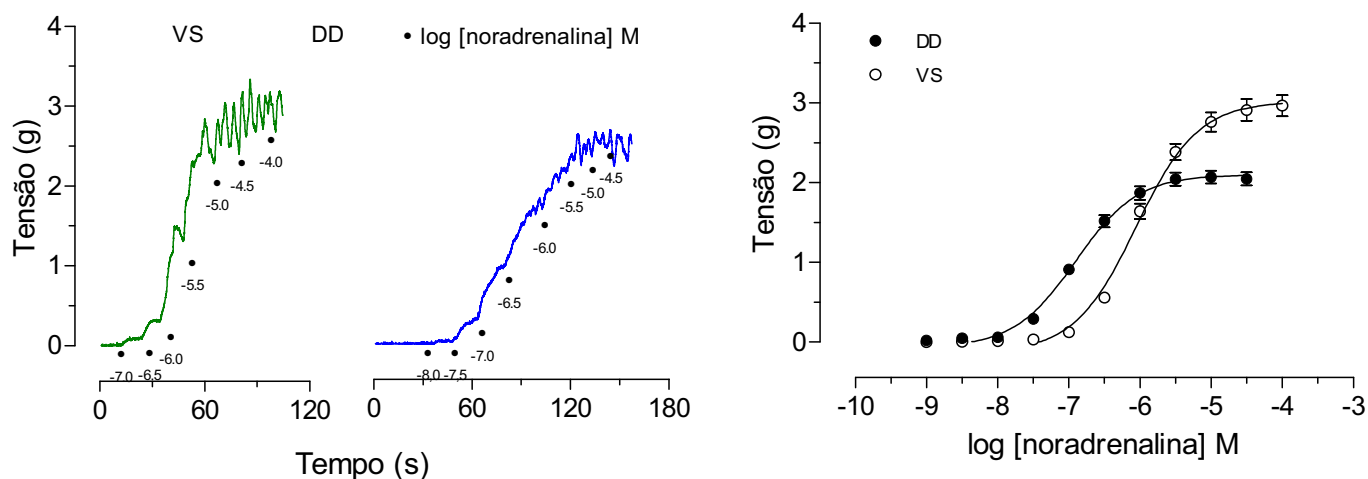


Figura 5. Registros representativos da atividade contrátil induzida por noradrenalina no ducto deferente (DD) e vesícula seminal (VS). As contrações foram induzidas pela adição cumulativa de noradrenalina na presença do coquetel com antagonista de adrenoceptores β e inibidores do processo de captura neuronal e extraneuronal de noradrenalina.

A noradrenalina induziu contrações de maneira concentração-dependente nos tecidos avaliados e foi aproximadamente seis vezes mais potente no ducto deferente (pD_2 $6,90 \pm 0,05$, $n=17$ vs $6,05 \pm 0,06$, $n=18$; $p<0,0001$) embora tenha induzido maior tensão na vesícula seminal ($3,02 \pm 0,06g$, $n=18$ vs $2,10 \pm 0,04g$, $n=17$; $p<0,0001$).

A Figura 6 apresenta os efeitos das diidropiridinas bloqueadoras de canais de cálcio Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina nas contrações induzidas por noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal.

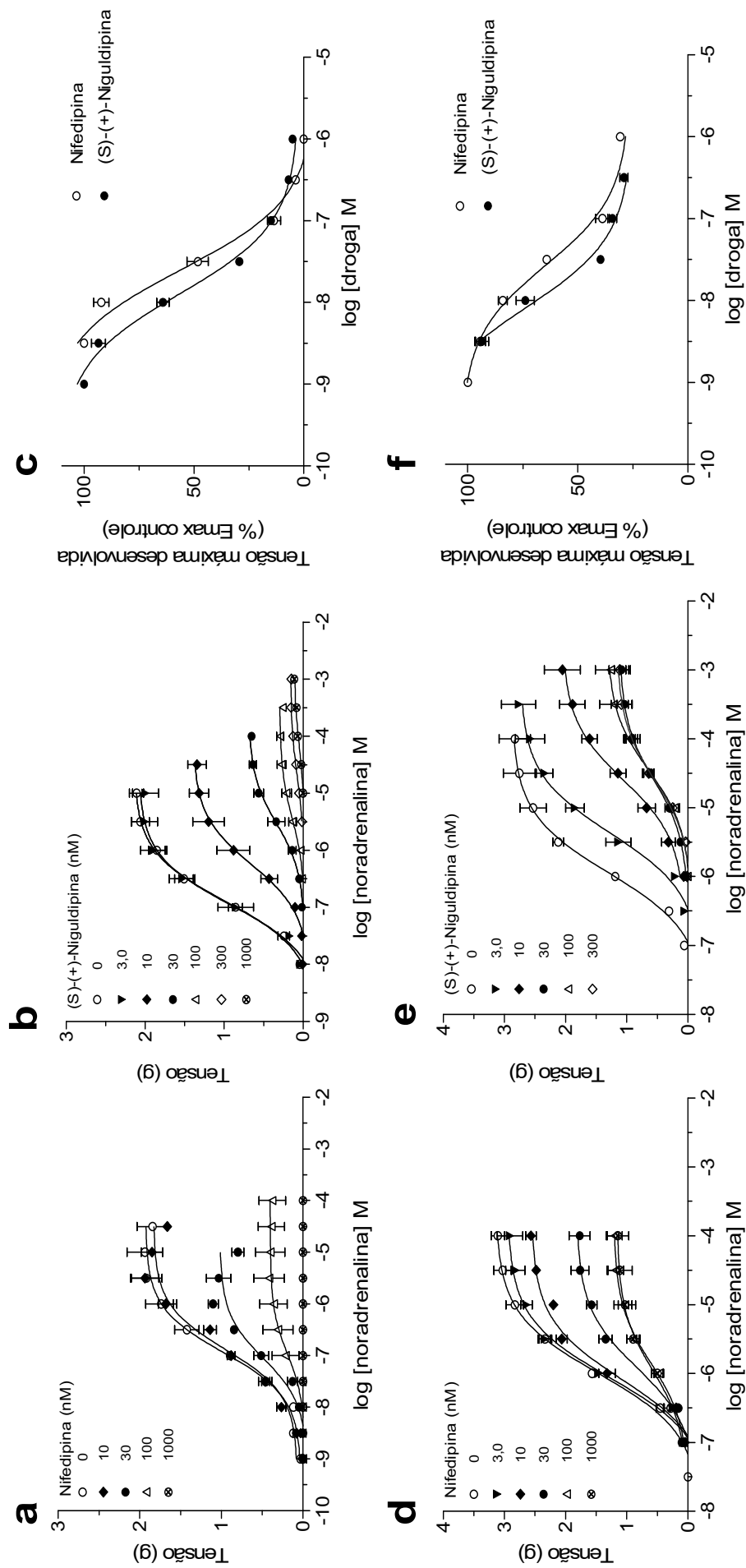


Figura 6. Curvas concentração-resposta para noradrenalina no ducto deferente (**a** e **b**) e vesícula seminal (**d** e **e**) na ausência e presença de concentrações crescentes de Nifedipina ou (S)-(+)-Niguldipina. Em **c** e **f** apresenta-se a tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina na presença das diferentes concentrações dos bloqueadores de canais de cálcio como percentagem da resposta máxima na ausência das drogas no ducto deferente e vesícula seminal, respectivamente. Resultados representam média $\pm$ epm obtidos com 3-6 tecidos para cada droga.

A Nifedipina e a (S)-(+)-Niguldipina deprimiram de maneira concentração-dependente a tensão máxima desenvolvida no ducto deferente e vesícula seminal e em ambos os tecidos a (S)-(+)-Niguldipina foi significativamente mais potente que a Nifedipina na redução da tensão máxima desenvolvida ($pIC_{50} = 7,90 \pm 0,05$ e $7,60 \pm 0,07$, $n=4$, $p<0,05$ (ducto deferente); $8,08 \pm 0,13$ e $7,57 \pm 0,06$, $n=4$, $p<0,05$ (vesícula seminal)). Adicionalmente, embora no ducto deferente a resposta contrátil à noradrenalina tenha sido totalmente abolida por ambas as drogas, aproximadamente 30% da contração da vesícula seminal foi resistente à ação de ambos os bloqueadores de canais de cálcio, mesmo em concentrações que aboliram a contração no ducto deferente. Semelhantemente, o verapamil, um outro bloqueador de canais de cálcio tipo L não foi capaz de abolir totalmente a resposta contrátil à noradrenalina na vesícula seminal (dados não apresentados).

Ainda como pode ser observado na Figura 6 e Tabela 1 a (S)-(+)-Niguldipina, mas não a Nifedipina, reduziu a potência da noradrenalina em ambos os tecidos, o que fica caracterizado pelos deslocamentos à direita nas curvas concentração-resposta à noradrenalina.

Tabela 1. Potência da noradrenalina na indução de contrações no ducto deferente e vesícula seminal na ausência e presença de concentrações crescentes de Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina. A potência da noradrenalina é expressa como pD₂, o -log EC₅₀ em ambos os tecidos.

Ducto deferente						
Concentração do bloqueador de canais de cálcio (nM)	0 (controle)	3,0	10	30	100	1000
pD ₂ (#)						
Nifedipina	6,94 ± 0,11	nd	6,88 ± 0,09 (0)	7,05 ± 0,14 (0)	6,97 ± 0,47 (0)	nd
(S)-(+)-Niguldipina	6,90 ± 0,08	6,95 ± 0,14	6,25 ± 0,17* (4,5)	5,53 ± 0,15* (23,4)	5,45 ± 0,34* (28,2)	4,67 ± 0,23* (169,8)
						4,16 ± 0,32* (549,5)
Vesícula seminal						
Concentração do bloqueador de canais de cálcio (nM)	0 (controle)	3,0	10	30	100	1000
pD ₂ (#)						
Nifedipina	6,00 ± 0,06	nd	6,06 ± 0,09 (0)	5,92 ± 0,16 (0)	5,88 ± 0,16 (0)	nd
(S)-(+)-Niguldipina	5,93 ± 0,11	5,37 ± 0,12* (3,6)	4,60 ± 0,16* (21,4)	4,60 ± 0,13* (21,4)	4,46 ± 0,19* (29,5)	4,60 ± 0,17* (21,4)
						nd
Dados representam média ± epm de 3-6 tecidos. nd: não determinado. [#] Deslocamento à direita das curvas concentração-resposta em relação à curva controle.* p<0,05 vs controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls). Demais resultados p>0,05 pela ANOVA.						

Na vesícula seminal, concentrações de (S)-(+)-Niguldipina entre 10 e 300 nM não reduziram adicionalmente a potência da noradrenalina embora tenham sido efetivas na redução da resposta máxima tecidual até o limite de 30% da tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina na ausência do antagonista (Figura 6).

A potência inibitória da Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina entre os dois tecidos foi comparada avaliando-se seus efeitos contra a concentração de noradrenalina capaz de induzir 70% da resposta contrátil máxima no ducto deferente e vesícula seminal. Os resultados são mostrados na Figura 7.

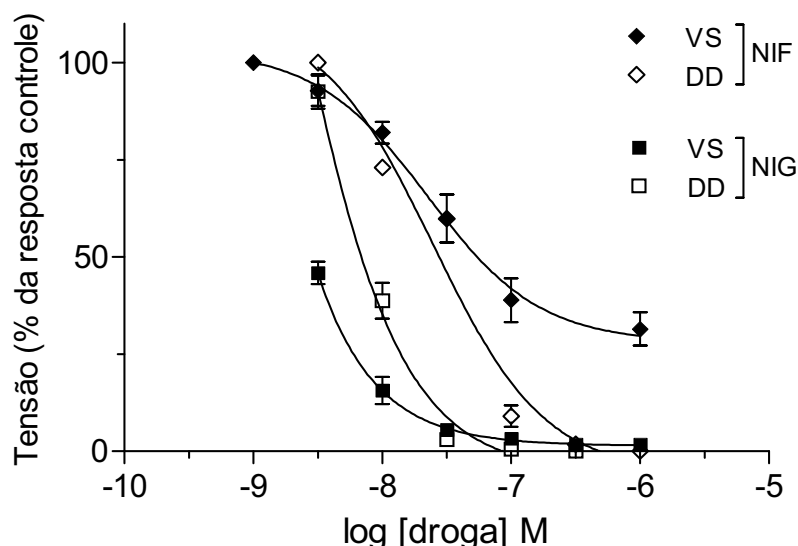


Figura 7. Efeito inibitório da Nifedipina (NIF) e (S)-(+)-Niguldipina (NIG) na contração induzida por noradrenalina no ducto deferente (DD) e vesícula seminal (VS). A inibição da resposta da concentração de noradrenalina efetiva em 70% na ausência das drogas (noradrenalina 0,3 μ M no ducto deferente e 3 μ M na vesícula seminal) foi utilizada para construção das curvas. Resultados representam média $\pm$ epm obtidos com 3-6 tecidos para cada droga.

A Nifedipina foi eqüipotente na redução da tensão nos dois tecidos (pIC_{50} ducto deferente = $7,61 \pm 0,08$ vs $7,65 \pm 0,09$ (vesícula seminal); $p > 0,05$). Devido ao potente efeito inibitório da (S)-(+)-Niguldipina nesta magnitude de resposta não foi possível estabelecer a relação completa de inibição da tensão na vesícula seminal inviabilizando, desta forma, a determinação de um valor de pIC_{50} ; nota-se, porém,

através do distanciamento entre as duas curvas concentração-inibição que a (S)-(+)-Niguldipina foi aproximadamente três vezes mais potente na inibição da contração induzida pela noradrenalina na vesícula seminal.

Também foram investigados os efeitos dos antagonistas de α_1 -ARs Prazosin e Tamsulosin na reatividade do ducto deferente e vesícula seminal à noradrenalina, e os resultados são apresentados na Figura 8.

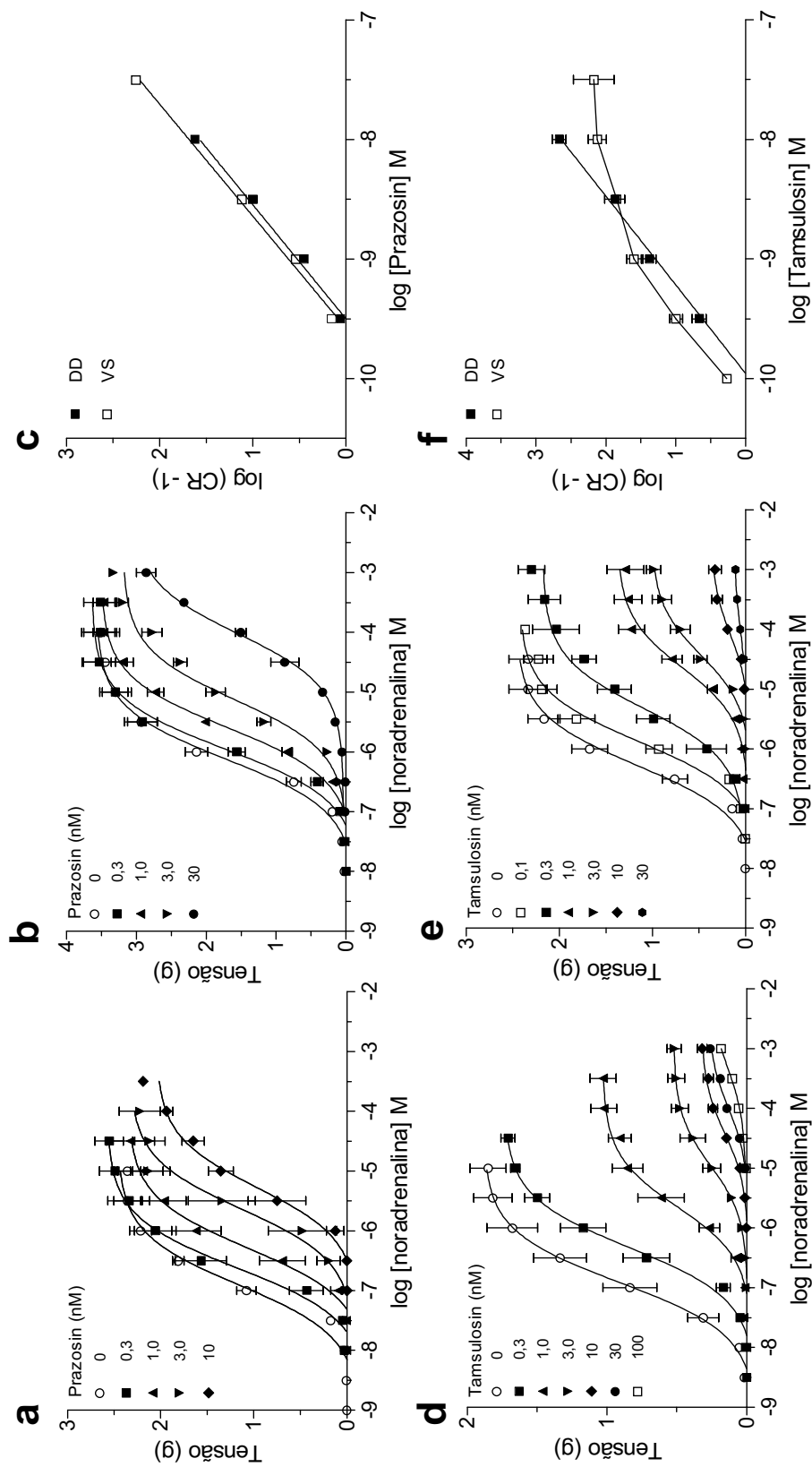


Figura 8. Comportamento do antagonismo apresentado pelo Prazosin e Tamsulosin no ducto deferente (a e d) e vesícula seminal (b e e). Os gráficos de Schild para o antagonismo das respostas contraíteis no ducto deferente (DD) e vesícula seminal (VS) são apresentados em c (Prazosin) e f (Tamsulosin). Resultados representam média $\pm$ epm de 4-5 tecidos por droga.

O Prazosin deslocou as curvas concentração-resposta da noradrenalina à direita sem deprimir a resposta máxima em ambos os tecidos (Figura 8a e b). A análise de regressão linear dos deslocamentos proporcionados pelas diferentes concentrações de Prazosin através da construção do gráfico de Schild (Figura 8c) resultou em uma reta com inclinação de $1,05 \pm 0,07$ e intercepto no eixo das abscissas (pA_2) de $9,50 \pm 0,04$ ($n=4$) no ducto deferente e inclinação $1,07 \pm 0,06$ com intercepto $9,60 \pm 0,04$ ($n=4$) na vesícula seminal demonstrando que o Prazosin comportou-se como antagonista competitivo dos receptores α_1 -ARs do ducto deferente e vesícula seminal apresentando afinidades similares pelos α_1 -ARs destes dois tecidos.

No entanto, o Tamsulosin (Figura 8d e e) antagonizou de forma complexa as contrações induzidas pela noradrenalina no ducto deferente e vesícula seminal, pois concomitantemente aos deslocamentos à direita nas curvas concentração-resposta à noradrenalina, a ação antagonista nas concentrações maiores que 0,3 nM em ambos os tecidos foi associada a marcante redução na contração máxima de até $85,1 \pm 1,85\%$ no ducto deferente ($pIC_{50} = 9,08 \pm 0,09$; $n=4$) e $95,3 \pm 0,51\%$ na vesícula seminal ($pIC_{50} = 8,81 \pm 0,12$; $n=4$) caracterizando, desta forma, um antagonismo intransponível (*insurmountable*).

O comportamento intransponível apresentado pelo Tamsulosin inviabilizou a utilização da regressão de Schild para quantificação do pA_2 ; portanto, a potência do Tamsulosin foi determinada através da equação (1) utilizando-se o efeito do Tamsulosin 0,3 nM em ambos os tecidos. Os valores de pA_2 resultantes foram de $10,50 \pm 0,09$ ($n=4$) na vesícula seminal e $10,25 \pm 0,23$ ($n=3$) no ducto deferente.

Embora nesta condição de antagonismo intransponível o gráfico de Schild não possa ser utilizado para avaliação da constante de dissociação do complexo

Tamsulosin/adrenoceptor α_1 do ducto deferente e vesícula seminal, a representação gráfica do log (CR-1) versus log da concentração do Tamsulosin foi utilizada para avaliação dos efeitos das diferentes concentrações do Tamsulosin na potência da noradrenalina em ambos os tecidos (Figura 8f). No ducto deferente o Tamsulosin reduziu de forma concentração-dependente a potência da noradrenalina na faixa de concentrações avaliada; porém, a inclinação da reta de regressão no *pseudo* gráfico de Schild foi significativamente maior que a unidade teórica ($1,35 \pm 0,08$, $n=7$; $p>0,05$). Tal fato demonstra que a redução da potência da noradrenalina não foi proporcional aos incrementos da concentração de Tamsulosin. Na vesícula seminal, a concentração de Tamsulosin 10 nM reduziu comparativamente menos a potência da noradrenalina, o que caracterizou um comportamento predominantemente intransponível representado somente por reduções concentração-dependentes da tensão máxima desenvolvida.

No ducto deferente e vesícula seminal drogas que bloqueiam o influxo de cálcio extracelular reduzem de maneira significativa a resposta contrátil à noradrenalina em ambos os tecidos (Figura 6). Portanto, avaliou-se através de experimentos funcionais de contração no ducto deferente se o Tamsulosin interfere nas contrações induzidas CaCl_2 adicionado à solução nutritiva livre deste íon. Os resultados são apresentados na Figura 9.

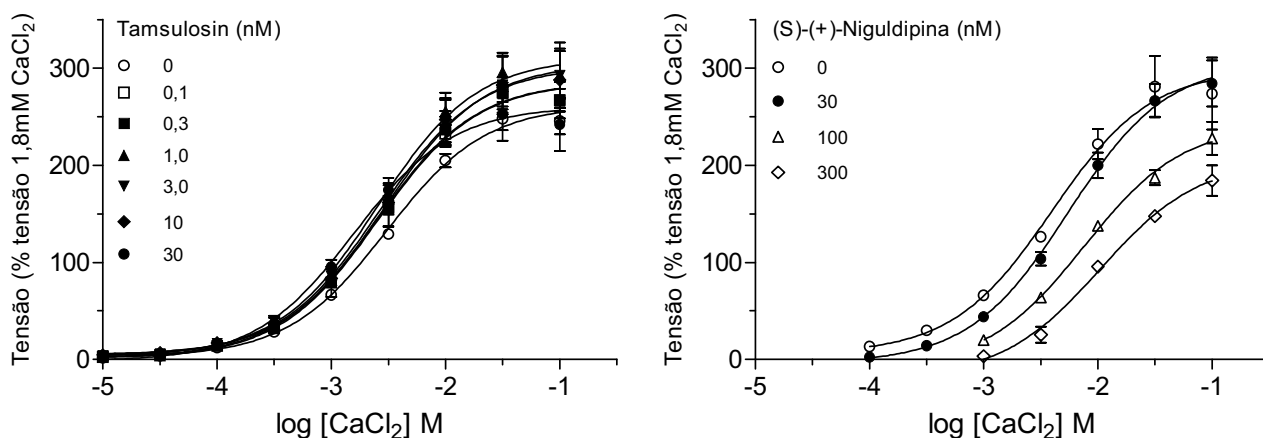


Figura 9. Curvas concentração-resposta para o CaCl₂ no ducto deferente em solução nutritiva sem cálcio. KCl 74,6 mM (concentração final de K⁺ na solução: 80mM) foi adicionado à solução nutritiva e após 1 minuto o CaCl₂ foi adicionado de maneira cumulativa. Tamsulosin (0,1-30nM) ou (S)-(+)-Niguldipina (30-300 nM) foram equilibrados por 45 minutos antes da construção de curva concentração-resposta para o CaCl₂. A tensão desenvolvida foi normalizada em relação à magnitude desenvolvida em 1,8 mM de CaCl₂. Resultados representam média ± epm obtidos com 4 tecidos para cada droga.

O Tamsulosin não afetou as contrações induzidas por CaCl₂ nas concentrações que reduziram significativamente a tensão desenvolvida na reatividade do ducto deferente e vesícula seminal à noradrenalina excluindo, desta forma, este mecanismo de ação como determinante do perfil intransponível apresentado pelo Tamsulosin em ambos tecidos. Como esperado, a (S)-(+)-Niguldipina deprimiu a resposta máxima além de reduzir a potência do CaCl₂ em pouco mais que três vezes.

Avaliação dos efeitos da Nifedipina (10, 50 ou 100µg/kg, iv), (S)-(+)-Niguldipina (10, 50 ou 100µg/kg, iv) ou Tamsulosin (0,1 , 0,3 ou 3,0µg/kg, iv) no comportamento copulatório de ratos machos sexualmente experientes

A análise do efeito da Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin na ejaculação foi realizada através da observação do comportamento copulatório de ratos machos sexualmente experientes. No Apêndice é apresentada a caracterização do comportamento copulatório dos ratos machos avaliados nesta dissertação durante o período de aquisição de experiência sexual.

Todos os animais tratados com veículo, Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina ou Tamsulosin nas diferentes doses estudadas apresentaram ativo comportamento exploratório da caixa de observação durante o período de aclimatização, investigaram ativamente a região anogenital da fêmea e demonstraram o comportamento de “perseguição” (*pursuit*) da fêmea imediatamente antes do início da cópula caracterizada pela realização de uma monta ou intromissão. Todos os animais tratados com veículo ou drogas ejacularam durante os testes.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros do comportamento copulatório após a administração das diferentes doses de Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina ou do veículo (79mg de etanol/rato + 0.2ml de salina 0.9%).

Tabela 2. Parâmetros do comportamento copulatório de ratos machos sexualmente experientes após a administração de veículo, Nifedipina ou (S)-(-)-Niguldipina. As drogas ou o veículo foram administradas por via intravenosa 15 minutos antes da análise do comportamento copulatório. Por motivos de clareza são apresentados somente os parâmetros da primeira série ejaculatória.

Nifedipina ($\mu\text{g/kg}$)				
	Veículo (n=11)	10,0 (n=8)	50,0 (n=7)	100,0 (n=7)
LMI (s)	14,18 $\pm$ 1,95	14,00 $\pm$ 3,60	9,71 $\pm$ 1,69	10,00 $\pm$ 2,56
LI (s)	28,73 $\pm$ 7,13	29,57 $\pm$ 10,82	23,20 $\pm$ 3,95	14,33 $\pm$ 3,15
NI	9,0 (6,0-10,0)	10,0 (9,0-11,0)	9,0 (5,0-15,0)	10,0 (8,0-11,0)
LE (s)	274,50 $\pm$ 30,32	308,00 $\pm$ 47,37	201,60 $\pm$ 29,63	260,30 $\pm$ 43,38
PR (s)	330,20 $\pm$ 9,03	268,00 $\pm$ 15,40*	327,90 $\pm$ 16,51	318,10 $\pm$ 17,86
PS (mg)	85 (60-112)	80 (75-100)	95 (73-120)	90 (78-110)
LMI: Latência para 1ª monta ou intromissão; LI: Latência para 1ª intromissão; NI: Número de intromissões para a 1ª ejaculação; LE: Latência ejaculatória; PR: Período refratário pós-ejaculatório; PS: Peso dos plugs seminais.				
(S)-(-)-Niguldipina ($\mu\text{g/kg}$)				
	Veículo (n=11)	10,0 (n=7)	50,0 (n=7)	100,0 (n=6)
LMI (s)	14,18 $\pm$ 1,95	14,17 $\pm$ 3,29	12,13 $\pm$ 2,18	9,17 $\pm$ 1,28
LI (s)	28,73 $\pm$ 7,13	36,17 $\pm$ 12,82	20,14 $\pm$ 3,35	17,33 $\pm$ 5,37
NI	9,0 (6,0-10,0)	10,0 (5,0-13,0)	7,0 (5,0-10,0)	10,0 (9,0-11,0)
LE (s)	274,50 $\pm$ 30,32	272,10 $\pm$ 46,96	340,70 $\pm$ 44,44	288,70 $\pm$ 15,10
PR (s)	330,20 $\pm$ 9,03	357,00 $\pm$ 21,55	320,50 $\pm$ 17,84	315,00 $\pm$ 37,80
PS (mg)	85 (60-112)	110 (90-120)	90 (60-110)	80 (60-100)
Dados representam média $\pm$ epm (LMI, LI, LE e PR) ou mediana e intervalo interquartil (NI e PS); n=número de animais. * p<0,05 vs veículo (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas). Demais resultados p>0,05 vs veículo pela ANOVA (LMI, LI, LE e PR) ou Kruskal-Wallis (NI e PS).				

A Nifedipina e a (S)-(+)-Niguldipina não afetaram a motivação sexual dos animais ou a capacidade motora para execução da cópula visto que a latência para o início do comportamento sexual (LMI) e o tempo necessário para a execução da primeira intromissão (LI) não foram afetados. Também não foram encontradas evidências para modificação do limiar ejacutório visto que a quantidade de estímulo necessária para ejaculação, estimada a partir do NI, não foi modificada em nenhuma das diferentes doses testadas de ambas as drogas. Da mesma forma, a latência ejacutória dos animais não foi alterada por nenhuma das doses testadas de Nifedipina ou (S)-(+)-Niguldipina.

A Nifedipina na dose de 10 μ g/kg reduziu significativamente o PR quando comparada ao grupo que recebeu veículo, porém, este efeito não foi dose-dependente já que as doses de 50 e 100 μ g/kg não afetaram este parâmetro. A (S)-(+)-Niguldipina, por outro lado, não foi capaz de alterar o PR nas doses testadas.

Os parâmetros do comportamento copulatório para as outras séries ejacutórias não puderam ser comparados estatisticamente devido ao número sucessivamente reduzido de animais que atingiram três ou mais ejaculações em todos os grupos; entretanto, comparações estatísticas foram realizadas para a segunda série ejacutória.

A avaliação dos parâmetros do comportamento copulatório para a segunda série ejacutória foi consistente com os resultados descritos para a primeira série ejacutória. Novamente, a Nifedipina na dose 10 μ g/kg reduziu significativamente o PR quando comparado com o grupo que recebeu veículo (veículo: 386,4 $\pm$ 14,10s (n=9), Nifedipina 10 μ g/kg: 309,3 $\pm$ 11,94s* (n=6), Nifedipina 50 μ g/kg: 386,5 $\pm$ 21,02s (n=6) e Nifedipina 100 μ g/kg: 371,90 $\pm$ 22,73s (n=7), *p<0,05 vs veículo) enquanto os outros parâmetros permaneceram inalterados. Consistentemente, as doses de 50 e

100µg/kg de Nifedipina não afetaram os parâmetros do comportamento copulatório avaliados. A (S)-(+)-Niguldipina não afetou qualquer parâmetro do comportamento copulatório da segunda série ejaculatória em nenhuma das doses. Adicionalmente, a Nifedipina e a (S)-(+)-Niguldipina não afetaram o peso úmido dos PS.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros do comportamento copulatório dos animais tratados com Tamsulosin ou veículo (0,3ml de salina 0,9%).

Tabela 3. Parâmetros do comportamento copulatório de ratos machos sexualmente experientes tratados com Tamsulosin ou veículo. O Tamsulosin ou o veículo foram administrados por via intravenosa 15 minutos antes da análise do comportamento copulatório. Por motivos de clareza são apresentados somente os parâmetros da primeira série ejaculatória.

<i>Tamsulosin (µg/kg)</i>				
	Veículo (n=10)	0,3 (n=9)	1,0 (n=6)	3,0 (n=6)
LMI (s)	10,90 ± 1,96	14,44 ± 3,04	14,40 ± 5,27	12,17 ± 2,18
LI (s)	12,63 ± 2,32	21,38 ± 4,98	22,00 ± 9,23	14,33 ± 2,62
NI	8,0 (7,0-15,0)	9,0 (7,0-12,0)	11,0 (9,0-11,0)	9,0 (8,0-12,0)
LE (s)	347,70 ± 61,90	270,30 ± 42,13	399,70 ± 55,83	240,30 ± 52,72
PR (s)	342,80 ± 13,12	354,80 ± 29,11	327,20 ± 14,27	326,30 ± 26,92
PS (mg)	90 (65-145)	40 (30-52)*	NA	NA
LMI: Latência para 1ª monta ou intromissão; LI: Latência para 1ª intromissão; NI: Número de intromissões para a 1ª ejaculação; LE: Latência ejaculatória; PR: Período refratário pós-ejaculatório; PS: Peso dos plugs seminais.				
Dados representam média ± epm (LMI, LI, LE e PR) ou mediana e intervalo interquartil (NI e PS); n=número de animais. NA: não avaliado devido ao número insuficiente de PS recuperados. *p<0,0005 vs veículo (teste de Mann-Whitney). Demais resultados p>0,05 vs veículo pela ANOVA (LMI, LI, LE e PR) ou Kruskal-Wallis (NI e PS).				

O tratamento com Tamsulosin 0,3 , 1,0 ou 3,0 μ g/kg não afetou nenhum dos parâmetros do comportamento copulatório avaliados.

O peso dos PS recuperados após a análise do comportamento copulatório foi reduzido significativamente ($\cong$ 66%) pelo tratamento com Tamsulosin 0,3 μ g/kg; além disso, a recuperação de PS foi proporcionalmente menor nos ratos tratados com Tamsulosin, pois somente 55,6% dos animais tratados tiveram ao menos um PS recuperado após a avaliação do comportamento copulatório, enquanto nos ratos tratados com veículo (controle) foi possível recuperar PS de todos os animais avaliados. Na dose de 1,0 μ g/kg de Tamsulosin foram recuperados PS de somente 2 dos 6 animais ($\cong$ 33%), além disso, também observou-se redução no peso dos PS, entretanto, devido ao baixo número de PS recuperados (n=4 PS, pesos: 60, 60, 40 e 30mg) não foi possível estabelecer com precisão a porcentagem total de redução do peso dos PS esperada com esta dose de Tamsulosin. Não foram recuperados PS de animais tratados com Tamsulosin 3,0 μ g/kg.

DISCUSSÃO

As contrações do ducto deferente e vesícula seminal do rato à noradrenalina foram potentemente inibidas pelas diidropiridinas Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina caracterizando, desta forma, a participação do influxo do íon cálcio via canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L nas respostas contráteis ao estímulo adrenérgico. De fato, a presença destes canais em tecidos de rato foi demonstrada eletrofisiologicamente no ducto deferente (Belevych *et al.*, 1999) e através de experimentos de ligação com drogas seletivas marcadas radioativamente no ducto deferente e vesícula seminal (Castillo *et al.*, 1992; Powers *et al.*, 1985). Além disso, a gênese e propagação de potenciais de ação e as contrações do ducto deferente à estimulação elétrica do nervo hipogástrico *in vitro* (Blakeley *et al.*, 1981) ou à ativação dos nervos intramurais do ducto deferente (Brown *et al.*, 1983; Mallard *et al.*, 1992) são inibidos pelo bloqueio de canais dependentes de voltagem tipo L.

De maneira similar, a caracterização eletrofisiológica de correntes de cálcio tipo L em células de músculo liso do ducto deferente humano (Park *et al.*, 2004) e o seu papel nas contrações induzidas pela ativação dos nervos intramurais do ducto deferente (Fovaeus *et al.*, 1987) e à noradrenalina exógena (Furukawa *et al.*, 1995) são conhecidos, embora no ducto deferente humano o componente adrenérgico dependente da participação destes canais seja proporcionalmente menor, cerca de 30-40% da resposta à noradrenalina exógena.

Como observado por Silva e colaboradores (Silva *et al.*, 1999) aproximadamente 30% da resposta à noradrenalina na vesícula seminal foi resistente ao bloqueio de canais de cálcio tipo L. Adicionalmente, este trabalho demonstrou que esta não é uma particularidade das diidropiridinas visto que o verapamil, um bloqueador de canais de cálcio pertencente à classe química das

fenilalquilaminas, também não foi capaz de abolir completamente a resposta contrátil da vesícula seminal à noradrenalina.

Interessantemente, o bloqueio de canais dependentes de voltagem tipo L não abole totalmente as respostas contráteis à noradrenalina exógena da vesícula seminal humana. Neste tecido a utilização de um antagonista de receptores para o trifosfato de inositol e de um inibidor da Rho-quinase reduzem de maneira significativa a magnitude de contração à noradrenalina exógena (Birowo *et al.*, 2009) indicando a participação de fontes de cálcio intracelular e de vias alternativas independentes de cálcio na resposta contrátil.

Fato similar ao observado na vesícula seminal humana é constatado no tecido do cobaio. De acordo com investigações em células de músculo liso isoladas da vesícula seminal de cobaio as despolarizações do potencial de membrana de repouso e os transientes de cálcio intracelular induzidos pela noradrenalina endógena ou exógena são potentemente inibidos pela Nifedipina, porém, são abolidos completamente somente após a inibição da liberação de cálcio de estoques intracelulares (Kubota *et al.*, 2003). Juntos, estes resultados demonstram que na vesícula seminal além do influxo de cálcio extracelular via canais dependentes de voltagem tipo L a mobilização de cálcio de estoques intracelulares e/ou o influxo de cálcio extracelular via outros canais de membrana são importantes na resposta contrátil à noradrenalina.

A maior potência da (S)-(+)-Niguldipina na inibição das contrações do ducto deferente e vesículas seminais à noradrenalina quando comparada à Nifedipina é esperada visto que além de possuir afinidade cerca de sete a dez vezes maior pelos canais dependentes de voltagem tipo L, a (S)-(+)-Niguldipina também antagoniza potentemente α_{1A} -ARs (pK_i =9,65-9,83 (Chess-Williams *et al.*, 1996; Graziadei *et al.*,

1989a), responsáveis pela contração desses órgãos à noradrenalina exógena (Pupo, 1998; Silva *et al.*, 1999).

A estimativa de potência inibitória da Nifedipina na contração do ducto deferente à noradrenalina observada neste estudo ($pIC_{50}=7,6 \pm 0,07$) é consistente com a estimativa de $7,8 \pm 0,1$ descrita por Boselli e colaboradores (Boselli *et al.*, 1998). Na vesícula seminal, entretanto, experimentos avaliando a participação de canais de cálcio tipo L nas contrações à noradrenalina empregaram concentrações maximamente efetivas de Nifedipina ($10\mu M$) (Silva *et al.*, 1999) inviabilizando desta forma a comparação de estimativas de potência. Estudos avaliando a potência inibitória da (S)-(+)-Niguldipina na reatividade do ducto deferente e vesículas seminais à noradrenalina não foram encontrados.

O Prazosin antagonizou as respostas contráteis do ducto deferente e vesícula seminal à noradrenalina de maneira consistente com um antagonismo competitivo, deslocando as curvas concentração-resposta à noradrenalina à direita sem redução da resposta máxima tecidual; além disso, a estimativa de afinidade obtida através da análise de regressão de Schild ($pA_2= 9,50$ e $9,60$ no ducto deferente e vesícula seminal, respectivamente) e a inclinação não diferente da unidade teórica reforçam a hipótese de que nestes órgãos os adrenoreceptores α mediando as respostas contráteis à noradrenalina exógena são do tipo α_1 (Pupo, 1998; Sharif, 1994; Shima, 1993; Silva *et al.*, 1999).

Os resultados deste estudo corroboram para a caracterização do Tamsulosin como um potente antagonista de α_1 -ARs. A estimativa de potência obtida no ducto deferente ($pA_2=10,25$) é consistente com valores obtidos no ducto deferente humano ($pA_2/pK_i= 10,00-10,22$) (Furukawa *et al.*, 1995; O'Malley *et al.*, 1998) e condizente com estimativas de afinidade para receptores α_{1A} obtidas em ensaios de ligação com

drogas marcadas radioativamente em receptores recombinantes ou nativos ($pK_i=9,20-10,55$ (Ford *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 1997).

Além da elevada potência, o comportamento antagonista apresentado pelo Tamsulosin no ducto deferente e vesícula seminal foi caracterizado por marcante depressão na tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina. Este comportamento do Tamsulosin foi descrito no antagonismo das respostas contráteis à noradrenalina de órgãos como o ducto deferente de rato e humano (Noble *et al.*, 1997), colo da bexiga de coelhos (Kava *et al.*, 1998) e veia femoral de coelhos (Takayanagi *et al.*, 1986). Cabe ressaltar que esta é a primeira caracterização do perfil intransponível apresentado pelo Tamsulosin nas contrações induzidas pela noradrenalina na vesícula seminal.

Embora o Tamsulosin tenha reduzido as contrações no ducto deferente e vesícula seminal de maneira concentração-dependente os efeitos nos dois órgãos foram qualitativamente diferentes. No ducto deferente a ação antagonista do Tamsulosin nas doses testadas foi sempre acompanhada de reduções da potência da noradrenalina e a redução na resposta máxima observada foi de aproximadamente 86%. Já na vesícula seminal, as concentrações de 10 e 30nM de Tamsulosin não tiveram efeito adicional na redução da potência da noradrenalina embora tenham praticamente abolido a resposta contrátil tecidual ao agonista. De fato, o perfil do antagonismo intransponível apresentado pelo Tamsulosin na vesícula seminal é semelhante ao comportamento de antagonistas competitivos irreversíveis em situações onde há “reserva” de receptores, caracterizado por reduções na potência dos agonistas sob determinada faixa de concentrações seguido por reduções concentração-dependentes da resposta máxima atingida sem alterações de potência (Chess-Williams *et al.*, 2002). Entretanto, experimentos de

ligação com Tamsulosin marcado radioativamente demonstram que a interação deste antagonista com α_{1A} -ARs é reversível e completamente deslocada por outras drogas antagonistas competitivos clássicos como o Prazosin e agonistas como a noradrenalina e adrenalina (Yazawa *et al.*, 1993). Portanto, não há subsídio para a hipótese de antagonismo intransponível resultando numa inativação irreversível dos α_1 -ARs pelo Tamsulosin.

Tendo em vista a dependência das contrações do ducto deferente e vesícula seminal no influxo de cálcio extracelular investigou-se se o comportamento intransponível apresentado pelo Tamsulosin poderia ser creditado a uma redução no influxo do íon cálcio através do bloqueio direto de canais de cálcio. Nossos resultados e os apresentados por (Noble *et al.*, 1997) negam esta hipótese visto que o Tamsulosin não modificou as contrações induzidas pelo influxo de cloreto de cálcio adicionado de maneira cumulativa à solução nutritiva em solução com alta concentração de potássio. Dados obtidos em experimentos de ligação com drogas marcadas radioativamente fornecem suporte adicional a estas observações já que o Tamsulosin 1 μ M desloca somente cerca de 20-22% da droga radioativa (diidropiridina ou fenilalquilamina) associada aos canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L (Kuo *et al.*, 2000), indicando que possivelmente nas concentrações empregadas neste projeto ele não interage com os canais de cálcio de maneira significativa.

Os resultados apresentados nesta dissertação não podem contribuir adicionalmente para a elucidação dos mecanismos moleculares determinantes do perfil intransponível apresentado pelo Tamsulosin e, portanto, não serão discutidos adicionalmente. Ressalta-se, entretanto, que investigações mais específicas

direcionadas ao esclarecimento deste comportamento antagonista estão em andamento neste laboratório.

As bloqueadoras de canais de cálcio Nifedipina e (S)-(+)-Niguldipina não foram capazes de modificar parâmetros relacionados especificamente com o limiar ejaculatório (NI e LE, revisto em (de Jong *et al.*, 2006)) embora nas mesmas doses empregadas neste estudo a Nifedipina reduza em até 40% a pressão arterial média e a resistência vascular nos leitos mesentérico e renal de ratos (Smits *et al.*, 1993), em 40% as contrações da bexiga urinária estimuladas com carbacol e em 81% a frequência de contrações espontâneas da bexiga urinária de ratos (Maggi *et al.*, 1982) e a (S)-(+)-Niguldipina (65µg/kg iv) reduz a significativamente (≈30%) a pressão arterial média em ratos (Sanders *et al.*, 1988).

Adicionalmente, na concentração plasmática de Nifedipina livre de aproximadamente 20 nM estimada a partir do perfil de concentração plasmática da Nifedipina após administração da dose de 100µg/kg iv (Sattari *et al.*, 2003) e da fração plasmática livre da Nifedipina (3,5%(Eliot *et al.*, 1999)) cerca de 40% da resposta do ducto deferente e 30% da resposta da vesícula seminal à noradrenalina estariam inibidas. Cabe ressaltar ainda que a inibição citada anteriormente foi calculada a partir do efeito da Nifedipina em estímulos máximos ou submáximos da noradrenalina atingidos in vitro, situações que podem representar condições suprafisiológicas que subestimam a verdadeira potência do bloqueador de canais de cálcio in vivo.

A Nifedipina reduziu significativamente o período de inatividade sexual após a primeira e segunda ejaculações na dose mais baixa avaliada. A extensão do período refratário pós-ejaculatório é um parâmetro mediado no sistema nervoso central e de fato a Nifedipina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica devido a sua

elevada lipossolubilidade (Janicki *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 1991; Uchida *et al.*, 1997). Além disso, a presença de canais dependentes de voltagem tipo L no tecido encefálico foi identificada através de experimentos de autoradiografia ou de ligação com diidropiridinas marcadas radioativamente às preparações de membrana de regiões discretas do encéfalo de ratos (Gould *et al.*, 1985; Huguet *et al.*, 1987), suportando a hipótese do efeito central da Nifedipina atuando nestes sítios específicos. Dentre as substâncias moduladoras do período refratário pós-ejaculatório já identificadas estão a ocitocina (Hughes *et al.*, 1987) e sistemas neurotransmissores incluindo o noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e GABAérgico (Fernandez-Guasti *et al.*, 2003; McIntosh *et al.*, 1984a; McIntosh *et al.*, 1984b; McIntosh *et al.*, 1984c). No rato, a lesão dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico prolongam de maneira significativa o período refratário pós-ejaculatório enquanto a redução dos níveis de serotonina ou a inibição farmacológica do sistema GABAérgico tem o efeito contrário.

Interessantemente, a administração sistêmica de diferentes diidropiridinas modifica o conteúdo cerebral de serotonina e dopamina e seus metabólitos demonstrando que o bloqueio de canais de cálcio tipo L é capaz de alterar a atividade destes sistemas de neurotransmissores (Gaggi *et al.*, 1995a; Gaggi *et al.*, 1995b). Além disso, estudos empregando eletrofisiologia em neurônios do encéfalo de ratos demonstram que canais dependentes de voltagem tipo L modulam a liberação de GABA dos terminais neuronais em diferentes núcleos do sistema nervoso e que o efeito final da ativação destes canais é um aumento (Bhaukaurally *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2002) ou redução (Druzin *et al.*, 2002) da liberação de GABA. A identificação do(s) sistema(s) de neurotransmissor(es) envolvido(s) responsável(eis) pela mediação dos efeitos da Nifedipina através da

utilização de testes específicos esclarecerão o mecanismo pelo qual a Nifedipina afeta o período refratário pós-ejaculatório.

Como ressaltado anteriormente, embora a (S)-(+)-Niguldipina apresente afinidade sete a dez vezes maior pelos canais dependentes de voltagem tipo L quando comparada com a Nifedipina, a (S)-(+)-Niguldipina foi incapaz de modificar o período refratário pós-ejaculatório. Assim como a Nifedipina a (S)-(+)-Niguldipina apresenta elevada lipossolubilidade (coeficiente de partição em membranas biológicas 16.000-100.000(Boer *et al.*, 1989)) e, portanto, sua ineficácia não é devido à inacessibilidade ao sistema nervoso central, hipótese corroborada pela ação protetora da droga no teste de eletrochoque máximo-convulsivo (Borowicz *et al.*, 1997).

Curiosamente, as diidropiridinas podem apresentar efeitos sítio-específicos com diferentes drogas apresentando espectros de ação em sítios que não necessariamente se sobrepõem no sistema nervoso central (Gaggi *et al.*, 1995b), desta forma, a efetividade da Nifedipina mas não da (S)-(+)-Niguldipina na modulação do período refratário pós-ejaculatório pode representar ação seletiva da Nifedipina em um sítio não compartilhado com a (S)-(+)-Niguldipina.

O Tamsulosin não alterou parâmetros associados à motivação sexual dos ratos e estes resultados são consistentes com as observações clínicas que demonstram que as disfunções sexuais observadas com a utilização do Tamsulosin no tratamento da hiperplasia prostática benigna, são disfunções ejaculatórias relacionadas à modificação de características seminais (volume ou constituição) mas não de disfunções de libido ou orgásticas (Rosen *et al.*, 2009).

Os presentes resultados contrastam com os efeitos do Tamsulosin no comportamento copulatório de ratos descritos por Ratnasooriya e Wadsworth

(Ratnasooriya *et al.*, 1994). No referido trabalho os autores observaram que a administração de Tamsulosin (150µg/kg, subcutaneamente) foi associada a uma intensa redução nas latências para a primeira monta e para a primeira intromissão e no número de montas e de intromissões realizados para a primeira ejaculação. A redução da latência para a primeira intromissão e do número de montas observadas pelos autores pode ser creditada a um efeito pró-erétil já caracterizado em modelos experimentais com outros antagonistas de α_1 -ARs (Sironi *et al.*, 2000). Este efeito resultaria da facilitação do fluxo sangüíneo ao pênis devido à redução do tônus contrátil das células de músculo liso dos tecidos eréteis e das artérias penianas via antagonismo de α_1 -ARs, responsáveis pela contração ao estímulo adrenérgico nestes tecidos (Andersson *et al.*, 1997; Simonsen *et al.*, 2002).

A redução do peso dos plugs seminais observada em ratos tratados com Tamsulosin demonstra que este antagonista de α_1 -ARs afetou de maneira significativa a fase de emissão do reflexo ejaculatório nas doses testadas. É bem caracterizado que o plug seminal de ratos é constituído principalmente por material da vesícula seminal coagulado em função da mistura com secreções da glândula de coagulação. Além disso, o peso do plug seminal é diretamente relacionado à quantidade de secreção emitida pelas vesículas seminais durante o processo de ejaculação (Carballada *et al.*, 1992), desta forma, a redução do peso dos plugs seminais reflete a ação inibitória do Tamsulosin sobre a atividade contrátil da vesícula seminal. Estes efeitos são consistentes com as observações que demonstram que o Tamsulosin reduz a elevação da pressão intraluminal da vesícula seminal induzida pela estimulação do nervo hipogástrico em ratos anestesiados (Giuliano *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004).

Outros eventos também relacionados à ejaculação como a contração da próstata e da musculatura da uretra (induzidas pela administração intravenosa de fenilefrina 10µg/kg) são potentemente inibidas pelo Tamsulosin nas doses utilizadas neste estudo (Kontani *et al.*, 2002).

Drogas efetivas no retardo da ejaculação como a fluoxetina e a paroxetina (inibidores seletivos da recaptura de serotonina) também inibem a atividade contrátil do ducto deferente e vesícula seminal in vitro e in vivo, efeitos creditados à atividade de bloqueio de canais de cálcio tipo L (Kara *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2004; Madeo *et al.*, 2008; Stauderman *et al.*, 1992; Waldinger *et al.*, 1994; Yaris *et al.*, 2003). Atualmente estes efeitos periféricos têm sido utilizados como suporte para a hipótese de que parte do retardo na ejaculação observada experimentalmente e clinicamente com estas drogas pode ser devido à redução direta da atividade contrátil dos ductos deferentes e vesículas seminais in vivo (Seo *et al.*, 2001).

Fisiologicamente, o reflexo ejaculatório consiste em duas fases distintas, a emissão seminal e a expulsão. Na primeira fase, espermatozóides e secreções da vesícula seminal e glândulas prostáticas são transportadas até a uretra via contrações das células de músculo liso destes órgãos culminando na deposição de sêmen na porção prostática da uretra. A distensão da uretra causada pela deposição do sêmen ativa terminais nervosos e desencadeia reflexos neurais culminando em uma série de contrações de músculos estriados da região pélvica promovendo a expulsão do sêmen pelo meato da uretra (Coolen *et al.*, 2004). De fato, experimentalmente a distensão da uretra pela injeção de salina ou sua estimulação mecânica desencadeia uma série de eventos que mimetizam a ejaculação, incluindo expulsão dos conteúdos da uretra. Interessantemente estas respostas podem ser prevenidas pela anestesia da uretra fornecendo evidência de que, pelo menos

experimentalmente, o estímulo fornecido pela emissão do sêmen é suficiente para desencadear a ejaculação (McKenna *et al.*, 1991).

Baseada nas informações supracitadas a hipótese norteadora deste projeto propôs que a modificação do transporte de sêmen até a uretra impediria ou pelo menos retardaria a ativação dos eventos subseqüentes do reflexo ejaculatório, resultando assim no retardo da ejaculação. Porém os resultados obtidos não suportam esta hipótese visto que a inibição da fase de emissão seminal com o Tamsulosin ou a utilização de drogas que potencialmente reduzem a atividade contrátil dos órgãos participantes dessa fase do reflexo ejaculatório foram incapazes de afetar a latência ejaculatória dos animais. Como ressaltado durante o texto, as doses das drogas empregadas neste estudo inibem de maneira significativa eventos fisiológicos relacionados à ejaculação e, portanto, é improvável que a incapacidade das drogas em prolongar a latência ejaculatória seja causada pela ineficiência das doses selecionadas. De fato, a vasectomia (McGlynn *et al.*, 1974) ou a redução dramática do volume de ejaculado após a remoção cirúrgica das vesículas seminais (Beach *et al.*, 1963) ou após a simpatectomia química com guanetidina (Holmes *et al.*, 1991) não modificam o desempenho do comportamento copulatório e mais especificamente a latência ejaculatória em ratos. Similarmente, em humanos a atonia dos ductos deferentes e vesículas seminais resultante da desnervação simpática invariavelmente observada durante a cirurgia para linfadenectomia retroperitoneal para o tratamento de câncer testicular não provoca alterações na capacidade erétil ou orgasmo (Kedia *et al.*, 1975). Além disso, o mesmo procedimento de anestesia da uretra que previne a ocorrência da ejaculação induzida pelo estímulo da mucosa da uretra no animal anestesiado (McKenna *et al.*,

1991) não modifica o desempenho do comportamento copulatório de ratos (Holmes *et al.*, 1991).

Em conjunto, os resultados obtidos neste projeto não suportam a redução da contratilidade do ducto deferente e vesículas seminais através do antagonismo de α_1 -AR's e/ou do bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L como abordagens efetivas no retardo da ejaculação.

Cabe ressaltar que capacidade do Tamsulosin em abolir totalmente a formação de plugs seminais em conjunto com a observação de que a fentolamina é capaz de inibir totalmente as contrações da vesícula seminal via estimulação dos nervos intramurais (Iravani *et al.*, 1994), favorece a hipótese que *in vivo* a atividade contrátil da vesícula seminal de rato é predominantemente controlada pelo sistema nervoso autônomo simpático via liberação de noradrenalina e ativação de α_1 -ARs. Neste contexto, a manutenção da latência ejaculatória inalterada frente a marcante inibição da atividade contrátil da vesícula seminal durante a cópula demonstra ser pouco provável que a modulação da contração deste órgão seja um alvo efetivo para o retardo da ejaculação.

Adicionalmente, os resultados desta dissertação também não suportam a hipótese que o retardo da ejaculação de drogas efetivas no tratamento da ejaculação precoce como os inibidores seletivos da recaptura de serotonina tem algum componente periférico, creditado à modulação da contratilidade do ducto deferente e vesículas seminais.

DISFUNÇÕES EJACULATORIAS: IMPACTO DO COMPORTAMENTO INTRANSPONÍVEL APRESENTADO PELO TAMSULOSIN

O Tamsulosin ocupa uma posição de destaque dentre os antagonistas de α_1 -ARs utilizados terapeuticamente no tratamento dos sintomas da hiperplasia prostática benigna devido a características particulares como ação terapêutica rápida e prolongada, menor incidência de efeitos hipotensivos, desnecessidade de aumento gradual da dose até a dose terapeuticamente ótima e também devido à facilidade na aderência ao tratamento devido ao regime diário de dose única (Schulman *et al.*, 1996).

A incidência de efeitos adversos comumente associados aos antagonistas de α_1 -AR's como dores de cabeça, taquicardia ou palpitação, sonolência e hipotensão postural é comparável entre pacientes que recebem Tamsulosin e pacientes que recebem placebo em estudos clínicos de fase III. Entretanto, embora o Tamsulosin seja bem tolerado, sua utilização é consistentemente associada à incidência significativa de disfunções ejaculatórias, diferentemente do observado com a maioria dos outros antagonistas de α_1 -ARs terapeuticamente utilizados. De fato, 4,5-18% dos pacientes tratados com Tamsulosin relatam a ocorrência de disfunção ejaculatória (Chapple, 1996). Impressionantemente, em um estudo clínico de fase III avaliando a eficácia do Tamsulosin no tratamento de hiperplasia prostática benigna desenvolvido em conjunto em 14 centros clínicos dos Estados Unidos, cerca de 30% dos pacientes tratados com Tamsulosin (de um total de 949 indivíduos) relataram a ocorrência de disfunção ejaculatória (Narayan *et al.*, 2001).

De maneira mais específica, as disfunções ejaculatórias observadas com a administração de Tamsulosin crônica ou agudamente são representadas por redução do volume de ejaculado e anejaculação (Hellstrom *et al.*, 2006; Hellstrom *et*

al., 2009). Além disso, análises do sêmen de homens tratados com Tamsulosin, mas não com Alfuzosin, demonstram redução da viscosidade seminal e da quantidade e motilidade de espermatozóides no ejaculado (Hellstrom *et al.*, 2009).

As secreções da vesícula seminal contribuem com até 80% do volume total do ejaculado (Giuliano *et al.*, 2005); portanto, parece consistente a hipótese que a disfunção ejaculatória causada pelo Tamsulosin resulte do antagonismo de α_1 -ARs na vesícula seminal com conseqüente inibição da atividade contrátil durante a fase de emissão do reflexo ejaculatório. De fato, o Tamsulosin reduziu o peso dos plugs seminais *in copula* e estes resultados são consistentes com a observação de que ele é capaz de reduzir a elevação de pressão intraluminal da vesícula seminal induzida pela estimulação do nervo hipogástrico e as contrações da vesícula humana durante a ejaculação (Giuliano *et al.*, 2004; Hisasue *et al.*, 2006).

Porém, a relação entre antagonismo de α_1 -ARs, inibição da atividade contrátil da vesícula seminal e disfunções ejaculatórias não é tão simples visto que embora outros antagonistas de α_1 -ARs como o Prazosin, Terazosin e o Alfuzosin também sejam efetivos na inibição da atividade contrátil da vesícula seminal e do ducto deferente *in vivo* (Giuliano *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2008), não estão associados à ocorrência de disfunções ejaculatórias. Além disso, a fração de receptores α_1 -ARs teoricamente antagonizados nas vesículas seminais e ductos deferentes pelo Tamsulosin (89,5%), Doxazosin (81,4%), Prazosin (83,3%) e Terazosin (89,7%) nas respectivas concentrações plasmáticas terapêuticas são muito semelhantes (Ito *et al.*, 2007).

Neste contexto, a caracterização do perfil de antagonismo intransponível apresentado pelo Tamsulosin no ducto deferente e vesícula seminal realizada neste projeto tem sua importância destacada. O Tamsulosin reduz de maneira

concentração dependente a força de contração máxima desenvolvida pelo ducto deferente e vesícula seminal ao estímulo adrenérgico via ativação α_1 -ARs, e este efeito não é suplantado pela concentração máxima de noradrenalina alcançada nos experimentos *in vitro* (até 1 mM). Diferentemente, embora o Prazosin tenha antagonizado as contrações de ambos os órgãos à noradrenalina com alta afinidade, seus efeitos puderam ser superados aumentando-se suficientemente a concentração de noradrenalina *in vitro*, caracterizando o comportamento *antagonista competitivo reversível* clássico.

De acordo com estas observações, um dos fatores que provavelmente contribuem para a incidência de disfunções ejaculatórias com o Tamsulosin consiste na redução da capacidade contrátil e conseqüentemente do volume de sêmen e da quantidade de espermatozóides emitidos pela vesícula seminal e pelo ducto deferente ao estímulo adrenérgico ocasionada pelo antagonismo intransponível apresentado pelo Tamsulosin nos α_1 -ARs destes órgãos. Diferentemente, devido à *transponibilidade* do efeito dos outros antagonistas de α_1 -ARs na resposta contrátil máxima do ducto deferente e vesícula seminal, provavelmente, a noradrenalina endógena liberada pelas descargas simpáticas é capaz de transpor a ocupação dos α_1 -ARs e induzir atividade contrátil para emissão de um volume normal de sêmen, justificando, desta forma, a menor incidência de disfunções ejaculatórias observada com outros antagonistas de α_1 -ARs clinicamente utilizados no tratamento de hiperplasia prostática benigna.

Interessantemente, a fenoxibenzamina, um antagonista de α -ARs que reduz a capacidade contrátil do ducto deferente (Chess-Williams *et al.*, 2002) e vesícula seminal à noradrenalina (Silva *et al.*, 1999) devido à inativação irreversível de α_1 -ARs induz disfunções ejaculatórias muito similares àquela observada com o

Tamsulosin, caracterizada por intensa redução do volume de ejaculado sem afetar a sensação de orgasmo subsequente à ejaculação (Gerstenberg *et al.*, 1990), fornecendo suporte adicional à proposta apresentada nesta dissertação.

Portant, o mecanismo molecular pelo qual o Tamsulosin apresenta o comportamento intransponível nos α_{1A} -ARs do ducto deferente e vesícula seminal merece investigação adicional.

CONCLUSÕES

- O antagonismo de α_1 -ARs e/ou o bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L no ducto deferente e vesícula seminal não são capazes de retardar a ejaculação, embora afetem de maneira significativa a fase de emissão do reflexo ejaculatório;
- O comportamento intransponível apresentado pelo Tamsulosin nos α_1 -ARs do ducto deferente e vesícula seminal contribui para as disfunções ejaculatórias observadas clinicamente com o Tamsulosin;
- A modulação da contratilidade da vesícula seminal e ducto deferente não oferece um alvo efetivo para o retardo da ejaculação;

Referências bibliográficas

- ALLARD, J., TRUITT, W.A., MCKENNA, K.E. & COOLEN, L.M. (2005). Spinal cord control of ejaculation. *World J Urol*, **23**, 119-26.
- ALM, P. (1982). On the autonomic innervation of the human vas deferens. *Brain Res Bull*, **9**, 673-7.
- ALTHOF, S.E. (2006). Prevalence, characteristics and implications of premature ejaculation/rapid ejaculation. *J Urol*, **175**, 842-8.
- ALTHOF, S.E. (2005). Psychological treatment strategies for rapid ejaculation: rationale, practical aspects, and outcome. *World J Urol*, **23**, 89-92.
- ANDERSSON, K.E. & STIEF, C.G. (1997). Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. *World J Urol*, **15**, 14-20.
- ARUNLAKSHANA, O. & SCHILD, H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother*, **14**, 48-58.
- BEACH, F.A. & WILSON, J.R. (1963). Mating Behavior in Male Rats after Removal of the Seminal Vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **49**, 624-6.
- BELEVYCH, A.E., ZIMA, A.V., VLADIMIROVA, I.A., HIRATA, H., JURKIEWICZ, A., JURKIEWICZ, N.H. & SHUBA, M.F. (1999). TTX-sensitive Na(+) and nifedipine-sensitive Ca(2+) channels in rat vas deferens smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, **1419**, 343-52.
- BHAUKAURALLY, K., PANATIER, A., POULAIN, D.A. & OLIET, S.H. (2005). Voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes mediating GABAergic transmission in the rat supraoptic nucleus. *Eur J Neurosci*, **21**, 2459-66.
- BIERING-SORENSEN, F. & SONKSEN, J. (2001). Sexual function in spinal cord lesioned men. *Spinal Cord*, **39**, 455-70.
- BIROWO, P., UCKERT, S., KEDIA, G.T., SONNENBERG, J.E., THON, W.F., RAHARDJO, D. & KUCZYK, M.A. (2009). Characterization of the Effects of Various Drugs Likely to Affect Smooth Muscle Tension on Isolated Human Seminal Vesicle Tissue. *Urology*.
- BLAKELEY, A.G., BROWN, D.A., CUNNANE, T.C., FRENCH, A.M., McGRATH, J.C. & SCOTT, N.C. (1981). Effects of nifedipine on electrical and mechanical responses of rat and guinea pig vas deferens. *Nature*, **294**, 759-61.
- BOER, R., GRASSEGER, A., SCHUDT, C. & GLOSSMANN, H. (1989). (+)-Niguldipine binds with very high affinity to Ca²⁺ channels and to a subtype of alpha 1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, **172**, 131-45.
- BORGDOFF, A.J., BERNABE, J., DENYS, P., ALEXANDRE, L. & GIULIANO, F. (2008). Ejaculation elicited by microstimulation of lumbar spinothalamic neurons. *Eur Urol*, **54**, 449-56.
- BOROWICZ, K.K., GASIOR, M., KLEINROK, Z. & CZUCZWAR, S.J. (1997). Influence of isradipine, niguldipine and dantrolene on the anticonvulsive action of conventional antiepileptics in mice. *Eur J Pharmacol*, **323**, 45-51.
- BOSELLI, C., BIANCHI, L., BARBIERI, A. & GRANA, E. (1998). Effect of calcium antagonists on the response to noradrenaline in the whole and bisected rat vas deferens. *J Auton Pharmacol*, **18**, 297-306.
- BROWN, D.A., DOCHERTY, J.R., FRENCH, A.M., MACDONALD, A., McGRATH, J.C. & SCOTT, N.C. (1983). Separation of adrenergic and non-adrenergic contractions to field stimulation in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol*, **79**, 379-93.
- BURT, R.P., CHAPPLE, C.R. & MARSHALL, I. (1998). Alpha1A-adrenoceptor mediated contraction of rat prostatic vas deferens and the involvement of ryanodine stores and Ca²⁺ influx stimulated by diacylglycerol and PKC. *Br J Pharmacol*, **123**, 317-25.

- BURT, R.P., CHAPPLE, C.R. & MARSHALL, I. (1996). The role of diacylglycerol and activation of protein kinase C in alpha 1A-adrenoceptor-mediated contraction to noradrenaline of rat isolated epididymal vas deferens. *Br J Pharmacol*, **117**, 224-30.
- CARBALLADA, R. & ESPONDA, P. (1992). Role of fluid from seminal vesicles and coagulating glands in sperm transport into the uterus and fertility in rats. *J Reprod Fertil*, **95**, 639-48.
- CARRO-JUAREZ, M., CRUZ, S.L. & RODRIGUEZ-MANZO, G. (2003). Evidence for the involvement of a spinal pattern generator in the control of the genital motor pattern of ejaculation. *Brain Res*, **975**, 222-8.
- CARRO-JUAREZ, M. & RODRIGUEZ-MANZO, G. (2008). The spinal pattern generator for ejaculation. *Brain Res Rev*, **58**, 106-20.
- CASTILLO, C.J., LAFAYETTE, S., CARICATI-NETO, A., SETTE, M., JURKIEWICZ, N.H., GARCIA, A.G. & JURKIEWICZ, A. (1992). Low dihydropyridine receptor density in vasa deferentia of castrated rats. *Br J Pharmacol*, **105**, 257-8.
- CHAPPLE, C.R. (1996). Selective alpha 1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia: rationale and clinical experience. *Eur Urol*, **29**, 129-44.
- CHEN, J., KEREN-PAZ, G., BAR-YOSEF, Y. & MATZKIN, H. (2007). The role of phosphodiesterase type 5 inhibitors in the management of premature ejaculation: a critical analysis of basic science and clinical data. *Eur Urol*, **52**, 1331-9.
- CHEN, J., MABJEESH, N.J., MATZKIN, H. & GREENSTEIN, A. (2003). Efficacy of sildenafil as adjuvant therapy to selective serotonin reuptake inhibitor in alleviating premature ejaculation. *Urology*, **61**, 197-200.
- CHESS-WILLIAMS, R., CHAPPLE, C.R., VERFURTH, F., NOBLE, A.J., COULDWELL, C.J. & MICHEL, M.C. (1996). The effects of SB 216469, an antagonist which discriminates between the alpha 1A-adrenoceptor and the human prostatic alpha 1-adrenoceptor. *Br J Pharmacol*, **119**, 1093-100.
- CHESS-WILLIAMS, R., MASON, S., SELLERS, D.J., WYLLIE, M. & CHAPPLE, C.R. (2002). The role of alpha1D-adrenoceptors in prostatic contraction examined using protection studies. *Auton Autacoid Pharmacol*, **22**, 291-6.
- CHOI, H.K., JUNG, G.W., MOON, K.H., XIN, Z.C., CHOI, Y.D., LEE, W.H., RHA, K.H., CHOI, Y.J. & KIM, D.K. (2000). Clinical study of SS-cream in patients with lifelong premature ejaculation. *Urology*, **55**, 257-61.
- COOLEN, L.M., ALLARD, J., TRUITT, W.A. & MCKENNA, K.E. (2004). Central regulation of ejaculation. *Physiol Behav*, **83**, 203-15.
- COOLEN, L.M., OLIVIER, B., PETERS, H.J. & VEENING, J.G. (1997). Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT. *Physiol Behav*, **62**, 881-91.
- COOLEN, L.M., VEENING, J.G., WELLS, A.B. & SHIPLEY, M.T. (2003). Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: evidence for functional subdivisions. *J Comp Neurol*, **463**, 132-56.
- DE JONG, T.R., VEENING, J.G., WALDINGER, M.D., COOLS, A.R. & OLIVIER, B. (2006). Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold. *Neurosci Biobehav Rev*, **30**, 893-907.
- DIXON, J.S. & GOSLING, J.A. (1972). The distribution of autonomic nerves in the musculature of the rat vas deferens. A light and electron microscope investigation. *J Comp Neurol*, **146**, 175-88.
- DIXON, J.S., JEN, P.Y. & GOSLING, J.A. (1998). Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: a review. *Microsc Res Tech*, **42**, 423-32.

- DOLY, S., FISCHER, J., BRISORGUEIL, M.J., VERGE, D. & CONRATH, M. (2004). 5-HT_{5A} receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *J Comp Neurol*, **476**, 316-29.
- DRUZIN, M., HAAGE, D., MALININA, E. & JOHANSSON, S. (2002). Dual and opposing roles of presynaptic Ca²⁺ influx for spontaneous GABA release from rat medial preoptic nerve terminals. *J Physiol*, **542**, 131-46.
- ELIOT, L.A., FOSTER, R.T. & JAMALI, F. (1999). Effects of hyperlipidemia on the pharmacokinetics of nifedipine in the rat. *Pharm Res*, **16**, 309-13.
- FERNANDEZ-GUASTI, A. & RODRIGUEZ-MANZO, G. (2003). Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scand J Psychol*, **44**, 257-63.
- FORD, A.P., ARREDONDO, N.F., BLUE, D.R., JR., BONHAUS, D.W., JASPER, J., KAVA, M.S., LESNICK, J., PFISTER, J.R., SHIEH, I.A., VIMONT, R.L., WILLIAMS, T.J., MCNEAL, J.E., STAMEY, T.A. & CLARKE, D.E. (1996). RS-17053 (N-[2-(2-cyclopropylmethoxyphenoxy)ethyl]-5-chloro- α , α -dimethyl-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride), a selective α 1A-adrenoceptor antagonist, displays low affinity for functional α 1-adrenoceptors in human prostate: implications for adrenoceptor classification. *Mol Pharmacol*, **49**, 209-15.
- FOVAEUS, M., ANDERSSON, K.E. & HEDLUND, H. (1987). Calcium channel blockade and contractile responses in the isolated human vas deferens. *J Urol*, **138**, 654-8.
- FURUKAWA, K., ROSARIO, D.J., SMITH, D.J., CHAPPLE, C.R., UCHIYAMA, T. & CHESSE-WILLIAMS, R. (1995). α 1A-adrenoceptor-mediated contractile responses of the human vas deferens. *Br J Pharmacol*, **116**, 1605-10.
- GAGGI, R., DALL'OLIO, R., RONCADA, P. & GIANNI, A.M. (1995a). Effects of isradipine and darodipine on serotonergic system of the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*, **51**, 183-7.
- GAGGI, R., DALL'OLIO, R., RONCADA, P. & GIANNI, A.M. (1995b). Peculiar effects of isradipine and darodipine on the rat brain dopaminergic system. *Gen Pharmacol*, **26**, 303-8.
- GAJAR, S.A., TANO, T., RESENDE, A.C., BITENCOURT, J.A., DE LEMOS NETO, M., DAMIAO, R., CRIDDLE, D.N. & SOARES DE MOURA, R. (2007). Inhibitory effect of sildenafil on the human isolated seminal vesicle. *BJU Int*, **100**, 1322-5.
- GERSTENBERG, T.C., LEVIN, R.J. & WAGNER, G. (1990). Erection and ejaculation in man. Assessment of the electromyographic activity of the bulbocavernosus and ischiocavernosus muscles. *Br J Urol*, **65**, 395-402.
- GIULIANO, F. (2006). Impact of medical treatments for benign prostatic hyperplasia on sexual function. *BJU Int*, **97 Suppl 2**, 34-8; discussion 44-5.
- GIULIANO, F., BERNABE, J., DROUPY, S., ALEXANDRE, L. & ALLARD, J. (2004). A comparison of the effects of tamsulosin and alfuzosin on neurally evoked increases in bladder neck and seminal vesicle pressure in rats. *BJU Int*, **93**, 605-8.
- GIULIANO, F. & CLEMENT, P. (2005). Neuroanatomy and physiology of ejaculation. *Annu Rev Sex Res*, **16**, 190-216.
- GOULD, R.J., MURPHY, K.M. & SNYDER, S.H. (1985). Autoradiographic localization of calcium channel antagonist receptors in rat brain with [3H]nitrendipine. *Brain Res*, **330**, 217-23.
- GRAZIADEI, I., ZERNIG, G., BOER, R. & GLOSSMAN, H. (1989a). Stereoselective binding of niguldipine enantiomers to α 1A-adrenoceptors labeled with [3H]5-methyl-urapidil. *Eur J Pharmacol*, **172**, 329-37.

- GRAZIADEI, I., ZERNIG, G., GRASSEGER, A., BOER, R., SCHUDT, C. & GLOSSMANN, H. (1989b). Hydrophobic calcium channel ligands: methodical problems and their solution. *Am J Cardiol*, **64**, 431-501.
- HANCOCK, M.B. & PEVETO, C.A. (1979). A preganglionic autonomic nucleus in the dorsal gray commissure of the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*, **183**, 65-72.
- HELLSTROM, W.J. & SIKKA, S.C. (2006). Effects of acute treatment with tamsulosin versus alfuzosin on ejaculatory function in normal volunteers. *J Urol*, **176**, 1529-33.
- HELLSTROM, W.J. & SIKKA, S.C. (2009). Effects of alfuzosin and tamsulosin on sperm parameters in healthy men: results of a short-term, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *J Androl*, **30**, 469-74.
- HENRY, R. & MORALES, A. (2003). Topical lidocaine-prilocaine spray for the treatment of premature ejaculation: a proof of concept study. *Int J Impot Res*, **15**, 277-81.
- HISASUE, S., FURUYA, R., ITOH, N., KOBAYASHI, K., FURUYA, S. & TSUKAMOTO, T. (2006). Ejaculatory disorder caused by alpha-1 adrenoceptor antagonists is not retrograde ejaculation but a loss of seminal emission. *Int J Urol*, **13**, 1311-6.
- HOLMES, G.M. & SACHS, B.D. (1991). The ejaculatory reflex in copulating rats: normal bulbospongiosus activity without apparent urethral stimulation. *Neurosci Lett*, **125**, 195-7.
- HSIEH, J.T., CHANG, H.C., LAW, H.S., HSIEH, C.H. & CHENG, J.T. (1998). In vivo evaluation of serotonergic agents and alpha-adrenergic blockers on premature ejaculation by inhibiting the seminal vesicle pressure response to electrical nerve stimulation. *Br J Urol*, **82**, 237-40.
- HUGHES, A.M., EVERITT, B.J., LIGHTMAN, S.L. & TODD, K. (1987). Oxytocin in the central nervous system and sexual behaviour in male rats. *Brain Res*, **414**, 133-7.
- HUGUET, F., HUCHET, A.M., GERARD, P. & NARCISSE, G. (1987). Characterization of dihydropyridine binding sites in the rat brain: hypertension and age-dependent modulation of [3H](+)-PN 200-110 binding. *Brain Res*, **412**, 125-30.
- IRAVANI, M.M. & ZAR, M.A. (1994). Presence of neuropeptide Y in the rat seminal vesicle and its effects on noradrenaline- and nerve-induced contractions. *Br J Pharmacol*, **113**, 877-82.
- ITO, K., OHTANI, H. & SAWADA, Y. (2007). Assessment of alpha1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia based on the receptor occupancy theory. *Br J Clin Pharmacol*, **63**, 394-403.
- JANICKI, P.K., SIEMBAB, D., PAULO, E.A. & KRZASCIK, P. (1988). Single-dose kinetics of nifedipine in rat plasma and brain. *Pharmacology*, **36**, 183-7.
- JEN, P.Y., DIXON, J.S. & GOSLING, J.A. (1999). Colocalisation of neuropeptides, nitric oxide synthase and immunomarkers for catecholamines in nerve fibres of the adult human vas deferens. *J Anat*, **195 (Pt 4)**, 481-9.
- KARA, H., AYDIN, S., YUCEL, M., AGARGUN, M.Y., ODABAS, O. & YILMAZ, Y. (1996). The efficacy of fluoxetine in the treatment of premature ejaculation: a double-blind placebo controlled study. *J Urol*, **156**, 1631-2.
- KAVA, M.S., BLUE, D.R., JR., VIMONT, R.L., CLARKE, D.E. & FORD, A.P. (1998). Alpha1L-adrenoceptor mediation of smooth muscle contraction in rabbit bladder neck: a model for lower urinary tract tissues of man. *Br J Pharmacol*, **123**, 1359-66.
- KEDIA, K.R., MARKLAND, C. & FRALEY, E.E. (1975). Sexual function following high retroperitoneal lymphadenectomy. *J Urol*, **114**, 237-9.

- KIM, S.W., LEE, S.H. & PAICK, J.S. (2004). In vivo rat model to measure hypogastric nerve stimulation-induced seminal vesicle and vasal pressure responses simultaneously. *Int J Impot Res*, **16**, 427-32.
- KOBAYASHI, K., MASUMORI, N., KATO, R., HISASUE, S., FURUYA, R. & TSUKAMOTO, T. (2009). Orgasm is preserved regardless of ejaculatory dysfunction with selective alpha1A-blocker administration. *Int J Impot Res*, **21**, 306-10.
- 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**, 281-90.
- KUBOTA, Y., HASHITANI, H., FUKUTA, H., SASAKI, S., KOHRI, K. & SUZUKI, H. (2003). Mechanisms of excitatory transmission in circular smooth muscles of the guinea pig seminal vesicle. *J Urol*, **169**, 390-5.
- KUO, G.H., PROUTY, C., MURRAY, W.V., PULITO, V., JOLLIFFE, L., CHEUNG, P., VARGA, S., EVANGELISTO, M. & WANG, J. (2000). Design, synthesis, and structure-activity relationships of phthalimide-phenylpiperazines: a novel series of potent and selective alpha(1)(a)-adrenergic receptor antagonists. *J Med Chem*, **43**, 2183-95.
- LARSSON, K. & AHLENIUS, S. (1999). Brain and sexual behavior. *Ann N Y Acad Sci*, **877**, 292-308.
- LEPOR, H. (1998). Phase III multicenter placebo-controlled study of tamsulosin in benign prostatic hyperplasia. Tamsulosin Investigator Group. *Urology*, **51**, 892-900.
- LI, S., GEIGER, J.D. & LEI, S. (2008). Neurotensin enhances GABAergic activity in rat hippocampus CA1 region by modulating L-type calcium channels. *J Neurophysiol*, **99**, 2134-43.
- MADEO, B., BETTICA, P., MILLERI, S., BALESTRIERI, A., GRANATA, A.R., CARANI, C. & ROCHIRA, V. (2008). The effects of citalopram and fluoxetine on sexual behavior in healthy men: evidence of delayed ejaculation and unaffected sexual desire. A randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy, parallel group study. *J Sex Med*, **5**, 2431-41.
- MAGGI, C.A., GRIMALDI, G. & MELI, A. (1982). The effects of nifedipine and verapamil on spontaneous and carbachol-stimulated contractions of rat urinary bladder "in vivo". *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **257**, 288-94.
- MALLARD, N.J., MARSHALL, R.W., SITHERS, A.J. & SPRIGGS, T.L. (1992). Separation of putative alpha 1A- and alpha 1B-adrenoceptor mediated components in the tension response of the rat vas deferens to electrical field stimulation. *Br J Pharmacol*, **105**, 727-31.
- MARKS, L.S., GITTELMAN, M.C., HILL, L.A., VOLINN, W. & HOEL, G. (2009). Silodosin in the treatment of the signs and symptoms of benign prostatic hyperplasia: a 9-month, open-label extension study. *Urology*, **74**, 1318-22.
- MARTIN, D.J., LLUEL, P., GUILLLOT, E., COSTE, A., JAMMES, D. & ANGEL, I. (1997). Comparative alpha-1 adrenoceptor subtype selectivity and functional uroselectivity of alpha-1 adrenoceptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**, 228-35.
- MASON, R.P., RHODES, D.G. & HERBETTE, L.G. (1991). Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *J Med Chem*, **34**, 869-77.
- MCCONNELL, J., BENSON, G.S. & WOOD, J.G. (1982). Autonomic innervation of the urogenital system: adrenergic and cholinergic elements. *Brain Res Bull*, **9**, 679-94.

- McGLYNN, J.M. & ERPINO, M.J. (1974). Effects of vasectomy on the reproductive system and sexual behaviour of rats. *J Reprod Fertil*, **40**, 241-7.
- MCINTOSH, T.K. & BARFIELD, R.J. (1984a). Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. I. Serotonin and the post-ejaculatory refractory period. *Behav Brain Res*, **12**, 255-65.
- MCINTOSH, T.K. & BARFIELD, R.J. (1984b). Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. II. Dopamine and the post-ejaculatory refractory period. *Behav Brain Res*, **12**, 267-73.
- MCINTOSH, T.K. & BARFIELD, R.J. (1984c). Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. III. Norepinephrine and the post-ejaculatory refractory period. *Behav Brain Res*, **12**, 275-81.
- McKENNA, K.E., CHUNG, S.K. & McVARY, K.T. (1991). A model for the study of sexual function in anesthetized male and female rats. *Am J Physiol*, **261**, R1276-85.
- McKENNA, K.E. & NADELHAFT, I. (1986). The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J Comp Neurol*, **248**, 532-49.
- McMAHON, C.G., ABDO, C., INCROCCI, L., PERELMAN, M., ROWLAND, D., WALDINGER, M. & XIN, Z.C. (2004). Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J Sex Med*, **1**, 58-65.
- McMAHON, C.G., ALTHOF, S., WALDINGER, M.D., PORST, H., DEAN, J., SHARLIP, I., ADAIKAN, P.G., BECHER, E., BRODERICK, G.A., BUVAT, J., DABEES, K., GIRALDI, A., GIULIANO, F., HELLSTROM, W.J., INCROCCI, L., LAAN, E., MEULEMAN, E., PERELMAN, M.A., ROSEN, R., ROWLAND, D. & SEGRAVES, R. (2008). An evidence-based definition of lifelong premature ejaculation: report of the International Society for Sexual Medicine Ad Hoc Committee for the Definition of Premature Ejaculation. *BJU Int*, **102**, 338-50.
- MULRYAN, K., GITTERMAN, D.P., LEWIS, C.J., VIAL, C., LECKIE, B.J., COBB, A.L., BROWN, J.E., CONLEY, E.C., BUELL, G., PRITCHARD, C.A. & EVANS, R.J. (2000). Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature*, **403**, 86-9.
- NADELHAFT, I. & BOOTH, A.M. (1984). The location and morphology of preganglionic neurons and the distribution of visceral afferents from the rat pelvic nerve: a horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol*, **226**, 238-45.
- NADELHAFT, I. & McKENNA, K.E. (1987). Sexual dimorphism in sympathetic preganglionic neurons of the rat hypogastric nerve. *J Comp Neurol*, **256**, 308-15.
- NARAYAN, P. & LEPOR, H. (2001). Long-term, open-label, phase III multicenter study of tamsulosin in benign prostatic hyperplasia. *Urology*, **57**, 466-70.
- NOBLE, A.J., CHESS-WILLIAMS, R., COULDWELL, C., FURUKAWA, K., UCHYIUMA, T., KORSTANJE, C. & CHAPPLE, C.R. (1997). The effects of tamsulosin, a high affinity antagonist at functional alpha 1A- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol*, **120**, 231-8.
- NOGUCHI, Y., OHTAKE, A., SUZUKI, M. & SASAMATA, M. (2008). In vivo study on the effects of alpha1-adrenoceptor antagonists on intraurethral pressure in the prostatic urethra and intraluminal pressure in the vas deferens in male dogs. *Eur J Pharmacol*, **580**, 256-61.
- O'MALLEY, S.S., CHEN, T.B., FRANCIS, B.E., GIBSON, R.E., BURNS, H.D., DiSALVO, J., BAYNE, M.L., WETZEL, J.M., NAGARATHNAM, D., MARZABADI, M., GLUCHOWSKI, C. & CHANG, R.S. (1998). Characterization of specific binding of [125I]L-762,459, a selective alpha1A-adrenoceptor radioligand to rat and human tissues. *Eur J Pharmacol*, **348**, 287-95.

- ORHAN, I., ONUR, R., TASDEMIR, C., AYAR, A. & KADIOGLU, A. (2006). Sildenafil citrate inhibits agonist induced contractions in isolated rat seminal vesicles. *J Urol*, **175**, 2350-3.
- PARK, S.Y., LEE, M.Y., KEUM, E.M., MYUNG, S.C. & KIM, S.C. (2004). Ionic currents in single smooth muscle cells of the human vas deferens. *J Urol*, **172**, 628-33.
- PFAUS, J.G. & HEEB, M.M. (1997). Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull*, **44**, 397-407.
- PICARELLI, Z.P., HYPPOLITO, N. & VALLE, J.R. (1962). Synergistic effect of 5-hydroxytryptamine on the response of rats's seminal vesicles to adrenaline and noradrenaline. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **138**, 354-63.
- POWERS, R.E. & COLUCCI, W.S. (1985). An increase in putative voltage dependent calcium channel number following reserpine treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, **132**, 844-9.
- PUPPO, A.S. (1998). Functional effects of castration on alpha1-adrenoceptors in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol*, **351**, 217-23.
- RALPH, D.J. & WYLIE, K.R. (2005). Ejaculatory disorders and sexual function. *BJU Int*, **95**, 1181-6.
- RATNASOORIYA, W.D. & WADSWORTH, R.M. (1994). Tamsulosin, a selective alpha 1-adrenoceptor antagonist, inhibits fertility of male rats. *Andrologia*, **26**, 107-10.
- RICHARDSON, C.D., DONATUCCI, C.F., PAGE, S.O., WILSON, K.H. & SCHWINN, D.A. (1997). Pharmacology of tamsulosin: saturation-binding isotherms and competition analysis using cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Prostate*, **33**, 55-9.
- ROSEN, R.C. & FITZPATRICK, J.M. (2009). Ejaculatory dysfunction in men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int*.
- SANBE, A., TANAKA, Y., FUJIWARA, Y., TSUMURA, H., YAMAUCHI, J., COTECCHIA, S., KOIKE, K., TSUJIMOTO, G. & TANOUE, A. (2007). Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol*, **152**, 332-40.
- SANDERS, K.H., KOLASSA, N. & CETTIER, B. (1988). B 844-39, a new dihydropyridine derivative with slow onset and long duration of hypotensive action, in comparison with nitrendipine. *Ann N Y Acad Sci*, **522**, 531-32.
- SATTARI, S., DRYDEN, W.F., ELIOT, L.A. & JAMALI, F. (2003). Despite increased plasma concentration, inflammation reduces potency of calcium channel antagonists due to lower binding to the rat heart. *Br J Pharmacol*, **139**, 945-54.
- SCHRODER, H.D. (1980). Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J Comp Neurol*, **192**, 567-87.
- SCHULMAN, C.C., CORTVRIEND, J., JONAS, U., LOCK, T.M., VAAGE, S. & SPEAKMAN, M.J. (1996). Tamsulosin, the first prostate-selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist. Analysis of a multinational, multicentre, open-label study assessing the long-term efficacy and safety in patients with benign prostatic obstruction (symptomatic BPH). European Tamsulosin Study Group. *Eur Urol*, **29**, 145-54.
- SEO, K.K., KIM, S.C. & LEE, M.Y. (2001). Comparison of peripheral inhibitory effects of clomipramine with selective serotonin re-uptake inhibitors on contraction of vas deferens: in vitro and in vivo studies. *J Urol*, **165**, 2110-4.
- SHARIF, S.I. (1994). Dopamine contracts the rat isolated seminal vesicle by activation of postjunctional alpha-1-adrenoceptors. *Pharmacology*, **48**, 328-34.
- SHIMA, S. (1993). Characterization of adrenergic receptors in membranes from the rat seminal vesicle. *Jpn J Pharmacol*, **61**, 87-92.

- SILVA, M.A., MEGALE, A., AVELLAR, M.C. & PORTO, C.S. (1999). Expression and pharmacological characterization of alpha1-adrenoceptors in rat seminal vesicle. *Eur J Pharmacol*, **381**, 141-9.
- SIMONSEN, U., GARCIA-SACRISTAN, A. & PRIETO, D. (2002). Penile arteries and erection. *J Vasc Res*, **39**, 283-303.
- SIRONI, G., COLOMBO, D., POGGESI, E., LEONARDI, A., TESTA, R., RAMPIN, O., BERNABE, J. & GIULIANO, F. (2000). Effects of intracavernous administration of selective antagonists of alpha(1)-adrenoceptor subtypes on erection in anesthetized rats and dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, **292**, 974-81.
- SMITS, G.J., KITZEN, J.M., PERRONE, M.H. & COX, B.F. (1993). Angiotensin subtype 1 blockade selectively potentiates adenosine subtype 2-mediated vasodilation. *Hypertension*, **22**, 221-30.
- STASON, W.B., SCHMID, C.H., NIEDZWIECKI, D., WHITING, G.W., CAUBET, J.F., LUO, D., ROSS, S.D. & CHALMERS, T.C. (1997). Safety of nifedipine in patients with hypertension: a meta-analysis. *Hypertension*, **30**, 7-14.
- STAUDERMAN, K.A., GANDHI, V.C. & JONES, D.J. (1992). Fluoxetine-induced inhibition of synaptosomal [3H]5-HT release: possible Ca(2+)-channel inhibition. *Life Sci*, **50**, 2125-38.
- TAKAYANAGI, I., KONNO, F., TORU, T. & TAKAHASHI, R. (1986). Difference in mode of action of alpha 1-adrenoceptor antagonists on some vascular smooth muscles and efficacy. *Jpn J Pharmacol*, **42**, 237-41.
- TRUITT, W.A. & COOLEN, L.M. (2002). Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science*, **297**, 1566-9.
- UCHIDA, S., YAMADA, S., NAGAI, K., DEGUCHI, Y. & KIMURA, R. (1997). Brain pharmacokinetics and in vivo receptor binding of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists. *Life Sci*, **61**, 2083-90.
- VAALESTI, A. & HERVONEN, A. (1979). Innervation of the ventral prostate of the rat. *Am J Anat*, **154**, 231-43.
- VAN ROSSUM, J.M. (1963). Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **143**, 299-330.
- WALDINGER, M.D. (2005). Lifelong premature ejaculation: definition, serotonergic neurotransmission and drug treatment. *World J Urol*, **23**, 102-8.
- WALDINGER, M.D., BERENDSEN, H.H., BLOK, B.F., OLIVIER, B. & HOLSTEGE, G. (1998). Premature ejaculation and serotonergic antidepressants-induced delayed ejaculation: the involvement of the serotonergic system. *Behav Brain Res*, **92**, 111-8.
- WALDINGER, M.D., HENGVELD, M.W. & ZWINDERMAN, A.H. (1994). Paroxetine treatment of premature ejaculation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry*, **151**, 1377-9.
- WATANABE, Y., WANG, Z.M., RHEE, J.S., LAWLOR, G.F., ISHIBASHI, H. & AKAIKE, N. (2002). Inhibitory effects of 1,4-DHP antagonists on synaptic GABA release modulated by BAY-K 8644 in mechanically dissociated rat substantia innominata. *Life Sci*, **71**, 1103-13.
- YARIS, E., KESIM, M., KADIOGLU, M., KALYONCU, N.I., ULKU, C. & OZYAVUZ, R. (2003). The effects of paroxetine on rat isolated vas deferens. *Pharmacol Res*, **48**, 335-45.
- YAZAWA, H. & HONDA, K. (1993). Alpha 1-adrenoceptor subtype in the rat prostate is preferentially the alpha 1A type. *Jpn J Pharmacol*, **62**, 297-304.

- YURI, K. (1990). Immunohistochemical and enzyme histochemical localization of peptidergic, aminergic and cholinergic nerve fibers in the rat seminal vesicle. *J Urol*, **143**, 194-8.
- ZHONG, H. & MINNEMAN, K.P. (1999). Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, **375**, 261-76.

APÊNDICE

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO COPULATÓRIO

O efeito da administração de Nifedipina, (S)-(+)-Niguldipina e Tamsulosin na ejaculação foi avaliado através de observações padronizadas do comportamento copulatório de ratos machos.

O comportamento copulatório dos ratos machos sexualmente experientes observados durante o desenvolvimento desta dissertação foi caracterizado pela ocorrência de intensa investigação da região anogenital da fêmea, montas, intromissões e ejaculações. A Figura 10 mostra alguns parâmetros do comportamento dos animais ao longo da fase de aquisição de experiência sexual e os parâmetros do comportamento copulatório avaliados neste estudo.

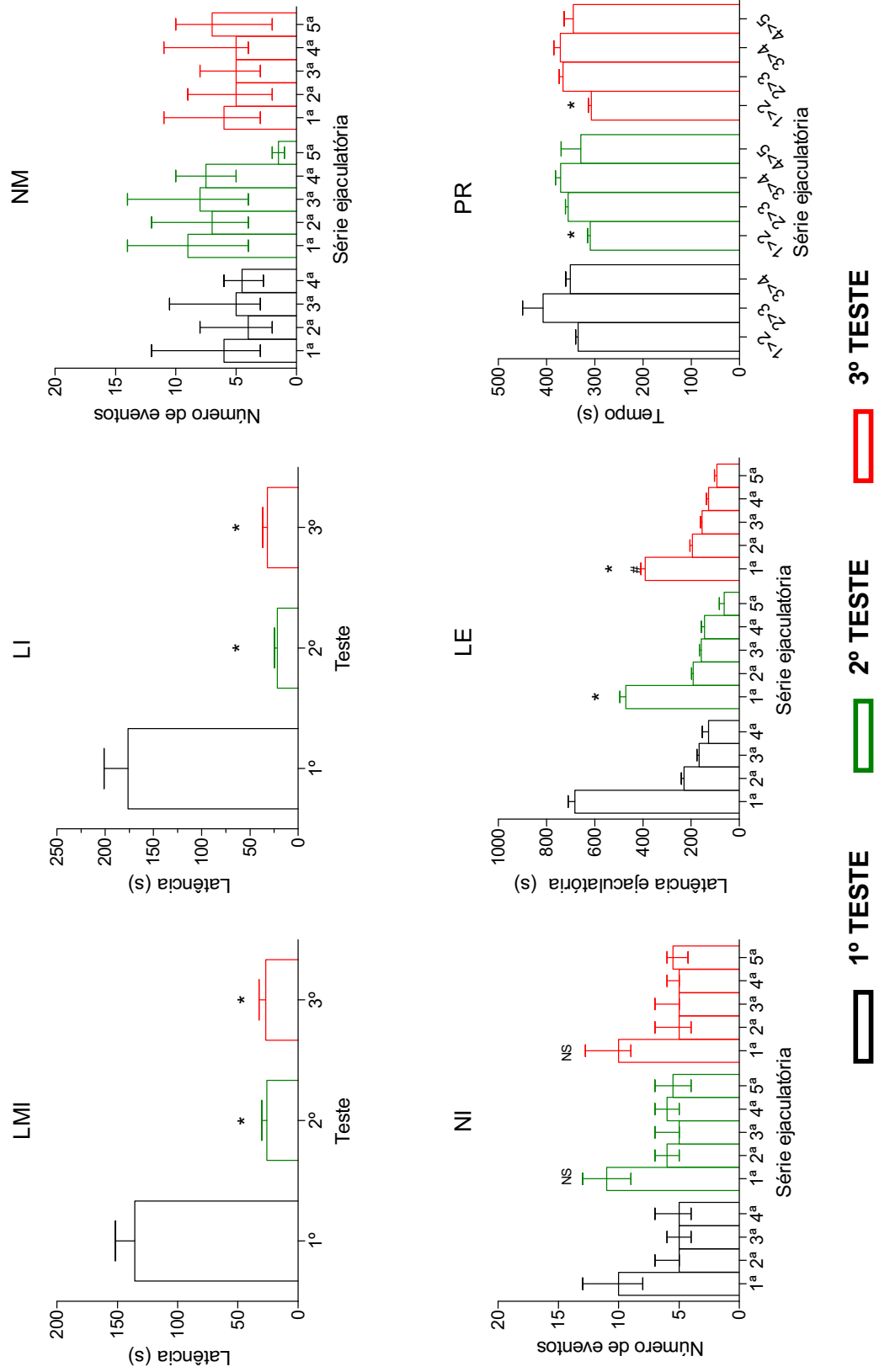


Figura 10. Evolução do comportamento copulatório de ratos machos ao longo do período de aquisição de experiência sexual. Ratos machos foram expostos a uma fêmea sexualmente receptiva durante 30 minutos em três ocasiões separadas entre si por sete dias para avaliação da performance copulatória. Durante o período de observação registrou-se a latência para primeira monta ou intromissão (LMI), latência para primeira intromissão (LI), o número de intromissões até a primeira ejaculação (NI) a latência ejaculatória (LE) e o período refratário pós-ejaculatório (PR). Dados representam média $\pm$ epm (LMI, LI, LE e PR) ou mediana e intervalo interquartil (NI, NM) de 131-144 ratos. * $p < 0.05$ vs 1ª teste, # $p < 0.05$ vs 2ª teste, NS: não significativo entre os três testes. Por motivos de clareza somente as comparações estatísticas dos eventos para a primeira série ejaculatória entre os diferentes testes são apresentadas.

Ao longo de testes sucessivos a LMI, LI, LE e PR foram significativamente reduzidos quando comparados com o primeiro teste enquanto o NI para a primeira ejaculação permaneceu inalterado ao longo dos diferentes testes. Ainda, foi observada uma redução significativa na LE para cada ejaculação em séries ejaculatórias sucessivas dentro de um mesmo teste. O número de intromissões necessário para a ejaculação foi significativamente reduzido após a primeira ejaculação ($p < 0.05$ para comparação entre o NI da 1ª série ejaculatória vs demais séries). O parâmetro NM apresentou intensa variação entre indivíduos e entre os mesmos indivíduos em diferentes testes e por isso não foi avaliado adicionalmente.

Na amostra de ratos avaliada durante o presente estudo foi possível observar grande variação na latência para a primeira ejaculação e no número de ejaculações realizada no período de 30 minutos de teste. A Figura 11 apresenta a análise de distribuição destes dois parâmetros.

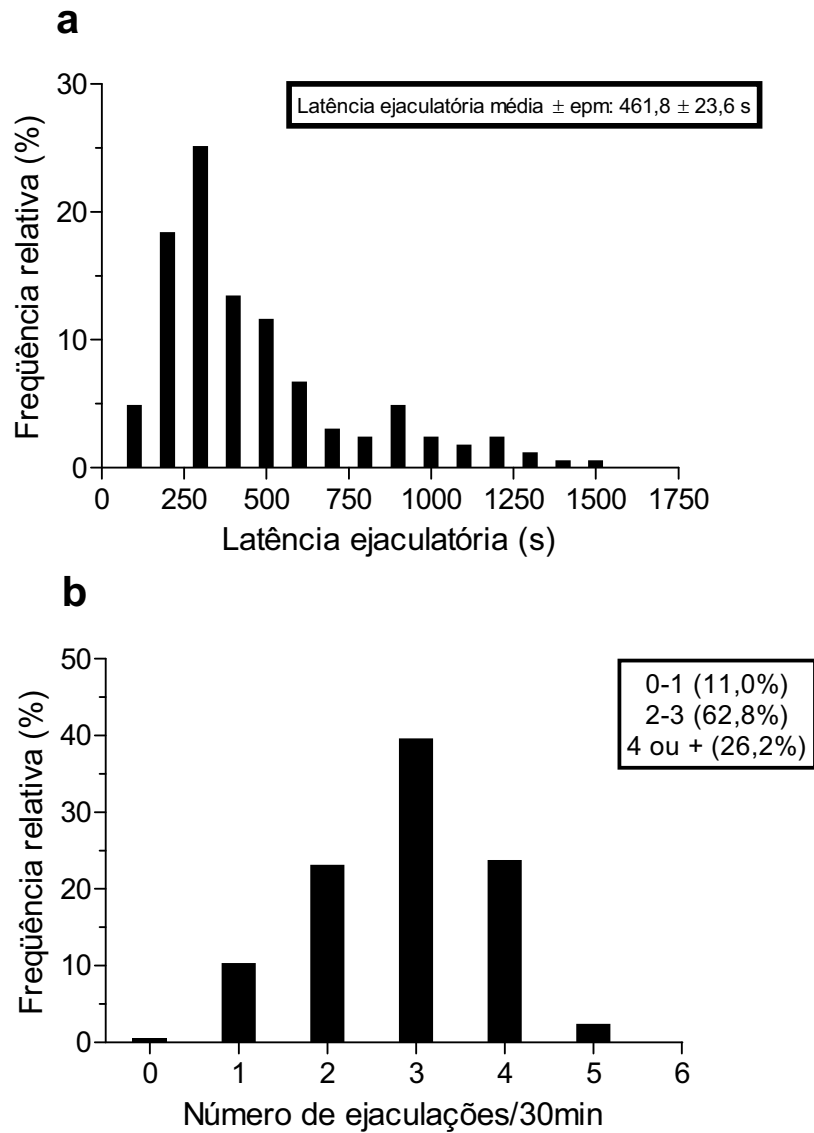


Figura 11. Análise da distribuição da latência para primeira ejaculação (**a**) e do número de ejaculações realizadas no período de 30 minutos de análise do comportamento copulatório (**b**) de ratos sexualmente experientes. Resultados representam parâmetros de 164 ratos machos adultos durante o terceiro teste de análise do comportamento copulatório da fase de aquisição de experiência sexual.

A latência ejacutória dos animais apresentou ampla variação (entre 97 e 1523 segundos) e foi caracterizada por uma média de 461,81 segundos (65% das latências compreendidas entre 160,8 e 762,9 segundos) (Figura 11a). O número de

ejaculações realizadas no período de 30 minutos de observação variou entre 0 e 5 como demonstrado na Figura 11**b**. Ainda de acordo com a Figura 11**b** a maior parte dos animais avaliados (62,8%) realizou entre 2 e 3 ejaculações durante o teste de comportamento copulatório, enquanto que animais atingindo somente uma única ejaculação representaram 10,4% do total.

Animais que ejacularam apenas uma única vez apresentaram a latência ejaculatória muito extensa ($1113 \pm 47,7$ s, $n=17$) e, portanto, não foram utilizados nos experimentos com as drogas selecionadas. O grupo experimental foi constituído de animais selecionados dentre os 147 animais que ejacularam duas ou mais vezes durante os testes de comportamento copulatório (latência ejaculatória média de $391,1 \pm 17,7$ s).

Além dos parâmetros já mencionados avaliou-se o peso dos *plugs* seminais (PS) de cada macho. Durante a cópula, os PS são formados após cada ejaculação no interior da vagina da fêmea devido à coagulação da secreção da vesícula seminal ficando fortemente presos ao cérvix uterino. Após a realização de intromissões sucessivas em uma nova série ejaculatória os PS são deslocados da vagina da fêmea tornando possível sua recuperação ao final dos trinta minutos de observação do comportamento copulatório permitindo, desta maneira, sua análise.

Na Figura 12 apresenta-se uma análise da distribuição do peso dos plugs seminais recuperados durante este estudo.

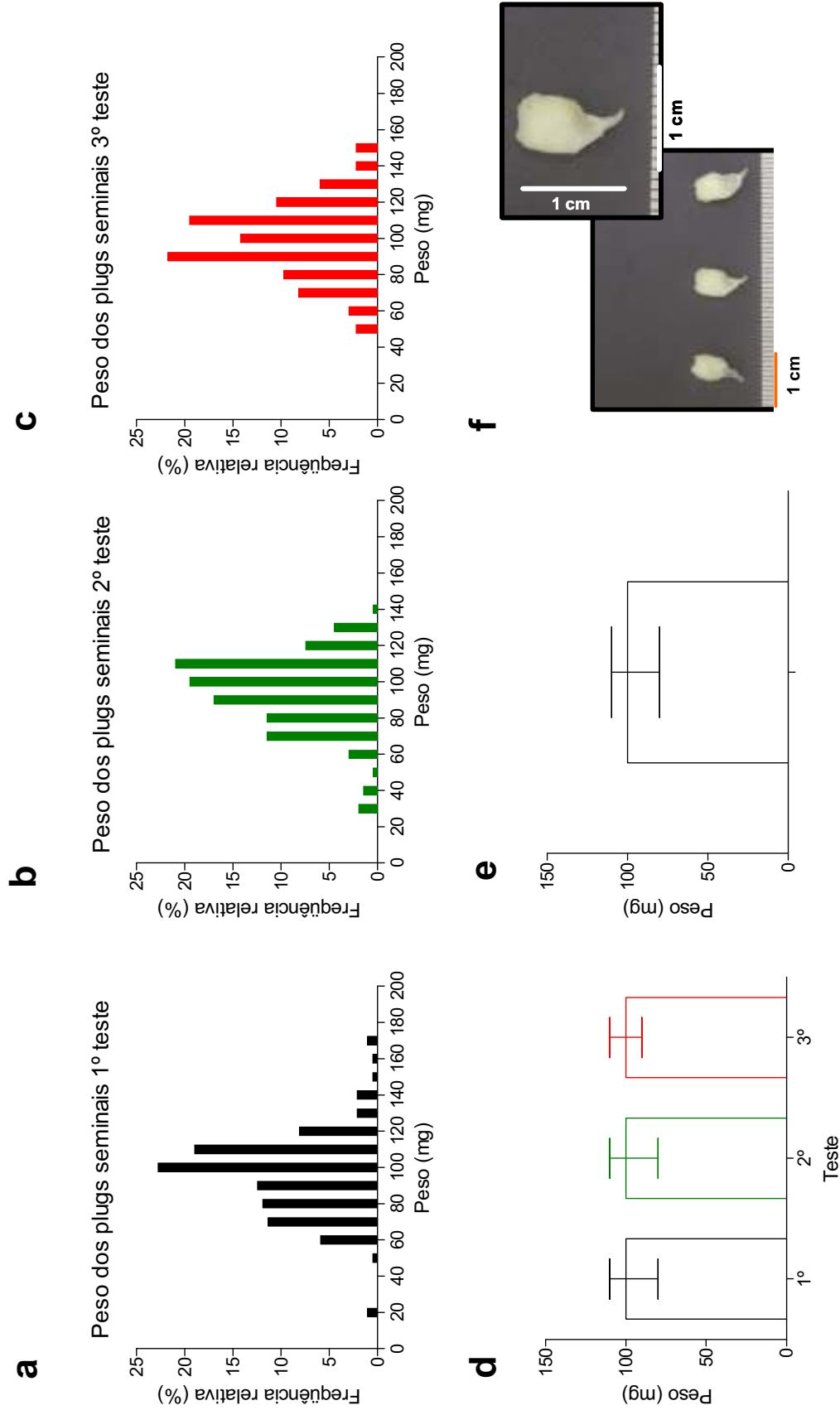


Figura 12. Análise da distribuição do peso dos PS recuperados nos experimentos de análise do comportamento copulatório. O peso úmido dos PS foi avaliado logo após o término da análise do comportamento copulatório de cada animal. Dados em **a**, **b** e **c** apresentam a frequência relativa dos pesos dos PS de 50-70 machos nos três testes do protocolo de aquisição de experiência sexual. O gráfico em **d** apresenta a quantificação do peso dos PS recuperados em **a** (n=184 PS, 70 ratos), **b** (n=200 PS, 70 ratos) e **c** (n=184 PS, 50 ratos). O gráfico em **e** apresenta os resultados do peso de PS (n=605) recuperados em diferentes testes de 100 ratos. As fotografias em **f** apresentam os PS recuperados de 2 diferentes ratos sexualmente experientes e uma imagem ampliada de um dos PS. Pesos dos PS em miligramas (mg). Resultados em **d** e **e** apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Como pode ser observado o peso do PS independe do nível de experiência sexual do rato já que não houve variação neste parâmetro entre os diferentes testes de comportamento copulatório ($p>0,05$ para as comparações entre todos os testes, Kruskal-Wallis). Observa-se também que o peso do PS é bastante homogêneo entre diferentes animais [100(80-110)mg, $n=605$ PS, 100 ratos diferentes] e entre diferentes ejaculações de um mesmo rato (2º e 3º PS da esquerda para a direita na Figura 12f). A homogeneidade no peso dos PS entre os diferentes animais permitiu a utilização deste parâmetro para comparações entre os diferentes grupos avaliados.

ANEXO

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 61/08-CEEA, sobre “Velhas drogas, novas terapêuticas: investigação do uso de antagonistas de receptores adrenérgicos alfa-1 e de antagonistas de canais de cálcio no retardo da ejaculação.”, sob a responsabilidade de **ANDRÉ SAMPAIO PUPO E LUIZ RICARDO DE ALMEIDA KIGUTI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), nesta data.



Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA

Botucatu, 03 de setembro de 2008.

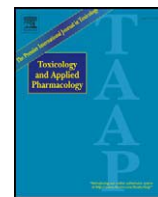


NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA

O artigo em anexo redigido em 2007/2008 e publicado em 2009 foi construído com parte dos resultados obtidos durante a dissertação da aluna Fernanda Diehl Nojimoto (“Investigação da seletividade dos inibidores da captação de noradrenalina por subtipos de adrenocetores α_1 ”, Farmacologia, UNESP/Botucatu 2009).

Os resultados obtidos e publicados com a droga sibutramina forneciam forte evidência para a hipótese de que drogas que inibiam a fase de emissão do reflexo ejaculatório, particularmente através do bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L, teriam o potencial para retardo da ejaculação e foram utilizados como suporte para o desenvolvimento desta dissertação. Entretanto, os resultados apresentados na presente dissertação não suportam a hipótese inicial e indicam que outros efeitos da sibutramina são responsáveis pelo retardo na ejaculação observado.

Os resultados obtidos nesta dissertação estão sendo reunidos em um manuscrito e serão submetidos ao periódico *The Journal of Sexual Medicine*.



Multiple effects of sibutramine on ejaculation and on vas deferens and seminal vesicle contractility

Fernanda D. Nojimoto^a, Renata C. Piffer^a, Luiz Ricardo de A. Kiguti^a, Claudiana Lameu^b, Antônio C.M. de Camargo^b, Oduvaldo C.M. Pereira^a, André S. Pupo^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP 18618000, Brazil

^b Center for Applied Toxinology-CAT/CEPID, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2009

Revised 19 May 2009

Accepted 22 May 2009

Available online 29 May 2009

Keywords:

Abnormal ejaculation

Premature ejaculation

Seminal vesicle

Sibutramine

Vas deferens

ABSTRACT

Sibutramine is an inhibitor of norepinephrine and 5-HT reuptake largely used in the management of obesity. Although a fairly safe drug, postmarketing adverse effects of sibutramine were reported including abnormal ejaculation in men. This study investigates the effects of sibutramine on ejaculation and vas deferens and seminal vesicle contractility. Adult male rats received sibutramine (5; 20; or 50 mg kg⁻¹, ip) and after 60 min were exposed to receptive females for determination of ejaculation parameters. The vasa deferentia and seminal vesicles of untreated rats were mounted in isolated organ baths for recording of isometric contractions and HEK293 cells loaded with fluorescent calcium indicator were used to measure intracellular Ca²⁺ transients. Sibutramine 5 and 20 mg kg⁻¹ reduced ejaculation latency whereas 50 mg kg⁻¹ increased ejaculation latency. Sibutramine 3 to 30 μM greatly increased the sensitivity of the seminal vesicle and vas deferens to norepinephrine, but at concentrations higher than 10 μM there were striking depressions of maximal contractions induced by norepinephrine, carbachol and CaCl₂. In HEK293 cells, sibutramine 10 to 100 μM inhibited intracellular Ca²⁺ transients induced by carbachol. Depending on the doses, sibutramine either facilitates or inhibits ejaculation. Apart from its actions in the central nervous system, facilitation of ejaculation may result from augmented sensitivity of smooth muscles to norepinephrine while reductions of intracellular Ca²⁺ may be involved in the delayed ejaculation observed with high doses of sibutramine.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Sibutramine is a non-selective inhibitor of the neuronal reuptake of norepinephrine and serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) currently used in the management of obesity and overweight (Padwal and Majumdar, 2007). The efficacy of sibutramine for treatment of obesity and overweight is related to increases in the monoaminergic neurotransmission, especially the noradrenergic, in the centers controlling satiety in the central nervous system (Jackson et al., 1997).

Although sibutramine is a fairly safe drug, postmarketing adverse effects were reported including abnormal ejaculation in men (FDA-Medwatch, 2000, available in <http://www.fda.gov/medwatch/safety/1999/nov99.htm#meridi>). It is well established that 5-HT modulates negatively ejaculation through activation of inhibitory efferent pathways (for review, see Giuliano, 2007). In fact, drugs that increase serotonergic neurotransmission, such as the antidepressants inhibitors of the neuronal reuptake of monoamines, delay ejaculation.

Interestingly, the potencies of the inhibitors of the neuronal reuptake of monoamines as antidepressants and as inhibitors of ejaculation are not necessarily coincident, suggesting that additional mechanisms may be involved, including peripheral actions such as direct inhibition of the contractions of the smooth muscles of the vas deferens (Seo et al., 2001).

Ejaculation is comprised of two coordinated phases, emission and ejection (for review see McMahon et al., 2004). The sympathetic nervous system innervates the structures involved in emission, including the vasa deferentia and seminal vesicles along with the ejaculatory ducts, the bladder neck, the prostate and other structures in the perineal floor. Emission starts with bladder neck closure, and then propulsive contractions of the smooth muscles of the vas deferens and prostate expel their contents into the prostatic urethra; this is accompanied by forcible expulsion of the contents of the seminal vesicles. Norepinephrine released from sympathetic varicosities innervating these organs has an important role in the contractions of these smooth muscles by activating α₁-adrenoceptors. Finally, the ejaculate is expelled from the urethra in a series of spurts caused by rhythmic contractions of the ischiocavernosus, bulbospongiosus and other associated perineal muscles as a consequence of activation

* Corresponding author. Fax: +551438113744.

E-mail address: aspupo@ibb.unesp.br (A.S. Pupo).

of somatic fibers arising from S2 to S4 level of the sacral medulla (McMahon et al., 2004). In fact, the sympathetic nervous system has paramount importance in ejaculation and a α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptor triple knockout mouse has severe fertility impairment because emission is drastically impaired in despite of producing viable sperm (Sanbe et al., 2007).

The present study characterizes the effects of sibutramine on ejaculation in male rats and investigates in details the multiple and complex actions of sibutramine in the contractility of the vas deferens and seminal vesicle *in vitro*.

Methods

General. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Experimental Animals from UNESP – Botucatu and are in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH). Wistar rats (males, 16 to 20 weeks old, 250 to 380 g; virgin females, 14 to 16 weeks old, 200 to 220 g) were kept in a controlled environment with temperature at 25 ± 1 °C; humidity of $55 \pm 5\%$; 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) and had free access to regular lab chow (estrogen-free) and tap water.

Determination of ejaculation parameters. Male Wistar rats were previously tested for sexual behaviour. If the male did not mount or intromit within 10 min, this male was considered sexually inactive and not used (Agmo, 1997; Gerardin et al., 2005). Thus, sexually experienced male rats received sibutramine 5; 20; or 50 mg kg⁻¹, or vehicle (saline) ip, during the dark phase of the cycle. After 60 min, the rats were individually placed into a Plexiglass cage under red-light illumination, and after 5 min, a receptive female in natural oestrus phase (exhibiting lordosis) was introduced. The following parameters were recorded: intromission and ejaculation latencies and number of intromissions until the first ejaculation.

***In vitro* contraction studies.** Male Wistar rats were killed by decapitation and selected tissues were carefully excised and prepared for digital recording of isometric contractions as follows: the vas deferens (epididymal portion) and seminal vesicle were cleaned of adherent tissues and secretions and mounted in organ baths under 9.8 mN tension in a nutrient solution with the following composition (mM): NaCl 138; KCl 5.7, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 0.36, NaHCO₃ 15, dextrose 5.5, prepared in glass-distilled, de-ionised water, maintained at 30 °C (vas deferens) or 32 °C (seminal vesicle), pH 7.4, and continuously bubbled with 95%O₂/5%CO₂. This nutrient solution is a modified Tyrode's solution optimized to minimize erratic "spontaneous" contractions and along with the respective temperatures, improves the contractions of these two smooth muscles (Zuleika P. Picarelli, personal communication). Changes in vas deferens and seminal vesicle tension were recorded using FORT10 isometric force transducers (WPI, USA) connected to Transbridge 4M Transducer Amplifier (WPI, USA) connected to a PC based MP100 System and analysed off-line using AcqKnowledge version 3.5.7 software (Biopac Systems Inc., U.S.A.).

After a 30 min stabilization period, tissues were challenged with 80 mM KCl. This procedure was repeated until reproducible contractions were obtained. Then, a concentration–response curve to norepinephrine, methoxamine, carbachol, or KCl was constructed by adding cumulative concentrations of the drugs. For the concentration–response curves to CaCl₂, tissues were incubated in a nominal Ca²⁺-free nutrient solution (same composition as above, except that CaCl₂ was omitted) with high K⁺ (80 mM, a submaximal concentration in the vas deferens) as a depolarizing agent obtained by the addition of 74.3 mM KCl, 60 s before the concentration–response curve. After washing and relaxation, sibutramine 3 to 100 μ M or nifedipine (10 to 300 nM, under subdued light) was incubated with the tissues. After at least 30 min, a concentration–response curve to

the agonist was then obtained in the presence of sibutramine. Preliminary experiments showed that at least five consecutive concentration–response curves to the agonists tested are similar in respect to sensitivity and maximal response in both vas deferens and seminal vesicle. Sibutramine triggered erratic contractile activity in the vas deferens, which was quantified by the sum of any phasic or tonic activity above base line determined at 20 ms intervals during 5 min (15,000 samples) divided by the vas deferens wet weight. For normalization purposes, these measurements were taken 1 min after the addition of sibutramine since there was a delay of up to 50 s for the appearance of contractions.

Intracellular Ca²⁺ measurements. HEK293 cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium with sodium pyruvate supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were seeded the night before the experiment at a concentration of 50,000 cells/100 μ l per well of black walled, clear bottomed, 96-well microplates. Then, the cells were incubated at 37 °C for 60 min with the appropriate calcium indicator; FlexStation Calcium Assay Kit[®] and 2.5 mM probenecid. Cells loaded with this kit did not require wash step. The final volume in each well was 200 μ l. The cells were incubated with sibutramine (3 to 100 μ M) for 30 min. The plates were then placed into the FlexStation system (Molecular Devices, USA) to monitor fluorescence before and after the addition of carbachol, 10 μ M. The samples were excited at 485 nm, and emission was detected at 525 nm with a 515 nm cutoff filter. Samples were read at 1.52 s intervals for 120 s (total of 79 reads/well). Responses were measured as peak fluorescence intensity minus basal fluorescence intensity, calculated within SoftMax[®]Pro.

Drugs and reagents. Drugs and reagents were obtained from the following sources: calcium chloride anhydrous (Vetec Química Fina Ltda, Brazil); carbamylcholine chloride (carbachol), methoxamine hydrochloride, nifedipine and norepinephrine [L-(–)-norepinephrine bitartrate salt monohydrate] all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Prazosin hydrochloride (RBI/Sigma, Natick, MA); sibutramine hydrochloride monohydrate (Jiangyin Eas, China); FlexStation Calcium Assay Kit[®] (Molecular Devices, USA); Dulbecco's modified Eagle's medium; fetal bovine serum, streptomycin and penicillin all from Invitrogen, USA. All other salts and reagents were analytical grade.

Results

Effects of sibutramine on ejaculation

Sibutramine 5 and 20 mg kg⁻¹, usual hypophagic doses in rats (Jackson et al., 1997), reduced the latency for the first ejaculation by approximately 48% (Table 1). The reduction in the latency for ejaculation was also accompanied by a reduction in the number of intromissions until the first ejaculation. However, sibutramine 50 mg kg⁻¹ increased the latency for the first ejaculation by approximately 50% (Table 1).

Table 1

Ejaculation parameters in male rats treated with vehicle (saline, ip) or increasing doses of sibutramine.

	Sibutramine (mg kg ⁻¹ , ip)			
	0 (vehicle)	5	20	50
Latency for first intromission (s)	10.4 ± 2.4	6.6 ± 1.2	13.4 ± 4.1	7.4 ± 1.4
Latency for first ejaculation (s)	372 ± 62	195 ± 32*	195 ± 29*	558 ± 62*
Number of intromissions until ejaculation	14.4 ± 1.7	9.7 ± 1.4*	9.0 ± 0.8*	10.7 ± 1.0*

Values represent the mean ± s.e.mean of observations made in 6 male rats per group.

* Different from the respective value found in rats treated with vehicle ($p < 0.05$, ANOVA followed by Newman–Keuls).

Effects of sibutramine on the contractile tonus of the vas deferens and seminal vesicle

Incubation of sibutramine induced small contractions in the rat vas deferens, whose profiles and intensities depended on the concentrations investigated. Sibutramine at 3 and 10 μM triggered erratic, predominantly phasic contractions on the vas deferens (Fig. 1). The profiles of the contractile activity in the presence of sibutramine 30 and 100 μM changed to predominantly tonic contractions characterized by long lasting sustained elevations above base line topped by phasic episodes (Fig. 1a). These contractions lasted for all period of incubation (approximately 40 min). The sum of the contractile events measured at 20 ms intervals during 5 min shows that sibutramine induces concentration-dependent increases in the mechanical activity of the vas deferens (Fig. 1b). These contractions were abolished when the organs were incubated in nominal Ca^{2+} -free nutrient solution ($n=4$, data not shown) and by 300 nM nifedipine ($n=4$, data not

shown), but were completely resistant to 30 nM prazosin ($n=4$, data not shown), a selective α_1 -adrenoceptor antagonist at a concentration 100-fold higher than its equilibrium dissociation constant (K_D) in the rat vas deferens (Pupo, 1998). The resistance to prazosin indicates that activation of α_1 -adrenoceptors either from a direct action of sibutramine (agonism) or norepinephrine released from sympathetic endings is not involved.

Interestingly, 3 to 100 μM sibutramine was unable to trigger phasic or tonic contractions in the seminal vesicle at 32 or 37 $^{\circ}\text{C}$ ($n=4$, data not shown).

Effects of sibutramine on contractions induced by activation of α_1 -adrenoceptors and muscarinic acetylcholine receptors

Fig. 2 shows representative tracings of the contractions induced by norepinephrine in the rat vas deferens in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine, and Fig. 3a shows the

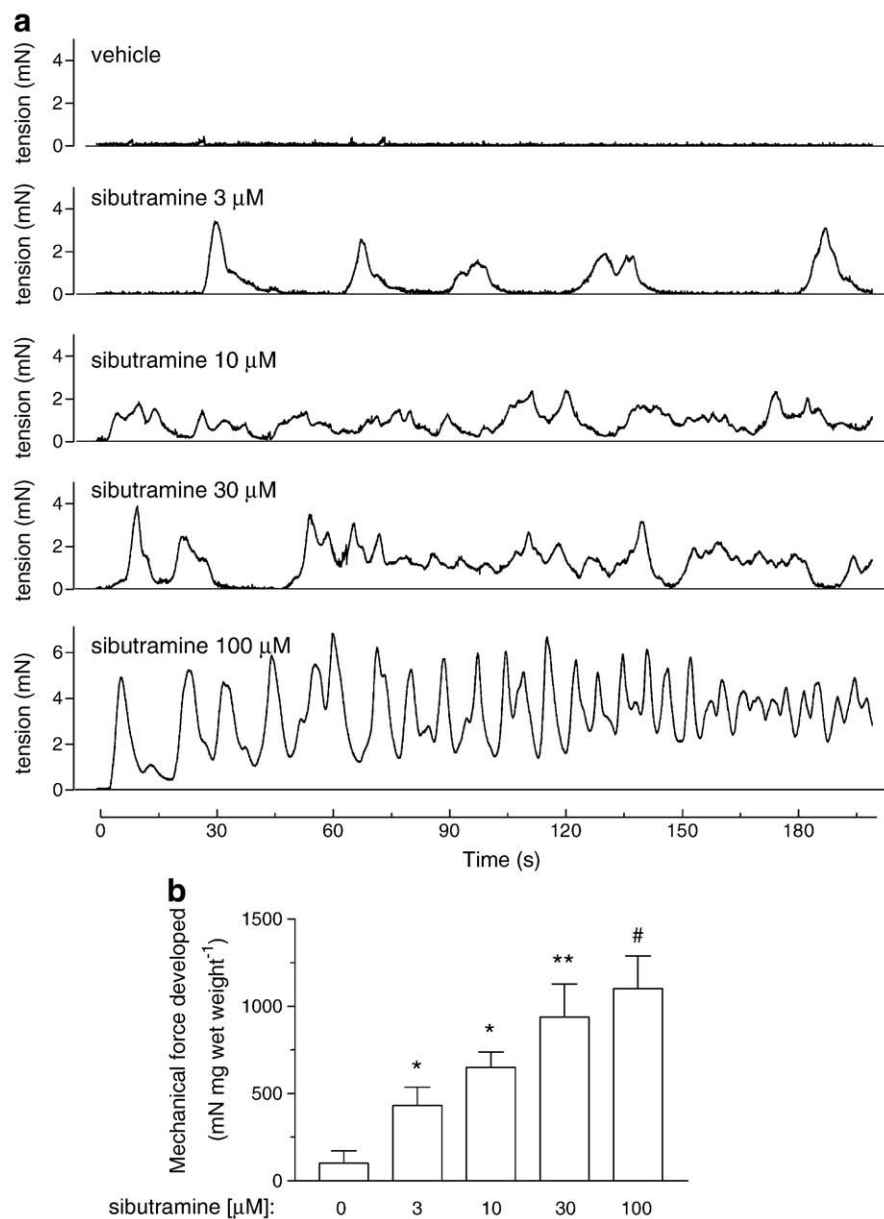


Fig. 1. Representative tracings of the contractile activity of the vas deferens in the absence (vehicle, water) and presence of increasing concentrations of sibutramine (a). Panel b shows the mechanical force developed (mN mg^{-1} tissue wet weight in 5 min) by the vas deferens in the absence (vehicle, water) and presence of increasing concentrations of sibutramine. The tracings are representative of 4 experiments with organs from 4 rats. Values are mean $\pm$ s.e. mean of 4 independent experiments with organs from 4 rats. *Different from the contractile activity found in the presence of vehicle (ANOVA, followed by Newman–Keuls, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $\#p<0.001$).

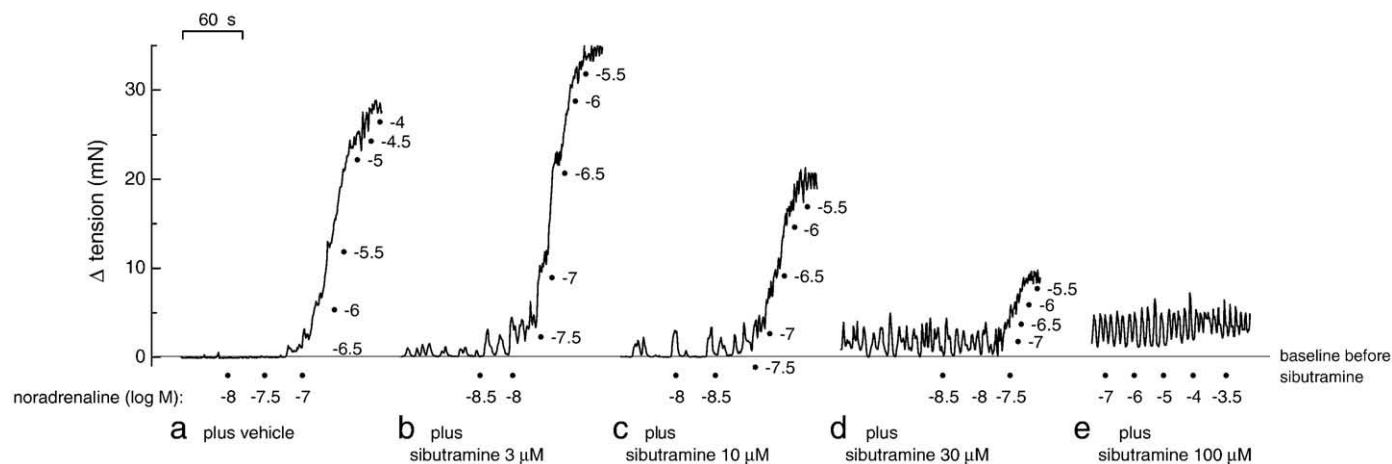


Fig. 2. Representative tracings of the contractions of the vas deferens to norepinephrine in the absence (a, vehicle, water) and presence of increasing concentrations of sibutramine (b–e). Sibutramine was added at least 30 min before the construction of the concentration–response curves to norepinephrine. Tension developed is expressed in mN, the horizontal calibration bar is for 60 s and the dotted line reflects the baseline before addition of vehicle or sibutramine. The tracings are representative of 4 independent experiments with organs from 4 rats.

respective concentration–response curves. The maximal contractions in Fig. 3 were normalized in relation to that induced by 80 mM KCl (25.1 ± 0.8 mN, $n = 24$). Sibutramine 3 μ M increased the sensitivity of the vas deferens to norepinephrine by approximately 20-fold as characterized by a leftward shift in the concentration–response curve (Figs. 2 and 3a, Table 2). The leftward shift persisted in the presence of 10 to 30 μ M sibutramine, but there were significant reductions in the maximal contractions induced by norepinephrine (Figs. 2 and 3a, Table 2). Since the vas deferens is densely innervated by the sympathetic nervous system, this leftward shift would result from the inhibition of neuronal uptake of norepinephrine by sibutramine.

To check this, the effects of 6 μ M cocaine on contractions induced by norepinephrine in the absence and presence of sibutramine were investigated. This concentration of cocaine is sufficient to induce maximal block of neuronal uptake in the rat vas deferens (Pupo, 1998; Pupo et al., 1999; Campos et al., 2003). Fig. 3b shows concentration–response curves to norepinephrine in the absence (control, $pEC_{50} = 5.85 \pm 0.08$, E_{max} , % of KCl 80 mM = 113 ± 5 , $n = 4$) and presence of cocaine 6 μ M ($pEC_{50} = 6.88 \pm 0.08$, E_{max} , % of KCl 80 mM = 130 ± 5 , $n = 4$) and cocaine 6 μ M plus sibutramine 3 μ M ($pEC_{50} = 7.08 \pm 0.03$, E_{max} , % of KCl 80 mM = 115 ± 2 , $n = 4$). For comparison, a concentration–response curve to norepinephrine in the presence of 3 μ M

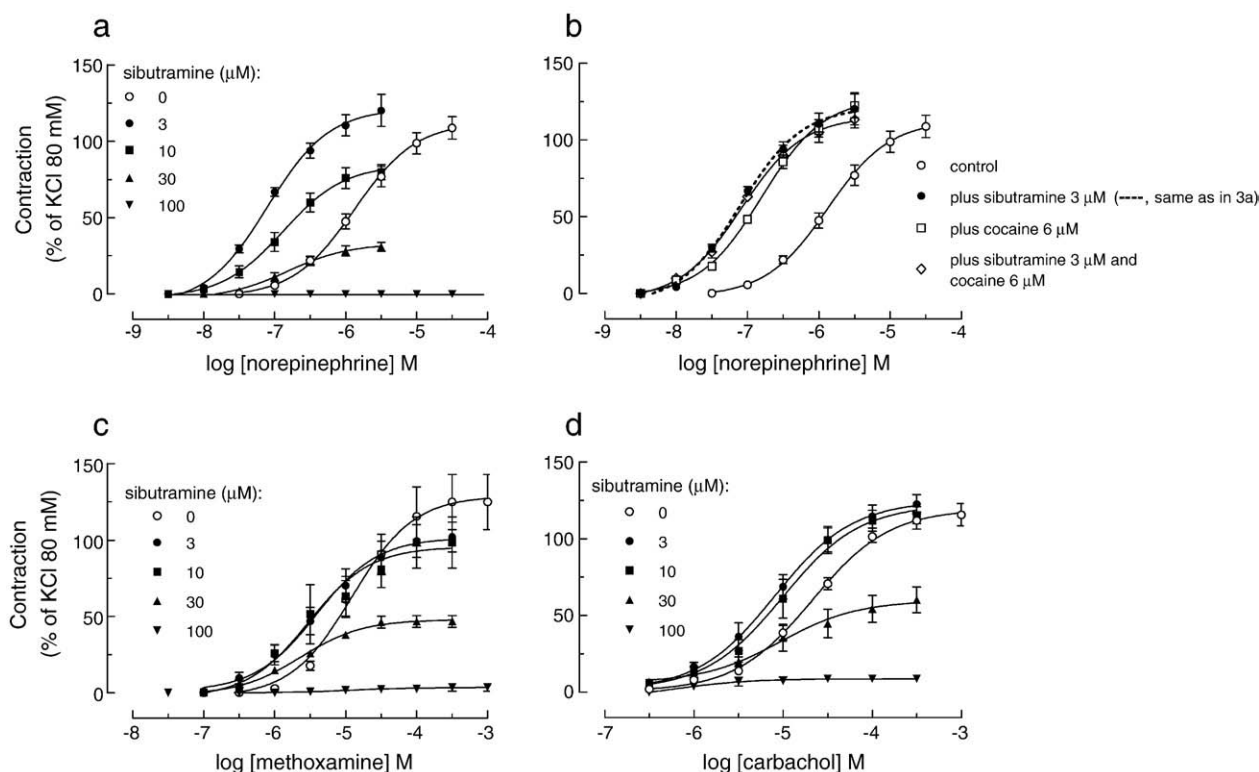


Fig. 3. Concentration–response curves obtained in the vas deferens for norepinephrine (a), methoxamine (c) and carbachol (d) in the absence ($\circ$) and presence of increasing concentrations of sibutramine (3, $\bullet$; 10, $\blacksquare$; 30, $\blacktriangle$ and 100 μ M, $\blacktriangledown$). Panel b shows concentration–response curves to norepinephrine in the absence ($\circ$) and presence of 6 μ M cocaine ($\square$), 3 μ M sibutramine ($\bullet$, same as in a), and 6 μ M cocaine plus 3 μ M sibutramine ($\diamond$). Each symbol represents the mean, and the vertical bars when larger than the symbol, the s.e. mean of 4 independent experiments with organs from 4 rats.

Table 2

Parameters of agonism^a (pEC_{50} , $-\log$ of the effective concentration at 50%; and E_{max} , maximal contractions in relation to that induced by KCl 80 mM, arbitrarily defined as 1.0) in the vas deferens for norepinephrine, methoxamine and carbachol in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine.

		Sibutramine (μ M)		CR ^b	Inhibition ^c (%)		CR ^b	Inhibition ^c (%)		CR ^b	Inhibition ^c (%)		CR ^b	Inhibition ^c (%)
		0	3			10				30				
Norepinephrine	pEC_{50}	5.80 ± 0.09	$7.10 \pm 0.08^*$	19.9	–	$6.89 \pm 0.11^*$	12	–	–	$6.82 \pm 0.15^*$	10.5	–	n.d.	n.d.
	E_{max}	1.12 ± 0.05	1.21 ± 0.07	–	0	$0.85 \pm 0.04^*$	–	25	–	$0.32 \pm 0.02^*$	–	68	0*	– 100
Methoxamine	pEC_{50}	4.90 ± 0.16	$5.37 \pm 0.17^*$	2.9	–	$5.45 \pm 0.27^*$	3.5	–	–	$5.57 \pm 0.11^*$	4.7	–	n.d.	n.d.
	E_{max}	1.36 ± 0.10	1.06 ± 0.07	–	23	0.99 ± 0.09	–	27	–	$0.49 \pm 0.03^*$	–	64	0*	– 100
Carbachol	pEC_{50}	4.67 ± 0.06	$5.09 \pm 0.10^*$	2.6	–	$5.02 \pm 0.13^*$	2.2	–	–	$5.01 \pm 0.26^*$	2.2	–	n.d.	n.d.
	E_{max}	1.19 ± 0.03	1.25 ± 0.05	–	0	1.22 ± 0.06	–	0	–	$0.60 \pm 0.05^*$	–	50	$0.09 \pm 0.02^*$	92

^a Values represent the mean $\pm$ s.e. mean of 4 independent experiments with organs from 4 rats.

^b CR is the concentration-ratio between the pEC_{50} in the presence and absence of the respective sibutramine concentration and values higher than 1.0 represent leftward displacements in the concentration–response curves.

^c Inhibition represents the percent reduction of maximal response in relation to the respective curve in the absence of sibutramine.

* Different from the respective value found in the absence of sibutramine ($p < 0.05$, paired Student's *t*-test).

sibutramine was included (same curve as in Fig. 3a). Cocaine increased the potency of norepinephrine only in the absence of sibutramine 3 μ M, indicating that this potentiation results from the inhibition of neuronal uptake of norepinephrine. To further examine this, the effects of sibutramine on contractions induced by methoxamine, a selective α_1 -adrenoceptor agonist that is not a substrate for neuronal uptake (Trendelenburg et al., 1970), were investigated. There were only slight, but consistent leftward shifts in the concentration–response curves to methoxamine in the presence of sibutramine (approximately 3-fold, Fig. 3c, Table 2), indicating that additional mechanisms other than the block of neuronal uptake are involved in the potentiation of the effects of norepinephrine by sibutramine. In fact, sibutramine also induced similarly small leftward shifts in the concentration–response curves to the muscarinic acetylcholine receptors agonist carbachol (Fig. 3d, Table 2), indicating that part of this potentiation is unrelated to the block of neuronal uptake. In accordance to what was observed in the concentration–response curves to norepinephrine, there were striking reductions in the maximal contractions induced by methoxamine and carbachol in the presence of 30 to 100 μ M sibutramine (Figs. 3c, d, Table 2).

Fig. 4 shows the concentration–response curves to norepinephrine (a), methoxamine (b), and carbachol (c) obtained in seminal vesicles in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine. The maximal contractions in Fig. 4 were normalized in relation to that induced by 80 mM KCl (18.2 ± 1.1 mN, $n = 20$). In seminal vesicles, 3 to 100 μ M sibutramine also induced leftward shifts in the concentration–response curves to norepinephrine, whereas the concentrations of 10 to 100 μ M reduced the maximal contractions (Fig. 4a, Table 3). This leftward shift induced by sibutramine was similar to that induced by cocaine 6 μ M ($pEC_{50} = 6.85 \pm 0.08$, $n = 4$, data not shown). However, in contrast to what was observed in the vas deferens, sibutramine was unable to potentiate the contractions induced by methoxamine (Fig. 4b, Table 3) and carbachol (Fig. 4c, Table 3), but depressed the maximal effects of the concentration–response curves for these drugs.

Effects of sibutramine on contractions induced by $CaCl_2$ in nominal Ca^{2+} -free-high K^+ depolarizing nutrient solution

Some concentrations of sibutramine reduced the maximal contractions induced by different stimuli, such as α_1 -adrenoceptor (norepinephrine and methoxamine) and muscarinic acetylcholine receptor (carbachol) activation presenting a classical insurmountable antagonism. Such behaviour of sibutramine resembles those of voltage-dependent Ca^{2+} channel blockers, which exert a functional antagonism of the contractions induced by activation of several receptors in the rat vas deferens. To check if the insurmountable antagonism presented by sibutramine is related to the block of voltage-dependent Ca^{2+} channels, its effects on contractions induced

by $CaCl_2$ in a nominal Ca^{2+} -free-high K^+ (80 mM) depolarizing nutrient solution were investigated.

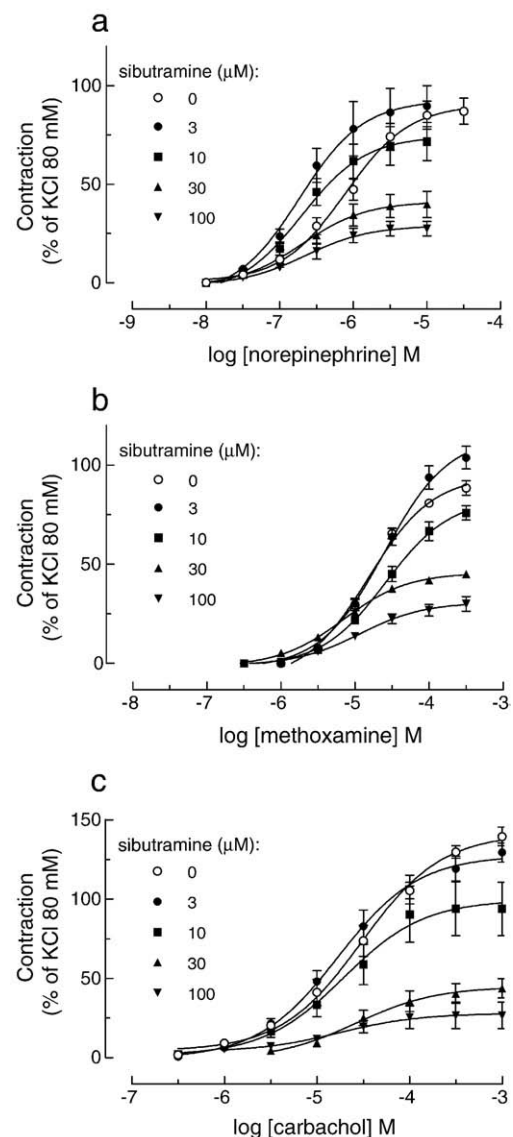


Fig. 4. Concentration–response curves obtained in the seminal vesicle for norepinephrine (a), methoxamine (b) and carbachol (c) in the absence ($\circ$) and presence of increasing concentrations of sibutramine (3, $\bullet$; 10, $\blacksquare$; 30, $\blacktriangle$ and 100 μ M, $\blacktriangledown$). Each symbol represents the mean, and the vertical bars when larger than the symbol, the s.e. mean of 4 independent experiments with organs from 4 rats.

Table 3
Parameters of agonism^a (pEC_{50} , $-\log$ of the effective concentration at 50%; and E_{max} , maximal contractions in relation to that induced by KCl 80 mM, arbitrarily defined as 1.0) in the seminal vesicle for norepinephrine, methoxamine and carbachol in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine.

		Sibutramine (μM)												
		0		3		10		30		100				
				CR ^b	Inhibition (%) ^c	CR ^b	Inhibition ^c (%)	CR ^b	Inhibition ^c (%)	CR ^b	Inhibition ^c (%)			
Norepinephrine	pEC ₅₀	6.10 ± 0.10	6.73 ± 0.17	4.3	–	6.69 ± 0.15	3.9	–	6.70 ± 0.21	4	–	6.65 ± 0.18	3.5	–
	E _{max}	0.90 ± 0.04	0.93 ± 0.06	–	0	0.74 ± 0.05*	–	18	0.41 ± 0.03*	46		0.29 ± 0.02*	68	
Methoxamine	pEC ₅₀	4.82 ± 0.11	4.64 ± 0.14	1.0	–	4.60 ± 0.15	1.0	–	4.80 ± 0.10	1.0		4.80 ± 0.29	1.0	–
	E _{max}	0.94 ± 0.04	1.03 ± 0.09	–	0	0.83 ± 0.06	–	0	0.46 ± 0.02*	48		0.31 ± 0.04*	66	
Carbachol	pEC ₅₀	4.61 ± 0.07	4.77 ± 0.09	1.0		4.70 ± 0.21	1.0	–	4.60 ± 0.27	1.0	–	4.77 ± 0.30	1.0	–
	E _{max}	1.41 ± 0.05	1.28 ± 0.05	–	0	0.99 ± 0.08*	–	30	0.45 ± 0.04*	–	68	0.27 ± 0.03*	–	80

^a Values represent the mean $\pm$ s.e.mean of 4 independent experiments with organs from 4 rats.

^b CR is the concentration-ratio between the pEC_{50} in the presence and absence of the respective sibutramine concentration and values higher than 1.0 represent leftward displacements in the concentration–response curves.

^c Inhibition represents the percent reduction of maximal response in relation to the respective curve in the absence of sibutramine.

* Different from the respective value found in the absence of sibutramine ($p < 0.05$, paired Student's t -test).

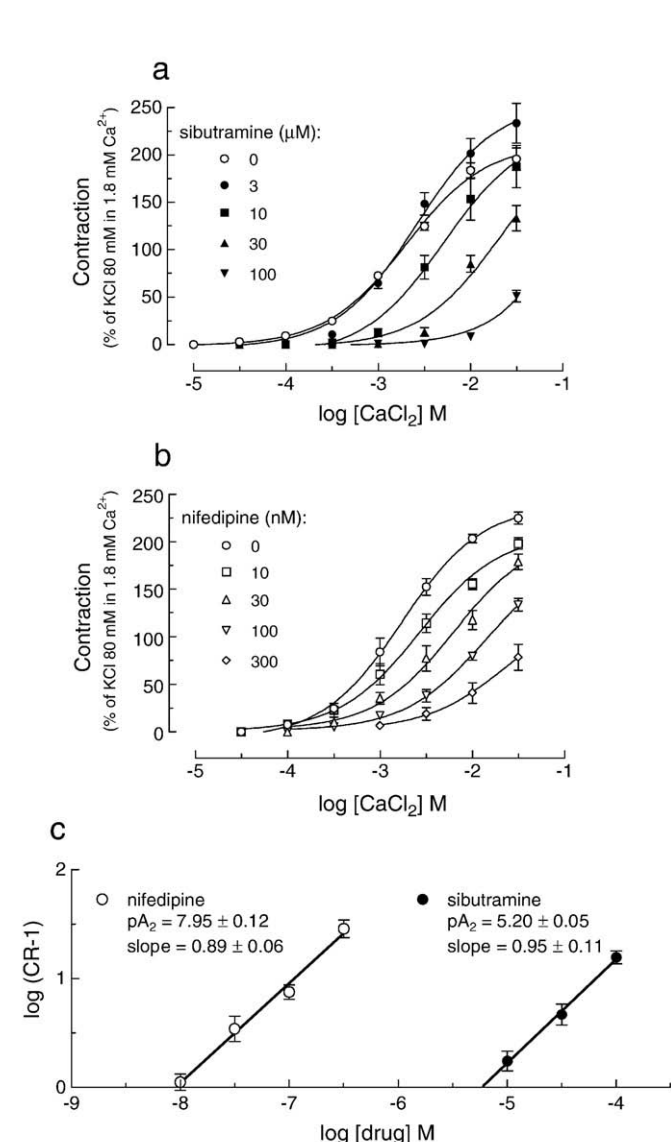


Fig. 5. Concentration–response curves to CaCl₂ in the vas deferens in a nominal Ca²⁺-free/High K⁺ (80 mM) depolarizing nutrient solution in the absence (○) and presence of increasing concentrations of sibutramine (a; 3, ●; 10, ■; 30, ▲ and 100 μM, ▼) and nifedipine (b; 10, □; 30, △; 100, ▽; and 300 nM, ◇). Panel c shows the respective Schild plot for the antagonism of CaCl₂ by sibutramine and nifedipine and the derived estimative of its potencies (pA₂) and slopes of the regression line. Each symbol represents the mean, and the vertical bars when larger than the symbol, the s.e.mean of 4 independent experiments with organs from 4 rats.

Sibutramine 3 μM increased the maximal contractions induced by CaCl₂, whereas higher concentrations (10 to 100 μM) induced rightward shifts in the concentration–response curves (Fig. 5a). This apparently “competitive antagonism” of CaCl₂-induced contractions is a property long known to belong to the L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel blockers (Triggle and Swamy, 1983). In fact, nifedipine, a dihydropyridine Ca²⁺ channel blocker, also antagonized the contractions induced by CaCl₂ presenting behaviour similar to competitive antagonism (Fig. 5b, $n = 4$). Schild analysis (Arunlakshana and Schild, 1959) of these antagonism shows that the rightward displacements are linearly related to the concentration of sibutramine and nifedipine (Fig. 5c). The potencies of sibutramine and nifedipine (pA₂) estimated through the formula $pA_2 = -\log (\text{sibutramine, M}) + \log (CR-1)$ were 5.20 ± 0.05 and 7.95 ± 0.12 (Fig. 5c, sibutramine $n = 12$ and nifedipine $n = 16$, composed by 4 values for each concentration), respectively.

Effects of sibutramine on intracellular Ca²⁺ transients in HEK293 cells

Carbachol (10 μM, a submaximal concentration) increased the intracellular Ca²⁺ transients in HEK 293 cells previously loaded with the fluorescent Ca²⁺ “NO WASH[®]” dye through activation of endogenous muscarinic acetylcholine receptors. At 3 μM, sibutramine increased the intracellular Ca²⁺ transients induced by carbachol, whereas at 10 to 100 μM these transients were inhibited (Fig. 6).

Discussion

This study investigated the effects of sibutramine, a hypophagic drug non-selective inhibitor of neuronal reuptake of norepinephrine

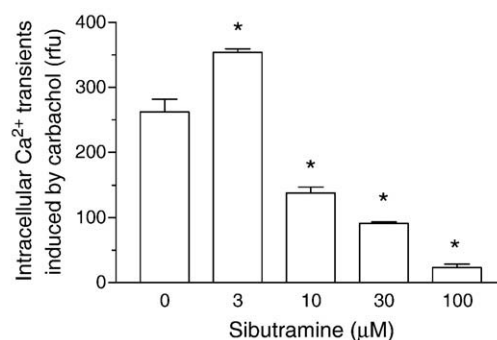


Fig. 6. Effects of increasing concentrations of sibutramine on intracellular Ca²⁺ transients (expressed as relative fluorescence units, rfu) induced by activation of endogenous muscarinic acetylcholine receptors in HEK 293 cells by a submaximal concentration of carbachol (10 μM). Values are mean $\pm$ s.e.mean of 3 to 5 independent experiments in duplicate. *Different from the value found in the presence of vehicle (ANOVA, followed by Newman–Keuls, $p < 0.01$).

and 5-HT, on ejaculation and on the mechanical activity of the vas deferens and seminal vesicle, tissues whose contractility are important in the early phase of ejaculation.

Depending on the doses or concentrations investigated in the present study, sibutramine exerted varied and opposite effects on ejaculation and vas deferens and seminal vesicle contractility. To facilitate the discussion, the acceleration of ejaculation induced by the lower doses of sibutramine will be discussed first in light of its effects increasing the sensitivity of the smooth muscles of the vas deferens and seminal vesicle to several different contractile stimuli, and then the delaying action of the higher dose of sibutramine on ejaculation will be discussed subsequently in light of its inhibitory effects on smooth muscle contractions and intracellular calcium transients in HEK 293 cells.

Doses of sibutramine usually effective in reducing food intake and body weight in rats (5 and 20 mg kg⁻¹, ip) accelerated ejaculation by approximately 50% and consistently reduced by a half the number of intromissions until ejaculation. These effects are opposite to what is expected from a drug that enhances monoaminergic neurotransmission in the central nervous system, especially the serotonergic one. However, the facilitatory effect on ejaculation is not difficult to explain based on the peripheral actions of sibutramine observed in the present study.

Firstly, as expected for an inhibitor of the neuronal uptake, sibutramine presented indirect sympathomimetic actions in the vas deferens and seminal vesicle, as manifested by the greatly increased potencies of norepinephrine in inducing contractions of these organs. However, while sibutramine and cocaine induced comparable increases in the sensitivity of the seminal vesicle to norepinephrine, the increase in the sensitivity of the vas deferens to norepinephrine induced by sibutramine was slightly higher than that induced by cocaine. This may be related to the block of K⁺ channels by sibutramine (see discussion below), which also caused supersensitivity to methoxamine, a selective α_1 -adrenoceptor agonist that is not a substrate for neuronal uptake and even for carbachol.

Secondly, sibutramine increased the mechanical activity of the vas deferens even in the absence of any concomitant stimulation, as evidenced by the small erratic contractions observed after its incubation. This effect is consistent with the recently described K⁺ channels blocking activity of sibutramine (Kim et al., 2007). Importantly, sibutramine blocked A-Type, Kv4.3, and the delayed rectifier K⁺ channels, Kv1.3 and Kv3.1 in the same concentration range (μ M) as it triggered contractions in the vas deferens. Moreover, the electrophysiological properties of the K⁺ currents in the vas deferens are in accordance with the involvement of the above mentioned A-Type and delayed rectifier K⁺ channels in the control of the resting membrane potential and in the regulation of the rhythmic electrical activity of the smooth muscle cells of the rat vas deferens (Harhun et al., 2003). Actually, at least the A-Type, Kv4.3 K⁺ channel is expressed in the rat vas deferens (Ohya et al., 1997). Hyperpolarization of the cell membrane caused by opening of K⁺ channels closes voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels and reduces contractility. Conversely, inhibition of these K⁺ currents depolarizes the membrane and opens L-type Ca²⁺ channels leading to smooth muscle contractions. In fact, the increased mechanical activity of the vas deferens triggered by sibutramine was abolished by nifedipine and by incubation of the organs in a nominal Ca²⁺-free nutrient solution. The K⁺ channels blocking property of sibutramine also explains the nonspecific increase in sensitivity of the vas deferens to carbachol and methoxamine, presumably as a result of the depolarization which facilitates the contractions induced by these agents.

Interestingly, sibutramine was unable to trigger phasic or tonic contractions in the seminal vesicle but, coherently, it was also unable to increase the potencies of carbachol and methoxamine. The reasons for the absence of such effects in the seminal vesicle are unclear but may involve inherent electrogenic characteristics of these K⁺ currents in the seminal vesicle.

Therefore, it is plausible that these two combined actions of sibutramine, i.e. blockade of K⁺ channels in the vas deferens and of neuronal uptake in both vas deferens and seminal vesicle leading to increased sensitivity of these tissues to endogenous norepinephrine released from sympathetic activation during emission, underlie its apparently paradoxical facilitatory effect over ejaculation observed in the present study.

The highest dose of sibutramine investigated in the present study (50 mg kg⁻¹, ip) delayed ejaculation by approximately 50%. It is well established that drugs that increase serotonergic neurotransmission delay ejaculation, and sibutramine (and especially its deaminated metabolites) is an effective inhibitor of the neuronal uptake of 5-HT. It is also well established that the delaying effect on ejaculation of most of the selective and non-selective inhibitors of monoamine reuptake demands chronic treatment and perhaps, adaptive process in serotonergic synapses in the central nervous system have to take place (Giuliano and Clement, 2006; Giuliano, 2007). In the present study the rats were treated only acutely with a single dose of sibutramine. Therefore, it is unlikely that the delaying effect of sibutramine on ejaculation results from its action in the central nervous system, pointing that peripheral mechanism(s) might be important. In fact, higher concentrations of sibutramine (10 to 100 μ M), in despite of inducing small contractions in the vas deferens, exerted insurmountable antagonism on the concentration–response curves to several diverse stimuli, such as norepinephrine, methoxamine and carbachol. Such nonspecific inhibition indicates that sibutramine blocks a common event, such as Ca²⁺ influx into the smooth muscle cells. Indeed, sibutramine inhibited the contractions of the vas deferens in response to CaCl₂ presenting an apparent “competitive antagonism”, i.e. concentration-dependent rightward shifts in the concentration–response curves. This is the classical behaviour observed for the inhibition of concentration–response curves to CaCl₂ by L-type Ca²⁺ channel antagonists in several different smooth muscles (Triggle and Swamy, 1983). In addition, sibutramine strikingly reduced intracellular Ca²⁺ transients induced by carbachol (present study) and bradykinin (C. Lameu and A.S. Pupo, unpubl. data) in HEK 293 cells. Nevertheless, the lowest concentration of sibutramine investigated (3 μ M) increased these Ca²⁺ transients in HEK 293 cells, probably as a result of its K⁺ channels blocking activity.

One would expect that the inhibition of Ca²⁺ influx evidenced for sibutramine is inconsistent with the small contractile responses induced by this agent in the rat vas deferens. Sibutramine blocks the open state of A-Type, Kv4.3, and the delayed rectifier K⁺ channels, Kv1.3 and Kv3.1 presenting both concentration- and use-dependence, where the degree of block increases with repetitive depolarizations (Kim et al., 2007). Also, it would be reasonable to expect that the maximal contractile effect of sibutramine should be obtained with the concentration of 3 μ M, at which the Ca²⁺ influx was not inhibited, but since the block of K⁺ channels by sibutramine is both concentration and use-dependent, this low concentration of sibutramine probably induces only small depolarizations, and consequently only small contractions were observed. However, it is likely that the small and erratic contractions induced by the higher concentrations of sibutramine do not reflect the true efficacy of sibutramine to depolarize the smooth muscle cells of the vas deferens because the contractile stimuli resultant from these depolarizations are counteracted by its ability to inhibit Ca²⁺ influx.

The current study shows that sibutramine has multiple, complex and self-canceling effects. The block of Ca²⁺ flux through the membrane counteracts the increased motilities resultant from the inhibition of K⁺ channels in the vas deferens and indirect sympathomimetic action in both vas deferens and seminal vesicles. These self-canceling effects observed *in vitro* may be responsible for the absence of dose-dependence in the facilitatory effect of sibutramine on ejaculation, since the doses of 5 and 20 mg kg⁻¹ reduced the latency for ejaculation similarly by half. However, it is difficult to establish

whether the absence of dose-dependence is due to the fact that sibutramine 5 and 20 mg kg⁻¹ induced similarly maximal facilitatory effects on ejaculation, or if at 20 mg kg⁻¹ the facilitatory effect is greater but counteracted by the block of Ca²⁺ flux through the membrane.

It would be important to establish how the findings of the present study in rats relate to the clinical observation of abnormal ejaculation in humans. However, abnormal ejaculation encompasses a wide range of distinct ejaculatory disturbances including retrograde ejaculation into the urinary bladder, anejaculation (absence of ejaculation) and changes in the latency for ejaculation. Therefore, it is not possible to establish the precise relation between the findings of the present study and the reported adverse effect of sibutramine, because the latter is too general. Nevertheless, the findings of the present study may subsidize further investigation on effects of sibutramine in humans by providing the pharmacological basis for the interpretation of the specific effect observed.

There is a large difference in the doses of sibutramine used in humans and those investigated in the present study. In humans, sibutramine is effective at 10 or 15 mg daily, which in an overweight subject weighing 100 kg roughly results in 0.1 to 0.15 mg kg⁻¹ doses. In rats, the effects of sibutramine on weight gain are noticeable only with doses close to 3 mg kg⁻¹ (and maximal at 10 to 20 mg kg⁻¹, depending on the study and experimental condition). Therefore, the effective doses of sibutramine in rats are much higher than those in humans. We are not aware of differences in the pharmacokinetic or pharmacodynamic properties of sibutramine in humans and rats that could explain why rats require much higher doses than humans, except that the elimination rate of one of the major active metabolites of sibutramine is approximately two fold higher in the rat (Park et al., 2004; Um et al., 2008). However, it is interesting to note that this significant difference in hypophagic potencies between human and rats is not exclusive to sibutramine; mazindol, another hypophagic drug with similar mechanism of action, is prescribed to humans at 1 to 3 mg daily (Halpern and Mancini, 2003), while in rats the hypophagic effect is observed with 6 mg kg⁻¹ (value converted from micromole kg⁻¹ to mg kg⁻¹ in Wellman et al., 2003). Another example is phentermine which is prescribed at 15 to 37.5 mg daily for humans (Bray, 2000) while in rats the hypophagic effect is observed with 5 to 10 mg kg⁻¹ (Roth et al., 2008).

The present study shows that depending on the doses, sibutramine either facilitates or inhibits ejaculation. Apart from its actions in the central nervous system, facilitation of ejaculation may result from augmented sensitivity of smooth muscles to norepinephrine and to membrane depolarization while reductions of intracellular Ca²⁺ concentrations may be involved in the delayed ejaculation observed with high doses of sibutramine.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors recognize the important contributions of the young pharmacologist Cleber Teixeira with inspiring discussions and helpful suggestions. This work was supported by FAPESP (08/50423-7 to A.S.

Pupo) and CNPq (A.S. Pupo). F. D. Nojimoto, R. C. Piffer, and L.R.A. Kiguti contributed equally to this work. F.D. Nojimoto is a graduating student pursuing its MSc degree in Pharmacology and holds a studentship from FAPESP (06/58828). L.R.A. Kiguti is an under-graduating student pursuing a Bachelor degree in Biology.

References

- Agmo, A., 1997. Male rat sexual behavior. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 1, 203–209.
- Arunlakshana, O., Schild, H.O., 1959. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14, 48–58.
- Bray, G.A., 2000. A concise review on the therapeutics of obesity. *Nutrition* 16, 953–960.
- Campos, M., de Lucena Morais, P., Pupo, A.S., 2003. Functional characterisation of alpha (1)-adrenoceptors in denervated rat vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368, 72–78.
- Gerardin, D.C., Pereira, O.C., Kempinas, W.G., Florio, J.C., Moreira, E.G., Bernardi, M.M., 2005. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol. Behav.* 84, 97–104.
- Giuliano, F., 2007. 5-Hydroxytryptamine in premature ejaculation: opportunities for therapeutic intervention. *Trends Neurosci.* 30, 79–84.
- Giuliano, F., Clement, P., 2006. Serotonin and premature ejaculation: from physiology to patient management. *Eur. Urol.* 50, 454–466.
- Halpern, A., Mancini, M.C., 2003. Treatment of obesity: an update on anti-obesity medications. *Obes. Rev.* 4, 25–42.
- Harhun, M.I., Jurkiewicz, A., Jurkiewicz, N.H., Kryshal, D.O., Shuba, M.F., Vladimirova, I.A., 2003. Voltage-gated potassium currents in rat vas deferens smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 446, 380–386.
- Jackson, H.C., Bearham, M.C., Hutchins, L.J., Mazurkiewicz, S.E., Needham, A.M., Heal, D.J., 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, 1613–1618.
- Kim, S.E., Ahn, H.S., Choi, B.H., Jang, H.J., Kim, M.J., Rhie, D.J., Yoon, S.H., Jo, Y.H., Kim, M.S., Sung, K.W., Hahn, S.J., 2007. Open channel block of A-type, kv4.3, and delayed rectifier K⁺ channels, Kv1.3 and Kv3.1, by sibutramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 753–762.
- McMahon, C.G., Abdo, C., Incrocci, L., Perelman, M., Rowland, D., Waldinger, M., Xin, Z.C., 2004. Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J. Sex Med.* 1, 58–65.
- Ohya, S., Tanaka, M., Oku, T., Asai, Y., Watanabe, M., Giles, W.R., Imaizumi, Y., 1997. Molecular cloning and tissue distribution of an alternatively spliced variant of an A-type K⁺ channel alpha-subunit, Kv4.3 in the rat. *FEBS Lett.* 420, 47–53.
- Padwal, R.S., Majumdar, S.R., 2007. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimobant. *Lancet* 369, 71–77.
- Park, J.Y., Kim, K.A., Park, P.W., Suh, K.H., Lee, G.S., 2004. Relative bioavailability and pharmacokinetics of a new sibutramine formulation in healthy male subjects: a randomized, open-label, two-period, comparative crossover study. *Clin. Ther.* 26, 2092–2101.
- Pupo, A.S., 1998. Functional effects of castration on alpha1-adrenoceptors in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 217–223.
- Pupo, A.S., Cavenaghi, D.L., Campos, M., Lucena Morais, P., Jurkiewicz, N.H., Jurkiewicz, A., 1999. Effects of indoramin in rat vas deferens and aorta: concomitant alpha1-adrenoceptor and neuronal uptake blockade. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1832–1836.
- Roth, J.D., Trevaskis, J.L., Wilson, J., Lei, C., Athanacio, J., Mack, C., Kesty, N.C., Coffey, T., Weyer, C., Parkes, D.G., 2008. Antiobesity effects of the beta-cell hormone amylin in combination with phentermine or sibutramine in diet-induced obese rats. *Int. J. Obes. (Lond.)* 32, 1201–1210.
- Sanbe, A., Tanaka, Y., Fujiwara, Y., Tsumura, H., Yamauchi, J., Cotecchia, S., Koike, K., Tsujimoto, G., Tanoue, A., 2007. Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br. J. Pharmacol.* 152, 332–340.
- Seo, K.K., Kim, S.C., Lee, M.Y., 2001. Comparison of peripheral inhibitory effects of clomipramine with selective serotonin re-uptake inhibitors on contraction of vas deferens: in vitro and in vivo studies. *J. Urol.* 165, 2110–2114.
- Trendelenburg, U., Maxwell, R.A., 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.
- Triggle, D.J., Swamy, V.C., 1983. Calcium antagonists. Some chemical-pharmacologic aspects. *Circ. Res.* 52, 117–28.
- Um, S.Y., Kim, K.B., Kim, S.H., Ju, Y.C., Lee, H.S., Oh, H., Choi, K.H., Chung, M.W., 2008. Determination of the active metabolites of sibutramine in rat serum using column-switching HPLC. *J. Sep. Sci.* 31, 2820–2826.
- Wellman, P.J., Miller, D.K., Ho, D.H., 2003. Noradrenergic modulation of ephedrine-induced hypophagia. *Synapse* 48, 18–24.